

Aus der Gynäkologischen und Ambulatorischen Tierklinik
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität

Vorstand: Prof. Dr. Dr. habil. R. Stolla

Angefertigt unter der Leitung von

Prof. Dr. Dr. habil. J. Braun

**Individuelle Unterschiede zwischen Bullen
bei der *in vitro* Kapazitation und *in vitro* Fertilisation
und deren Beziehung zur Non-Return-Rate**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde

der Tierärztlichen Fakultät

der Ludwig-Maximilians-Universität München

von

Wera Stranek

aus Neubiberg

München 2004

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan: Univ.-Prof. Dr. A. Stolle
Referent: Univ.-Prof. Dr. J. Braun
Korreferent: Univ.-Prof. Dr. M. Förster

Tag der Promotion: 13. Februar 2004

Meinen Eltern

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG.....	4
2	LITERATURÜBERSICHT	5
2.1	KAPAZITATION IN VITRO.....	5
2.1.1	Methoden der Kapazitation in vitro	7
2.1.1.1	Spermaaufbereitung	7
2.1.1.1.1	Einfache Verdünnung und Waschen	8
2.1.1.1.2	Swim up	8
2.1.1.1.3	Transmigration	10
2.1.1.1.4	Percoll.....	11
2.1.1.1.5	Adhärenz-Methoden.....	13
2.1.1.2	Cokultur von Spermien mit Eileiterzellen.....	14
2.1.1.3	Biologische Flüssigkeiten.....	16
2.1.1.3.1	Eileiterflüssigkeit	16
2.1.1.3.2	Follikelflüssigkeit.....	17
2.1.1.4	Chemisch definierte Medien.....	18
2.1.2	Feststellung der Kapazitation	24
2.1.2.1	Färbung mit Chlortetrazyklin	24
2.1.2.2	Zona pellucida-Bindung und -Penetration	25
2.1.2.2.1	Zona pellucida-Bindungstest	25
2.1.2.2.2	Zona pellucida-Penetrationstest	26
2.2	AKROSOMENREAKTION IN VITRO.....	29
2.2.1	Auslösung der Akrosomenreaktion in vitro	30
2.2.1.1	Zona pellucida – Proteine	30
2.2.1.2	Phosphatidylcholine	31
2.2.1.3	Calcium-Ionophor	33
2.2.2	Feststellung der Akrosomenreaktion	35
2.2.2.1	Fluoreszenzoptische Färbung mit FITC-PSA.....	35
2.2.2.2	Färbung mit Chlortetrazyklin	37
2.3	PATHOLOGIE DER BEFRUCHTUNG / PROBLEME BEI DER IVF.....	38
2.3.1	Parthenogenese	38
2.3.2	Polyspermie	39
2.4	KORRELATIONEN ZWISCHEN IN VITRO UND IN VIVO FERTILISATION.....	43
2.4.1	Spermieneigenschaften	43
2.4.1.1	Motilität	43

2.4.1.2	Morphologie	44
2.4.1.3	Membranintegrität.....	45
2.4.1.4	Kerneigenschaften (Chromatinstruktur).....	45
2.4.1.5	Sonstiges.....	46
2.4.2	Spermienfunktionstests	47
2.4.2.1	Kapazitation und Akrosomenreaktion.....	47
2.4.2.2	Zona pellucida – Bindungstest.....	50
2.4.2.3	Befruchtungs- bzw. Penetrationsraten	51
2.4.2.4	Teilungs- und Blastozystenraten.....	52
2.4.3	Kombinationen von Tests.....	54
3	MATERIALIEN UND METHODEN.....	55
3.1	ZEITLICHER VERLAUF DER KAPAZITATION, ERMESSEN ANHAND DER INDUZIERTEN AKROSOMENREAKTION, SOWIE FERTILISATIONS- UND POLYSPERMIERATEN BEI BULLEN MIT UNTERSCHIEDLICHEN NON-RETURN-RATEN	55
3.1.1	Versuchsaufbau und untersuchte Tiere	55
3.1.2	In vitro Kapazitation der Samenproben	56
3.1.2.1	Aufbereitung des Spermas.....	56
3.1.2.2	In vitro Kapazitation der Spermproben	57
3.1.2.3	Auslösen der Akrosomenreaktion mit Calcium-Ionophor A23187	58
3.1.2.4	Färbung mit Ethidiummonoazid (EMA)	58
3.1.2.5	Färbung mit Fluorisothiozyanat-Pisum sativum Agglutinin (FITC-PSA)	59
3.1.2.6	Fluoreszenzoptische Beurteilung der Vitalität und des akrosomalen Zustandes	59
3.1.3	In vitro Fertilisation	61
3.1.3.1	Eizellgewinnung und -reifung	61
3.1.3.2	In vitro Fertilisation	63
3.1.3.3	Denudieren der Eizellen	63
3.1.3.4	Färbung der Eizellen mit Lacmoid	64
3.1.3.5	Beurteilung der Eizellen.....	65
3.2	ZUSAMMENHANG ZWISCHEN SPERMIENKONZENTRATION BEI DER IVF UND FERTILISATIONS-, POLYSPERMIE- UND BLASTOZYSTENRATEN.....	66
3.2.1	Versuchsaufbau und untersuchte Tiere	66
3.2.2	In vitro Fertilisation	66
3.2.3	Denudieren der Eizellen und Lacmoidfärbung.....	67
3.2.4	Embryokultur und Beurteilung der Blastozysten	68
3.3	EINFLUß DER SPERMAAUFBEREITUNG MITTELS SWIM UP AUF MOTILITÄT UND MORPHOLOGIE.....	69

3.3.1	Motilität.....	69
3.3.2	Morphologie	69
3.4	STATISTISCHE AUSWERTUNG.....	69
4	ERGEBNISSE	70
4.1	ZEITLICHER VERLAUF DER IN VITRO KAPAZITATION, GEMESSEN ANHAND DER INDUZIERTEN AKROSOMENREAKTION, SOWIE FERTILISATIONS- UND POLYSPERMIERATEN BEI BULLEN MIT UNTERSCHIEDLICHEN NON-RETURN-RATEN	70
4.1.1	In vitro Kapazitation	70
4.1.1.1	Anteil lebender akrosomenreagierte Spermien an allen Spermien.....	70
4.1.1.2	Anteil lebender akrosomenreagierte Spermien an allen lebenden Spermien.....	73
4.1.1.3	Induzierte Akrosomenreaktion bei den lebenden akrosomenreagierten Spermien (Anteil an allen Spermien).....	76
4.1.1.4	Induzierte Akrosomenreaktion bei den lebenden akrosomenreagierten Spermien (Anteil an den lebenden Spermien).....	78
4.1.2	In vitro Fertilisation	80
4.1.2.1	Anteile der unbefruchteten, regulär befruchteten und polysperm penetrierten Eizellen.....	80
4.2	ZUSAMMENHANG ZWISCHEN SPERMIENKONZENTRATION BEI DER IVF UND FERTILISATIONS-, POLYSPERMIE- UND BLASTOZYSTENRATEN.....	82
4.2.1	Fertilisationsraten.....	82
4.2.2	Polyspermieraten	83
4.2.3	Blastozystenraten	84
4.3	EINFLUß DER SPERMAAUFBEREITUNG MITTELS SWIM UP AUF MOTILITÄT UND MORPHOLOGIE.....	86
4.3.1	Computergestützte Untersuchung der Spermienmotilität	86
4.3.2	Subjektive Untersuchung der Spermienmorphologie	87
5	DISKUSSION	89
6	ZUSAMMENFASSUNG	95
7	SUMMARY	97
8	ANHANG	99
9	LITERATURVERZEICHNIS	100

1 Einleitung

Die prospektive Einschätzung der Fruchtbarkeit von Bullen in der Künstlichen Besamung gewinnt immer mehr an Bedeutung, nicht zuletzt deswegen, weil bestimmte Spitzenbuller immer schneller und umfangreicher in der Zucht eingesetzt werden. Die Möglichkeiten der klassischen Spermabeurteilung zur Vorhersage der Fruchtbarkeit sind aber sehr begrenzt. Zwar können Bullen mit sehr schlechter Fruchtbarkeit damit in der Regel erkannt werden, geringere Abweichungen der Fruchtbarkeit, die sehr wohl züchterisch und wirtschaftlich relevant sein können, sind damit aber nicht zu erkennen. Mit der Etablierung der *in vitro* Fertilisation beim Rind als zuverlässige und bereits in der Praxis der Tierzucht einsetzbare Methode ist es auch möglich geworden, komplexe funktionelle Eigenschaften der Spermien wie die Fähigkeit zur *in vitro* Kapazitation oder das Penetrationsvermögen von Eizellen zu messen. Daran knüpft sich die Hoffnung, in Zukunft das Befruchtungsvermögen eines Bullen sicherer und differenzierter durch *in vitro* Testverfahren bestimmen zu können. In dieser Arbeit sollte überprüft werden, ob die Induzierbarkeit der Akrosomenreaktion im Rahmen der *in vitro* Kapazitation mit der Fruchtbarkeit von Bullen, gemessen an der Non-Return-Rate, in Zusammenhang steht und ob Parameter der *in vitro* Fertilisation geeignet sind, das Befruchtungsvermögen von Bullen einzuschätzen.

2 Literaturübersicht

2.1 Kapazitation in vitro

Ejakulierte Spermien sind nicht unmittelbar in der Lage, eine Eizelle zu befruchten. Sie müssen zuvor erst eine bestimmte Zeit im weiblichen Genitaltrakt verbringen, wie Austin und Chang 1951 unabhängig voneinander entdeckten. Während dieser Zeit kommt es zu einer Reihe von biochemischen und funktionellen Veränderungen, die zusammenfassend als Kapazitation bezeichnet werden (Austin, 1952). Diese Veränderungen befähigen die Spermien dazu, die extrazelluläre Hülle der Eizelle, die Zona pellucida, zu erkennen und an sie zu binden. Durch diese Interaktion kommt es zu einer Signalkaskade, die zur Akrosomenreaktion führt, wodurch die Spermien dazu befähigt werden, die Eizelle zu penetrieren und zu befruchten. Obwohl diese Beobachtungen bereits vor über einem halben Jahrhundert gemacht wurden und seither unzählige Untersuchungen durchgeführt worden sind, um diese Phänomene zu erforschen, sind viele der diesen Vorgängen zugrunde liegenden molekularen Mechanismen noch immer nicht ganz geklärt.

Im folgenden sind die aktuellen Erkenntnisse nach Literaturübersichten von Visconti et al. (1998), Visconti et al. (2002) und Jha et al. (2003) zusammengefaßt.

Während der Kapazitation wird Cholesterol aus der Plasmamembran entfernt. Als Akzeptor können Serumalbumin, High Density Lipoproteine und beta-Zyklodextrine dienen. Dadurch sinkt das Cholesterol/Phospholipid-Verhältnis in der Plasmamembran, wodurch diese fluider wird. Man nimmt an, daß dadurch Lipid-Rafts zerstört werden, die Signalgeschehen aktivieren, welche Tyrosinkinase, G-Proteine und andere Moleküle betreffen könnten.

Das Ruhemembranpotential wird von der relativen Permeabilität der Plasmamembran für die Ionen im umgebenden Milieu bestimmt. Die Ionenkonzentrationen im Nebenhoden, im Seminalplasma bei der Ejakulation und im weiblichem Genitaltrakt unterscheiden sich stark. Dadurch werden Modulationen der intrazellulären Ionenkonzentrationen ausgelöst, die schließlich zu einem veränderten Membranpotential führen. Ionenkanäle scheinen aktiv an der Regulation der Spermienfunktion teilzunehmen. Die Kapazitation ist von einer Hyperpolarisation der Plasmamembran begleitet, die teilweise auf eine erhöhte Kaliumionenpermeabilität aufgrund eines Nachlassens der inhibitorischen Regulation der

Kaliumkanäle zurückgeführt werden könnte. Diese Hyperpolarisation könnte die Fähigkeit der Spermien, mittels spannungsabhängigen Calciumkanälen transiente Calciumerhöhungen während der Akrosomenreaktion zu schaffen, regulieren.

Die Kapazitation ist Bikarbonat-abhängig. Spermien scheinen Anionentransporter zu besitzen. Die transmembranöse Bewegung von Bikarbonat aus der Umgebung in die Spermien könnte für den bekannten Anstieg des intrazellulären pH während der Kapazitation verantwortlich sein. Außerdem wird die Synthese von cAMP durch die spermale Adenylatzyklase durch Bikarbonat stimuliert. Der Anstieg von cAMP während der Kapazitation und die Stimulation der Adenylatzyklaseaktivität in Spermien durch einen erhöhten Gehalt an Bikarbonat und Calcium implizieren eine Rolle für dieses Enzym und den cAMP-Signalpfad bei der Kapazitation.

Die Kapazitation ist Calcium-abhängig. Die Initiierung und/oder Regulierung der Kapazitation durch Calcium geschieht über verschiedene Zielmoleküle, von denen manche mit dem cAMP-Metabolismus zusammenhängen. Calcium arbeitet auf Ebene der Effektorenzyme, die an der Signaltransduktion beteiligt sind. Das Kation kann einerseits die Synthese von cAMP durch die Adenylatzyklase aktivieren und andererseits den Abbau von cAMP durch eine zyklische Nukleotid-Phosphodiesterase fördern. Somit ist es in der Lage, die Kapazitation sowohl positiv als auch negativ zu beeinflussen, worauf widersprüchliche Untersuchungsergebnisse hindeuten.

Während der Kapazitation ergeben sich Veränderungen in der Proteintyrosinphosphorylierung. Der Anstieg der Proteintyrosinphosphorylierung ist von der Anwesenheit von Serumalbumin, Calcium und Bikarbonat im Medium abhängig, und zwar in Mengen, wie sie auch für die Kapazitation benötigt werden.

Wahrscheinlich führt der von BSA mediierte Cholesterolefflux zu einer Veränderung der Fluidität der Plasmamembran, die den Calcium- und/oder Bikarbonationeninflux moduliert. Calcium und/oder Bikarbonat aktivieren die Adenylatzyklase, welche cAMP produziert. cAMP wiederum aktiviert die Proteinkinase A, die die Proteine phosphoryliert.

2.1.1 Methoden der Kapazitation in vitro

2.1.1.1 Spermaaufbereitung

Ejakulierte Spermien sind nicht fähig, mit dem Kumulusoozytenkomplex zu interagieren und die Eizelle zu befruchten. Um das zu erreichen, müssen sie die Kapazitation durchlaufen. Während des Aufenthalts im weiblichen Genitale sind sie jedoch durch einen oder mehrere Dekapazitationsfaktoren aus dem Seminalplasma geschützt (Yanagimachi, 1994). Außerdem enthält das Seminalplasma weitere Faktoren, die sich bei längerer Exposition negativ auf die Hyperaktivierung auswirken (Mortimer et al., 1998). Way et al. (2000) inkubierten Nebenhodenspermien 15 Minuten lang mit und ohne Flüssigkeit der akzessorischen Geschlechtsdrüsen. Anschließend wurden die Spermien 16 Stunden lang mit 10 µg/ml Heparin inkubiert, wobei alle 2 Stunden bei einer Probe die Akrosomenreaktion mit 100 µg/ml Lysophosphatidylcholin ausgelöst wurde. Die Vitalität der Spermien, die mit den Sekreten der akzessorischen Geschlechtsdrüsen inkubiert worden waren, nahm mit der Zeit signifikant gegenüber den unbehandelten Spermien ab. Außerdem wiesen die unbehandelten Spermien signifikant mehr lebende akrosomenreagierte Spermien auf. Die Entfernung des Seminalplasmas ist also eine entscheidende Voraussetzung für die Kapazitation. Im Rahmen der IVF hat dieser Vorgang auch andere wichtige Aufgaben. So können Tiefgefrier-Verdüner, infektiöse Agentien und andere Verunreinigungen entfernt und die lebenden, motilen Spermien ausselektiert werden.

Es gibt vier prinzipielle Ansätze zur Spermaaufbereitung (Mortimer et al., 1998; Rodriguez-Martinez et al., 1997):

- einfache Verdünnung und Waschen (Zentrifugation und Resuspendierung)
- Eigenmigration (Swim up, Transmigration)
- selektive Fraktionierung von Subpopulationen mit Dichtegradienten
- Adhärenzmethoden, um Zelldebris und tote Spermien zu eliminieren (z.B. Glaswolle, Sephadexsäulen)

2.1.1.1.1. Einfache Verdünnung und Waschen

Man kann das Sperma mit großen Mengen von Medium verdünnen und anschließend zentrifugieren, wobei sich die schwereren Spermien auf dem Grund des Zentrifugenröhrchens zu einem Pellet sammeln, während im Überstand ein Großteil des partikulären Materials zurückbleibt. Der Überstand wird abgenommen, das Pellet in frischem Medium resuspendiert und die Zentrifugation gegebenenfalls wiederholt.

Diese Methode ist schnell und einfach, es gehen jedoch bei der wiederholten Zentrifugation und Resuspendierung viele Zellen verloren (Correa und Zavos, 1996). Außerdem werden die Spermien nicht selektiert, tote, immotile und morphologisch abnorme Spermien verbleiben in der Samenprobe (Rodriguez-Martinez et al., 1997).

Die Zentrifugation unselektierter Spermien kann zudem eine irreversible Schädigung der Zellen verursachen, die ihre Befruchtungsfähigkeit vermindern oder sogar ganz zerstören kann, wenn im Ejakulat viele Spermien mit Zytoplasmatröpfchen enthalten sind, da diese morphologisch abnormen Spermien freie Radikale produzieren. Dasselbe trifft für Leukozyten im Ejakulat zu. Freie Radikale verursachen Phospholipid-Peroxidation und setzen somit die Fluidität der Plasmamembran herab, so daß die Funktionsfähigkeit der Spermien behindert ist. Außerdem erzeugen sie Strangbrüche in der spermalen DNS, was die Entwicklung des Embryos beeinträchtigen kann. Daher sollten vor einer Zentrifugation lebende (motile) und morphologisch normale Spermien selektiert werden (Mortimer 2000).

2.1.1.1.2. Swim up

Die Swim up-Technik nutzt die Eigenbeweglichkeit der Spermien als Selektionsmethode. Auch in vivo können nur sehr motile Spermien durch die Flüssigkeiten von Uterus und Ovidukt migrieren (Rodriguez-Martinez et al., 1997).

Parrish et al (1986) modifizierten für das Rind die Methode von Lopata et al. (1976). Sie schichteten je 250 µl der Spermienprobe unter 1 ml TALP-Medium (Tyrode's Albumin-Laktat-Pyruvat-Medium; Medien siehe Anhang und Kapitel 3) in vier 12 x 55 mm-Plastikröhrchen. Nach einer Stunde Inkubation bei 39°C wurden die obersten 850 µl jedes Röhrchens, in die die motilen Spermien aktiv aufgeschwommen waren, abgenommen, in einem Zentrifugenröhrchen gesammelt und bei 200 g 10 Minuten lang zentrifugiert. Das

Pellet wurde in 1 ml TALP-Medium resuspendiert, 5 Minuten bei 22 °C äquilibriert, das Röhrchen mit 3 ml TALP-Medium aufgefüllt und nochmals zentrifugiert. Das Pellet wurde anschließend wieder in TALP-Medium auf eine bestimmte Konzentration resuspendiert. Die Autoren konnten eine signifikante Erhöhung der Befruchtungsraten durch die Spermaaufbereitung mit Swim up feststellen.

Ein Nachteil der Swim up-Methode ist der große Verlust von Spermien. Parrish et al. (1995) erzielten mit der Swim up-Methode eine um das 4,6-fache geringere Wiedergewinnungsrate motiler Spermien als mit der Percoll-Methode (siehe Kapitel 2.1.1.1.4), allerdings war die Penetrationsrate nach Insemination mit Swim up-selektierten Spermien signifikant höher als nach Percoll-Aufbereitung. Dies ließ sich bei einigen Bullen durch eine 5-fache Erhöhung der Konzentration der Percoll-aufbereiteten Spermien ausgleichen. Es bestanden keine Unterschiede bei der Polyspermierate. Die Teilungsrate war bei Swim up zwar signifikant erhöht, bei der Blastozystenrate bestanden jedoch keine Unterschiede mehr (Parrish et al., 1995).

Shamsuddin et al. (1993) modifizierten die Methode von Wikland et al. (1987), indem sie dem Swim up-Medium (Sperm-TALP) 1 mg/ml einer Natriumhyaluronat-Lösung beifügten. Hyaluronsäure ist ein Glykosaminoglykan mit hohem Molekulargewicht, das in hohen Konzentrationen in den viskösen Sekreten des weiblichen Genitaltrakts vorkommt (Mortimer et al., 1990). Spermien besitzen ein hyperphosphoryliertes Hyaluronsäurebindendes Protein, durch das sie mit dem Glykosaminoglykan interagieren können (Ranganathan et al., 1994). Von der Sperm-TALP-Lösung mit Hyaluronsäure werden 0,2 ml über das Sperma geschichtet und mit 0,4 ml Fert-TALP-Medium überschichtet. Die Spermien schwimmen durch die Hyaluronsäureschicht in das Fertilisationsmedium auf und können ohne weiteren Waschschrift verwendet werden, da das Seminalplasma zurückbleibt und die Dekapazitationsfaktoren während der Migration durch die Hyaluronsäureschicht abgelöst werden. Die so gewonnenen Spermien sind signifikant motiler und ihre Oberfläche ist sauberer im Vergleich zu Spermien, die mit „normalem“ Swim up gewonnen werden. Der Anteil akrosomenintakter Spermien mit intakter Plasmamembran ist signifikant höher als vor der Behandlung. Bei der Befruchtungsrates bestand kein Unterschied zwischen den beiden Methoden, die Teilungsrate war jedoch beim Medium mit Hyaluronsäure bei einem Bullen signifikant höher. Da wiederholte Zentrifugation und Resuspension vermieden werden, werden die Spermien weniger traumatischen Einflüssen ausgesetzt, es gehen weniger Spermien verloren und man spart Zeit. Die Unterschiede

bezüglich der Spermienqualität verschiedener Bullen wurden durch die Aufbereitung mit Swim up durch Hyaluronsäure ausgeglichen (Shamsuddin und Rodriguez-Martinez, 1994).

2.1.1.1.3. Transmigration

Beim Transmigrationsverfahren wandern Spermien aufgrund chemischer und rheotaktischer Stimulation unter Beibehaltung ihrer Vitalität in ein Kapazitationsmedium. Dadurch wird eine Anreicherung progressiv motiler Spermien erreicht (Rosenkranz et al., 1994).

Holzman (1987) entwickelte ein Transmigrationsgerät mit Zweikammersystem. Im Wesentlichen wird ein Röhrchen, dessen Boden aus einer Membran mit 8 µm großen Poren besteht (Probenkammer), mit Nativsamen, der zu gleichen Teilen mit isotoner Kochsalzlösung verdünnt wird, beschickt, und diese Membran auf die Oberfläche des TALP-Mediums in einem zweiten Röhrchen (Zielkammer) gesetzt, so daß sie Kontakt mit der Flüssigkeit bekommt. Das System ist an eine Perfusionspumpe angeschlossen, die die Pufferlösung mit einer Geschwindigkeit von 5 ml/h durch die Membran aus der Zielkammer in die Probenkammer pumpt und so einen Gegenstrom erzeugt. Werden vitale Spermien einer Strömung ausgesetzt, erfolgt eine Bewegungsrichtung gegen den Strom. Die motilen Spermien wandern aktiv durch die Membran und können nach 5 Minuten Inkubation aus der Zielkammer gewonnen werden.

Holzmann fand eine signifikante positive Korrelation zwischen Transmigrationsrate und dem Anteil vorwärtsbeweglicher Spermien sowie dem Anteil lebender Spermien und eine negative Korrelation von Transmigrationsrate und morphologischen Anomalien.

Spermien, die mittels Transmigration aus einem Ejakulat gewonnen werden, benötigen keine Zusätze wie Heparin, Hypotaurin oder Adrenalin, um die Kapazitation zu fördern und die Motilität zu steigern (Rosenkranz und Holzmann, 1992). Die Autoren vermuten, daß durch den Gegenstrom des Mediums Glykoproteine von der Plasmamembran der Spermien abgestriphen werden, wodurch die Kapazitationsdauer im Gegensatz zu anderen in vitro Systemen reduziert wird.

Beim Vergleich zwischen Transmigration und Swim up war die Fertilisationsrate beim Transmigrationsverfahren geringfügig höher als bei der Swim up-Methode (Auer, 1980; Rosenkranz et al., 1994). Dies beruhte hauptsächlich auf der geringeren Polyspermierate,

die auch Schneeweiss (1994) beobachtete. Mit dem Transmigrationsverfahren aufbereitete Spermien penetrierten in vitro gereifte Eizellen signifikant schneller als mit Swim up selektierte Spermien (Rosenkranz und Holzmann, 1997). Darin vermuteten die Autoren auch den Grund für die höheren Polyspermieraten bei mit Swim up aufbereiteten Spermien, da die Eizellen zu dem Zeitpunkt, da diese beginnen zu penetrieren, wesentlich älter sind, und gealterte Eizellen einem größeren Polyspermierisiko unterliegen (siehe Kapitel 2.3.2). Bei der in vitro Kultur der Zygoten zeigte sich beim Transmigrationsverfahren eine ab dem Zweizellstadium verzögerte Entwicklung gegenüber dem Swim up. Die Autoren führten dies darauf zurück, daß durch die stärkere Hyperaktivierung der Spermien nach Transmigration die Kumuluszellen schneller dispergiert werden und sich deshalb der für die Kokultur wichtige Monolayer nicht bilden konnte (Rosenkranz et al., 1992). Bei Befruchtungs- und Gesamtteilungsraten bestand jedoch kein statistischer Unterschied (Rosenkranz et al., 1992; Schneeweiss, 1994).

Die Vorteile dieses halbautomatischen Systems bestehen im Bedienungskomfort und dem geringeren Zeitaufwand aufgrund weniger Arbeitsschritte, wodurch das Verfahren auch weniger fehleranfällig ist (Rosenkranz et al., 1994).

2.1.1.1.4. Percoll

Percoll[®] (= Pertoft's Colloid) ist ein Dichtegradientenmedium, das aus kolloidalen Siliziumdioxidpartikeln mit einem Durchmesser von 15 – 30 nm besteht, die mit Polyvinylpyrrolidon (PVP) beschichtet sind. Es wird für die Reinigung von Zellen, Viren oder Organellen verwendet. Percoll wird als absolut untoxisch für Zellen angesehen und soll kein freies PVP enthalten (Avery und Greve, 1995). Vorteilhaft ist, daß es keinen osmotischen Effekt ausübt, da es eine mineralische Substanz ist. Auch kann man damit Medien mit hoher spezifischer Dichte herstellen, die zur Trennung von Spermien notwendig sind. Drittens besitzt es niedrige Viskosität, da es ein Kolloid anstelle einer Lösung ist, und daher nicht die Sedimentation der Spermien behindert (Mortimer, 2000).

Bei der Zentrifugation mit Percoll sollen sich die lebenden Spermien am Grunde des Zentrifugationsröhrchens in einem Pellet sammeln, und tote Spermien, Seminalplasma, Verdünner und Zelldebris auf der Oberfläche, bzw. je nach ihrer Dichte an verschiedenen Stellen in den Percoll-Schichten, zurückbleiben.

Es gibt verschiedene Methoden der Percoll-Zentrifugation. Man kann Percoll einer bestimmten Dichte zentrifugieren, wodurch man aufgrund der großen Variation in der Partikelgröße einen kontinuierlich steigenden Dichtegradienten erhält (Pertoft et al., 1978), oder man verwendet mehrere Lagen Percoll, die eine unterschiedliche Dichte aufweisen (diskontinuierlicher Gradient) (Berger et al., 1985). Letztere ist die in der bovinen IVF am häufigsten verwendete Methode (Rodriguez-Martinez et al., 1997).

Es wurden sehr viele Variationen bezüglich der Anzahl, des Volumens und der Dichte der einzelnen Schichten im Hinblick auf ihre Auswirkung auf Kapazitation und Befruchtung untersucht. Je dichter das Percoll ist, desto sauberer werden die Spermien und desto mehr lebende, morphologisch normale Zellen können gewonnen werden. Dieser Effekt wurde beim Menschen anhand der Penetration zonafreier Hamstereizellen nachgewiesen (Forster et al., 1983).

Gorus (1981) beobachtete, daß immotile humane Spermien bereits in einem Dichtebereich von 1,06 bis 1,09 hängenbleiben. Motile Zellen penetrieren in dichtere Regionen aufgrund ihrer Eigenmotilität. Je nach Zentrifugationsdauer können motile Spermien weiter in den Dichtegradienten eindringen (Gorus und Pipeleers, 1981). Bei der diskontinuierlichen Zentrifugation sind 55 % und 90 % Percoll häufig verwendete Gradienten (Avery und Greve, 1995). Sehr gut bewährt haben sich jedoch auch 2 Lagen von je 0,5 ml 90 %igem bzw. 75 %igem Percoll (Ruiz-Romero et al., 1995).

Durch Veränderung der Dichte der einzelnen Schichten oder der Zentrifugationsgeschwindigkeit und -dauer kann die Ausbeute modifiziert werden. Wird die Dichte verringert, wird zwar die Ausbeute größer, jedoch nur deshalb, weil dann auch mehr Spermien mit morphologischen Anomalien bis auf den Grund penetrieren. Änderungen der Zentrifugationsparameter von 20 Minuten bei 300 g erbrachten bei humanen Spermien keine wesentlichen Vorteile (Mortimer, 2000).

Nach der Gewinnung des Pellets sollten die Spermien mindestens einmal, besser zweimal gewaschen werden, um alle Spuren von Percoll aus der Suspension zu entfernen. In Versuchen hatte sich gezeigt, daß Percoll in Konzentrationen ab 50 % signifikant die Befruchtungsraten verschlechtert (Keefer und Paprocki, 1995) und ungebundenes PVP die Spermienmotilität verringert (Hammerstedt et al., 1988).

Correa und Zavos (1996) konnten keine Unterschiede bezüglich des Anteils motiler Spermien, dem Grad der Motilität, dem Anteil geschwollener Spermien nach HOS-Test und der Anzahl wiedergewonnener Spermien zwischen mit Swim up und mit Percoll aufbereitetem Sperma beobachten. Bei Parrish et al. (1995) dagegen lag die Wiedergewinnungsrate der Spermien nach Percoll signifikant über der nach Swim up (siehe Kapitel 2.1.1.1.2). Somfai et al. (2002) erzielten mit der Percoll-Methode einen signifikant höheren Anteil an lebenden Spermien mit intaktem Akrosom als mit dem Swim up-Verfahren. Die Gesamtspermienkonzentration war ebenfalls höher. Morales et al. (1991) stellten fest, daß mit Percoll mehr Spermien zurückgewonnen wurden, fanden jedoch keine offensichtlichen Unterschiede bei der Spermienfunktion (Penetration zonafreier Hamstereizellen, induzierbare Akrosomenreaktion, Zona pellucida-Bindung) zwischen Percoll und Swim up. Spermientrennung mittels Percoll ist eine einfach durchzuführende Methode und resultiert in motilen und sauberen Spermienfraktionen.

2.1.1.1.5. Adhärenz-Methoden

Diese Techniken stützen sich auf die Tendenz von toten oder beschädigten Spermien, sich an Glasoberflächen anzuheften (Stubbings und Wosik, 1991) oder in der Filtermatrix hydrierter Polysaccharidketten (Sephadex: Correa und Zavos, 1996) zurückgehalten zu werden. Die Oberflächenstruktur der Spermien bestimmt, ob die Zellen abgefangen werden, daher wandern normale Spermien leichter durch einen Glasfilter als abnorme, z.B. tote oder akrosombeschädigte (Crabo et al., 1992; Tibary et al., 1992). Graham und Graham (1990) waren durch Filtration mit Sephadex G-15 in der Lage, morphologisch abnorme und immotile Bullenspermien aus dem Ejakulat zu entfernen und konnten damit die Non-Return-Raten nach Künstlicher Besamung verbessern. Außerdem kann die Vitalität nach dem Auftauen von Tiefgefrier(TG)-Sperma erhöht werden, wenn das Ejakulat vor dem Einfrieren mit Sephadex-Filtration selektiert worden war (Anzar und Graham, 1995).

2.1.1.2 Kokultur von Spermien mit Eileiterzellen

Im Eileiter finden die endgültige Reifung der Gameten, die Befruchtung und die frühe Embryonalentwicklung statt. Da beim Rind die Zeitdauer zwischen dem Einsetzen des Östrus und der Ovulation ca. 30 Stunden beträgt, müssen die Spermien dieses Intervall ohne Verlust ihrer Befruchtungsfähigkeit überbrücken können. Den Großteil dieser Zeitspanne (18-20 Stunden) verbringen sie an die Epithelzellen im Isthmus der Eileiterampulle gebunden (Hunter und Wilmut, 1984). Die Mukosa des Eileiters besteht aus einem einschichtigen Säulenepithel mit sekretorischen Zellen und Zilienzellen. Die sekretorischen Zellen besitzen lange Mikrovilli und setzen ihre Produkte durch Exozytose frei. Die Höhe dieser Zellen und ihre Sekretionsmenge variieren mit dem Zyklusstand, beide sind im Östrus am höchsten. Die Zilienzellen halten eine auf den Uterus gerichtete Strömung aufrecht (Ellington, 1991).

Zum Zeitpunkt der Ovulation wird eine kleine Anzahl morphologisch normaler, motiler und kapazitierter Spermien freigesetzt und von den Mikrovilli der Epithelzellen zur Eizelle weitertransportiert (Hunter et al., 1991). Da die Spermien nur 4 bis 5 Stunden benötigen, um zu kapazitieren, und die Kapazitation die Lebensdauer herabsetzt, muß sie mit der Ovulation abgestimmt werden (Hunter, 1987). Es liegt also nahe, daß der Kontakt mit den Eileiterepithelzellen und deren Sekretionen zur Erhaltung der Lebensfähigkeit und der Erlangung der Befruchtungsfähigkeit (Kapazitation) der Spermien beitragen.

Es gibt mehrere Berichte über die Kokultur von Spermien mit bovinen Eileiterepithelzellen zur Kapazitation von Bullenspermien *in vitro*. Ellington et al. (1991) stellten durch Untersuchungen mit dem Elektronenmikroskop fest, daß Bullenspermien *in vitro* in ähnlicher Weise mit bovinen Eileiterepithelzellen interagieren wie *in vivo*, und daß Kokultursysteme somit ein gutes Modell darstellen, um die Veränderungen während der Kapazitation, die durch diese Interaktion verursacht werden, *in vitro* zu untersuchen.

Guyader und Chupin (1991) untersuchten die Kapazitation boviner Spermien durch Koinkubation mit Monolayern aus bovinen Eileiterepithelzellen anhand der Induzierbarkeit der Akrosomenreaktion mittels Lysophosphatidylcholin und der Fähigkeit der Spermien, bovine Eizellen *in vitro* zu befruchten, und stellten fest, daß diese Kokultur eine effiziente *in vitro* Kapazitationsmethode darstellt, die den Vorgängen *in vivo* sehr ähnelt.

Untersuchungen von Ellington et al. (1993) ergaben, daß der direkte physische Kontakt von Spermien zu bovinen Eileiterepithelzellen letztere zu Synthese und Sekretion einer neuen Klasse von Polypeptiden anregte. Dies geschah allerdings in geringerem Ausmaß auch, wenn die Spermien durch eine semipermeable Membran von den Epithelzellen getrennt waren. Die Autoren nahmen an, daß diese Proteine eher zur Synchronisation der Kapazitation mit dem Zeitpunkt der Befruchtung dienen könnten, als zur Kapazitation selbst.

Die Anheftung von Spermien an bovine Eileiterepithelzellen hält die Lebens- und die Befruchtungsfähigkeit der Spermien aufrecht und induziert die sog. Hypermotilität (Pollard et al., 1991). Die gebundene Spermienpopulation hatte intakte Akrosomen und blieb über längere Zeit hinweg motil, wahrscheinlich aufgrund eines Aufschubs der Kapazitation. Daher könnten die von den bovinen Eileiterepithelzellen sezernierten Substanzen die Motilität aufrechterhalten, indem sie die Membran stabilisieren und somit die Kapazitation verzögern (Ijaz et al, 1994).

Zu ähnlichen Ergebnissen kamen auch Chian und Sirard (1995). Sie entdeckten, daß bovine Eileiterepithelzellen aus dem Isthmus die Motilität aufrecht erhalten. Sie nahmen an, daß die physische Bindung die metabolische Aktivität der Spermien aktiviert und Motilitäts-fördernde Faktoren von den bovinen Eileiterepithelzellen sezerniert werden. Außerdem könnte eine Stabilisierung der Spermienmembran und somit eine Verzögerung der Kapazitation die Motilität verlängern. Die Autoren stellten die Hypothese auf, daß der Isthmus als Spermidepot und als Filter dient, der die Anzahl der Spermien am Ort der Befruchtung reduziert und deren Qualität erhöht. Die Reduzierung der Spermienzahl ist auch notwendig, um die Inzidenz der Polyspermie zu senken.

2.1.1.3 Biologische Flüssigkeiten

Wie in Kapitel 2.1.1.2 bereits angesprochen, geschieht die Kapazitation in vivo in einer Umgebung, in der die Spermien sowohl mit Zelloberflächen als auch mit Flüssigkeiten interagieren (Ellington et al., 1991). Bei diesen Flüssigkeiten handelt es sich um Eileiter- und Follikelflüssigkeit.

2.1.1.3.1. Eileiterflüssigkeit

Die Eileiterflüssigkeit ist ein Produkt aus selektivem Serumtranssudat und aktiver Sekretion der Epithelzellen (Leese, 1988). Die Sekretionen der bovinen Eileiterepithelzellen variieren mit dem Zyklus unter dem Einfluß von Hormonen (Jansen, 1984; Chian et al., 1995a; Boquest und Summers, 1999; Killian et al., 1989; LaPointe et al., 1995), sie sind mengenmäßig am höchsten um die Zeit des Östrus (Malayer et al., 1988; Chian et al., 1995a; Boice et al., 1990; Grippo et al., 1992). Zum Zeitpunkt der Ovulation wird ein Eileiter-spezifisches Glykoprotein sezerniert. (Gerena und Killian, 1990; Boice et al., 1990; Wegner und Killian, 1992) Daher liegt es nahe, daß die Auswirkungen der Eileiterflüssigkeit auf die Spermien ebenfalls variabel sind.

Tatsächlich haben mehrere Studien ergeben, daß die Eileiterflüssigkeit im Östrus zur Auslösung der Kapazitation am potentesten ist. (Parrish et al., 1989b; McNutt und Killian, 1991; Abe et al., 1995)

Außerdem variieren die Auswirkungen der Eileiterflüssigkeit mit der Region im Eileiter. Grippo et al. (1995) haben festgestellt, daß Eileiterflüssigkeit aus dem Isthmus die Motilität herabsetzen kann. Dies könnte dazu dienen, die Spermien im Spermienreservoir festzuhalten. Eileiterflüssigkeit aus der Ampulle dagegen stimuliert die Motilität und fördert so die hyperaktive Bewegung, die nötig ist, um zur Eizelle zu gelangen und sie zu penetrieren. Die höchste Fertilisationsrate wurde mit Eileiterflüssigkeit aus der Ampulle zum Zeitpunkt des Östrus erreicht (Grippo et al., 1995).

2.1.1.3.2. Follikelflüssigkeit

Zum Zeitpunkt der Ovulation können Komponenten aus der Follikelflüssigkeit direkt oder mit dem Kumulusoozytenkomplex assoziiert in den Eileiter gelangen. Somit hat auch die Follikelflüssigkeit die Möglichkeit, auf die Spermien einzuwirken (McNutt und Killian, 1991).

Tatsächlich haben Versuche gezeigt, daß Follikelflüssigkeit Spermien schneller kapazitiert als Eileiterflüssigkeit und in höheren Konzentrationen sogar die Akrosomenreaktion auslöst (McNutt und Killian, 1991).

Die Natur des kapazitierenden Faktors in Eileiter- bzw. Follikelflüssigkeit ist noch nicht vollständig geklärt. Wahrscheinlich optimiert eine Kombination von Faktoren im Eileiter die Vorbereitung der Spermien auf die Befruchtung. Parrish et al. (1989b) fanden einen Kapazitationsfaktor, der ähnliche physiologische und chemische Eigenschaften aufwies wie Heparin. Sie vermuteten, es handle sich dabei um Heparansulfat, entweder als freies Glykosaminoglykan oder als Proteoglykan an einen Proteinkern gebunden. Auch Anderson und Killian (1994) assoziierten den Kapazitationseffekt mit Glykosaminoglykanen und Proteoglykanen.

Man hat in der Eileiterflüssigkeit aus dem Isthmus während des Östrus höhere Calcium-Konzentrationen gefunden als während des Nicht-Östrus oder in der Ampulle während des Östrus (Grippe et al., 1992). Ebenso wurden erhöhte Konzentrationen von Lysophosphatidylcholin in der Eileiterflüssigkeit aus der Ampulle während des Östrus gefunden (Killian et al., 1989; Grippe et al., 1994). Dieses fusogene Lysophospholipid und die erhöhte Calcium-Konzentration könnten die Anzahl der akrosomenreagierten Spermien bei der Befruchtung maximieren.

Das sog. „oviduktspezifische Östrus-assoziierte Protein“ kommt in der Eileiterflüssigkeit hauptsächlich während des Östrus vor (Gerena und Killian, 1990; McNutt et al, 1992) und zwar in einer höheren Konzentration in der Ampulle als im Isthmus (Wegner und Killian, 1992). Es verbindet sich mit der Spermienmembran und stimuliert die Kapazitation und Fertilisation boviner Spermien (King et al, 1994).

Albumin und High Density Lipoproteine sind im Östrus erhöht. Dies sind sehr potente Akzeptoren von Cholesterol. Der Cholesterol-Efflux könnte die Plasmamembran der

Spermien destabilisieren und so für die Kapazitation vorbereiten (Ehrenwald et al., 1990; Thérien et al., 2001).

2.1.1.4 Chemisch definierte Medien

Da Eileiter- und Follikelflüssigkeit in ihrer Zusammensetzung je nach Tier und Zyklusstand differieren (siehe Kapitel 2.1.1.3) und die Ergebnisse daher nicht vergleichbar waren, bemühte man sich darum, Medien zu entwickeln, die zum größten Teil oder sogar vollständig chemisch definiert sind.

Brackett und Oliphant (1975) kapazitierten Kaninchenspermien, indem sie die Osmolalität des von ihnen entwickelten definierten Mediums (Brackett und Oliphant-Medium, BO-Medium) durch Zugabe von NaCl auf 380 mOsmol (HIS-Medium, high ionic strength) erhöhten. Nach 15 Minuten Inkubation fertilisierten die Spermien bis zu 72 % der Eizellen.

1980 wandten Brackett et al. diese Methode (Inkubationsdauer in HIS-Medium 5 Minuten) beim Rind an. Die Spermien waren in der Lage, Eizellen zu penetrieren und einige Embryonen entwickelten sich bis zum 4-Zell-Stadium.

1982 gelang es Brackett et al., das erste aus einer in vitro befruchteten Eizelle entstandene Kalb zu erschaffen. Die Spermien wurden 45 Minuten bis 5 Stunden lang in BO-Medium (+ 100 µg/ml Streptomycinsulfat), dem 43 mg NaCl pro 100 ml zugesetzt wurden, um eine Osmolalität von ca. 380 mOsmol/kg zu erhalten, inkubiert. Damit wurden Fertilisationsraten von bis zu 62,9 % erreicht. 15 % der Eizellen teilten sich (Brackett et al., 1982a).

Andererseits penetrierten Kaninchenspermien, die in isomolarem Medium inkubiert wurden, genauso viele Eizellen wie Spermien, die erhöhter Osmolalität ausgesetzt waren (Brackett und Oliphant, 1975). Bondioli und Wright (1983) kamen beim Rind zu ähnlichen Resultaten. Daraus schlossen die Autoren, daß die Veränderungen, die während der Kapazitation in diesem Medium stattfinden, nicht mit der erhöhten Osmolarität zusammenhängen.

Iritani et al. (1984) versuchten, ein isotones chemisch definiertes Medium zur Kapazitation von Rinderspermien zu finden. Sie verwendeten dazu eine modifizierte Krebs-Ringer-Bikarbonat-Lösung (nach Toyoda und Chang, 1974) mit einer Osmolarität von 290

mOsmol/kg. Die höchsten Fertilisationsraten (58 %) wurden erreicht, wenn die Spermien 8 Stunden vorinkubiert wurden.

Bei der Untersuchung der Auswirkung des pH-Wertes von Medien auf die Kapazitation, fand Cheng (1985) heraus, daß ejakulierte Bullenspermien, die dreimal in BSA-Salzlösung bei pH 7,2 gewaschen, und bei 37°C für 6 bis 9 Stunden in Tyrode's Medium bei pH 8,5 inkubiert worden waren, kapazitiert wurden. Behnke (1987) entdeckte, daß die kapazitierende Eigenschaft des Calcium-freien Tyrode's noch beschleunigt wird, wenn man den pH der BSA-Salzlösung auf 8,5 erhöhte. Ijaz und Hunter (1989a) testeten verschiedene pH-Werte von BSA-Salzlösung und Calcium-freien Tyrode's Medium, um die optimale Kombination für die Kapazitation der Spermien, ermessen an der Fähigkeit, zonafreie Hamstereizellen zu penetrieren, zu ermitteln. Die Waschung der Spermien in BSA-Salzlösung mit pH 7,6, gefolgt von einer 4- bis 8-stündigen Inkubation in Calcium-freiem Tyrode's Medium mit pH 7,6 ergab hervorragende Ergebnisse bezüglich Motilität, akrosomaler Integrität und Kapazitation. Mit derselben Methode der Kapazitation wurde bei bovinen zonaintakten Eizellen eine Penetrationsrate von 82,5 % erzielt (Ijaz und Hunter, 1989b). Daher kamen die Autoren zu dem Schluß, daß diese Technik eine effektive Methode für die Kapazitierung boviner Spermien in der IVF ist.

Ijaz und Hunter (1989c) entwickelten auch ein Kapazitationssystem für bovine Spermien, das die Lagerung des Samens für 4 bis 48 Stunden in einem TEST-yolk-Puffer beinhaltet. Nachdem sie die Eignung des Systems für die Kapazitation anhand der Fähigkeit der Spermien, zonafreie Hamstereizellen zu penetrieren, bewiesen hatten, untermauerten sie seine Effektivität durch die Fertilisation zonaintakter Rindereizellen (Ijaz und Hunter, 1992). Spermien, die 8 Stunden in TEST-yolk-Puffer inkubiert und anschließend mit BSA-Salzlösung gewaschen worden waren, fertilisierten 87,2 % der gereiften Eizellen.

Iqbal und Hunter (1995a) verglichen die Effizienz verschiedener Kapazitationssysteme anhand der Penetrationsraten zonafreier Hamstereizellen und zonaintakter Rindereizellen. Sie präinkubierten ejakuliertes Sperma in Calcium-freiem Tyrode's Medium (Ijaz und Hunter, 1989a), modifiziertem Tyrode's Medium mit boviner Follikelflüssigkeit (Ayoub und Hunter, 1993), modifiziertem Tyrode's Medium mit Heparin (Parrish et al., 1988) und TEST (Ijaz und Hunter, 1989c). Beim Test mit zonafreien Hamstereizellen führte Calcium-freies Tyrode's Medium zu der höchsten Penetrationsrate. Beim Versuch mit zonaintakten Rindereizellen war dagegen die Inkubation in modifiziertem Tyrode's Medium mit Heparin am effektivsten. Als Ursache dafür vermuteten die Autoren, daß die Kopf-an-

Kopf-Agglutinationen, die sich durch Heparin ergeben, durch einen Stimulus des Kumulus gelöst werden.

Die Autoren bezweifelten den Wert des Penetrationstests mit zonafreien Hamstereizellen. Auch Ijaz und Hunter (1992) waren der Meinung, dieser Test würde den Grad der Kapazitation unterschätzen, da mit TEST-yolk kapazitierte Spermien mehr zonaintakte Rindereizellen als zonafreie Hamstereizellen penetrierten. Brackett et al. (1982b) berichteten, daß die Spermien eines Bullen in ihrem Versuch zwar zonafreie Hamstereizellen penetrieren konnten, aber nicht in der Lage waren, zonaintakte Rindereizellen zu fertilisieren. Beim Penetrationstest mit zonaintakten Rindereizellen werden höhere Anforderungen an die Spermien gestellt, da sie nicht lediglich mit dem Vitellus fusionieren, sondern den Kumulus und die Zona pellucida penetrieren müssen (Iqbal und Hunter, 1995a). Außerdem handelt es sich beim Penetrationstest mit zonafreien Hamstereizellen um Gameten unterschiedlicher Spezies, somit ist die Interpretation dieser Tests schwierig (Henault et al., 1992). Aufgrund dieser Überlegungen kamen Iqbal und Hunter zu dem Schluß, daß die Präinkubation in modifiziertem Tyrode's Medium mit Heparin nach Parrish et al. (1988) die beste Methode für die Kapazitation boviner Spermien in vitro ist (Iqbal und Hunter, 1995a).

Anfang der achtziger Jahre begannen Untersuchungen über kapazitierende Zusätze. Erste Versuche zeigten, daß Bullenspermien, die mit Heparin inkubiert wurden, die Akrosomenreaktion durchlaufen (Handrow et al., 1982; Parrish et al., 1985) und einen höheren Anteil boviner Eizellen fertilisieren als Spermien, die ohne Heparin inkubiert wurden (Parrish et al., 1985, 1986). Wegen der langen Koinkubationszeiten mit den Eizellen (18 – 24 h) war jedoch nicht klar, ob der Effekt des Heparins die Akrosomenreaktion oder die Kapazitation betraf. Die Inkubation ejakulierter Spermien mit Heparin vor der Zugabe zu den Eizellen mußte mindestens vier Stunden dauern, um die Penetrationsraten zu erhöhen (Parrish et al., 1988). Auch die Fähigkeit der Spermien, nach Zugabe von 100 µg/ml Lysophosphatidylcholin (LPC, siehe Kapitel 2.2.1.2) die Akrosomenreaktion zu durchlaufen, erforderte eine vorherige vierstündige Inkubation mit Heparin. Der Haupteffekt von Heparin trat also während der ursprünglichen Spermieninkubation auf und scheint die Kapazitation zu beinhalten (Parrish et al., 1988). Die beste Reaktion der Spermien war bei 5 – 10 µg/ml Heparin zu beobachten. Fukui et al. (1990) erzielten die besten Fertilisationsraten von TG-Sperma mit Konzentrationen von 25 – 100 µg/ml Heparin und Inkubationszeiten von 5 – 45 Minuten.

Heparin ist ein Glykosaminoglykan, das aus sich wiederholenden Disaccharidpolymeren, die an einen Proteinkern gebunden sind, besteht. Heparin ist das am meisten sulfatierte Glykosaminoglykan. Um die Spermien kapazitieren zu können, muß Heparin zuerst an sie gebunden werden (Parrish et al., 1988a). Die Kapazitation ist abhängig von der Heparindosis und von der Inkubationsdauer (Parrish et al., 1988b). Zur Unterstützung der Kapazitation mit Heparin muß das Kulturmedium Bikarbonat (Parrish et al., 1989a) und Calcium (Handrow et al., 1989) enthalten und einen pH von 7,0 oder höher haben (Parrish et al., 1989a). Während der Heparin-induzierten Kapazitation kommt es zu vermehrter Calcium-Aufnahme (Handrow et al., 1989), einer Erhöhung des freien intrazellulären Calciums (Parrish et al., 1993), einem Anstieg des intrazellulären pH (Parrish et al., 1989a; Parrish et al., 1993) und einer Zunahme des intrazellulären cAMP (Parrish et al., 1994). Substanzen wie Glukose, Fruktose oder Mannose inhibieren die Kapazitation boviner Spermien durch Heparin (Parrish et al., 1989a; Parrish et al., 1985), da Glukose den Anstieg des intrazellulären Calciums (Handrow et al., 1989), des pH (Parrish et al., 1989a) und des cAMP (Parrish et al., 1994) inhibiert. Die Zugabe von 8-bromo-cAMP oder den Phosphodiesterase-Inhibitoren Koffein und Isobuthylmethylxanthin hebt die Blockade der Heparin-induzierte Kapazitation durch Glykolyse auf (Parrish et al., 1994; Handrow et al., 1989).

Oghoda et al. (1988) beobachteten in einem modifizierten BO-Medium mit 10 mg/ml BSA und 5 mM Koffein Penetrationsraten von 32 %. In einem weiteren Versuch mit demselben Medium, dem aber statt Koffein 10 µg/ml Heparin zugesetzt wurden, erlangten Niwa und Oghoda (1988) 35 % Penetration. Enthielt das Medium Heparin und Koffein, erreichten die Penetrationsraten hingegen 68 %, woraus die Autoren auf eine synergistische Aktion der beiden Zusätze schlossen. Park et al. (1989) erzielten mit dem letztgenannten Medium ebenfalls signifikant höhere Penetrationsraten als mit dem Medium ohne Zusätze.

Kreysing et al. (1997) verglichen die IVF-Ergebnisse zweier Fertilisationssysteme, die auf Brackett und Oliphant-Medium (mit 10 mg/ml BSA, 0,1 IE/ml Heparin und 5 mM Koffein) bzw. auf TALP-Medium (Fert-TALP mit 20 µM Penicillamin, 10 µM Hypotaurin, 1 µM Epinephrin und 0,1 IE/ml Heparin) basierten. Sie stellten fest, daß in dem BO-System signifikant höhere Penetrations- und Polyspermieraten auftraten, während das TALP-System signifikant höhere Teilungs- und Blastozystenraten erzielte.

Tajik et al. (1993) untersuchten die Auswirkung verschiedener Proteinsupplemente (Bovines Serumalbumin (BSA), fetales Kälberserum und Kälberserum) im

Fertilisationsmedium (modifiziertes BO-Medium mit 5 mM Koffein und 10 µg/ml Heparin) auf die Penetration von Eizellen mit und ohne Kumuluszellen. Bei den kumulusintakten Eizellen konnten sie kaum Unterschiede bei der Fertilisationsrate zwischen dem Medium ohne Proteinzusatz und den Medien mit den verschiedenen Zusätzen in unterschiedlichen Konzentrationen feststellen. Nur in dem Medium mit 20 % Kälberserum sank die Penetrationsrate drastisch ab. Dagegen wurden fast keine denudierten Eizellen im Medium ohne Proteinzusatz penetriert. Die Autoren schlossen daraus, daß Proteinsupplementation nur dann essentiell ist, wenn die Kumuluszellen fehlen.

Im Hinblick auf das Ziel vollständig chemisch definierter Medien verwendeten Tajik et al. (1994) modifiziertes BO-Medium mit 5 mM Koffein und 10 µg/ml Heparin, das statt BSA Polyvinylalkohol (PVA) enthielt. Ohne den Zusatz von PVA waren die Spermien nicht in der Lage, die denudierten Eizellen zu penetrieren, wodurch betont wird, daß die Fertilisation kumulusfreier Eizellen die Unterstützung einer makromolekularen Komponente benötigt. Im Medium mit PVA stieg die Penetrationsrate jedoch signifikant, wobei sich 1 mg/ml als ausreichend erwies. Mit einer Spermienkonzentration von 10 Mio Spermien/ml und dem Zusatz von 46 mM Bikarbonat erreichten die Autoren 70 % Penetration, 94 % Vorkernbildung und 20 % Blastozysten. Dieser Versuch zeigte als erster, daß die Proteinsupplementation in einem Fertilisationsmedium, dem Heparin und Koffein zugesetzt sind, für die in vitro Penetration von in vitro gereiften, denudierten Eizellen nicht notwendig ist, sofern das Medium PVA enthält. Die Induktion der Kapazitation und die Penetration von in vitro gereiften, kumulusfreien Eizellen in einem chemisch definierten, proteinfreien Medium sind also möglich (Tajik et al., 1994).

Um für jeden Schritt der Embryoproduktion vollständig definierte Medien zu benutzen, verwendeten Keskinetepe et al. (1995) modifiziertes BO-Medium mit 5 mM Koffein und 200 µg/ml Heparin, dem entweder 6 mg/ml BSA oder 6 mg/ml PVA zugesetzt waren. Obwohl die Ergebnisse mit BSA signifikant besser ausfielen, wurden mit PVA immerhin bis zu 30 % Teilungsraten, 18 % Blastozysten und etwa 10 % expandierte Blastozysten erzielt.

In einem weiteren Versuch wurden verschiedene Konzentrationen von PVA (0 bis 6 mg/ml) und D-Penicillamin (0 bis 4 mg/ml) getestet (Keskinetepe und Brackett, 1996). Die besten Resultate (Teilungsrate 85 %, Blastozysten 39 % und expandierte Blastozysten 34 %) wurden erzielt, wenn das Fertilisationsmedium (BO-Medium mit 5 mM Koffein und

200 µg/ml Heparin) 0,5 mg/ml D-Penicillamin, 1 mg/ml PVA und nicht mehr als 10 mM Hepes enthielt.

Pavlok et al. (2001) untersuchten die Auswirkung von verschiedenen Komponenten, die die Kapazitation und die Fertilisation stimulieren. Sie verglichen die Befruchtungs- und Polyspermieraten und die Kinetik der Vorkernbildung in einem modifizierten BO-Medium, das als makromolekulare Komponente entweder Bovines Serum (BOS) oder Polyvinylalkohol (PVA) enthielt, mit oder ohne Glukosezusatz, und das mit Heparin, Koffein oder D-Penicillamin supplementiert war. Im ersten Versuch wurden die mittels Swim up aufbereiteten Spermien unverzüglich in das Fertilisationsmedium mit den oben genannten Kombinationen zu den Eizellen gegeben und 8 Stunden inkubiert. Dabei erzielte das mit BOS, Glukose und Heparin supplementierte Medium die höchste Fertilisationsrate und die höchste Vorkernrate. Wurde BOS durch PVA oder Heparin durch Koffein ersetzt, sanken die Fertilisationsraten und die Bildung der Vorkerne verzögerte sich. Im Vergleich zu Medien mit PVA waren die Fertilisationsraten in Medien mit BOS bei fast allen Kombinationen signifikant höher. Der positive Effekt von Glukose war in den Medien mit PVA am deutlichsten. In den Medien mit BOS und Heparin oder Koffein entstanden die höchsten Polyspermieraten. D-Penicillamin erwies sich nicht als Kapazitationstimulierend, verlängerte jedoch in einem zweiten Versuch, bei dem die Spermien zuerst 5 Stunden allein und anschließend 12 Stunden mit den Eizellen inkubiert wurden, deren fertile Lebensspanne signifikant, so daß die Fertilisationsraten in Medien mit D-Penicillamin höher waren als in Medien ohne. Auch bei diesem Versuch resultierte der Zusatz von BOS in signifikant höheren Fertilisations- und Polyspermieraten als PVA.

Da Heparin aus biologischem Material, wie z. B. aus intestinaler Schweinemukosa, gewonnen wird, kann es Verunreinigungen enthalten und in seiner chemischen Zusammensetzung zwischen verschiedenen Präparationen variieren. Daher versuchten Dinkins und Brackett (2000), Heparin durch andere, definierte Substanzen zu ersetzen. Die Autoren verwendeten modifiziertes BO-Medium, dem 5,15 mM Koffein, 3,35 mM D-Penicillamin, 10 µM Hypotaurin und 1 µM Adrenalin zugesetzt waren. Die Spermien wurden darin ohne oder mit den Zusätzen Heparin, cAMP, Progesteron oder den Cyclodextrinen HPCD und MCD 15 und 30 Minuten inkubiert. Der Kapazitationszustand wurde mittels CTC-Färbung (siehe Kapitel 2.1.2.1) nachgewiesen. Die Autoren fanden einen signifikant höheren Anstieg des Anteils der kapazitierten (B-Muster) und akrosomenreagierten (AR-Muster) Spermien bei Zugabe von 0,01 bis 1,0 µM cAMP im

Vergleich zu Heparin oder zur Kontrolle. Das gleiche galt für 100 μM Progesteron. Bei den Zykloextrinen ergab sich zwar ein signifikanter Anstieg des AR-Musters, jedoch nicht des B-Musters, was die Autoren auf einen möglicherweise degenerativen Akrosomenverlust zurückführten. Sie schlossen aus ihren Ergebnissen, daß cAMP und Progesteron die Kapazitation von TG-Sperma in der Gegenwart von Motilitätsförderern wie Koffein und D-Penicillamin initiieren und daß β -Zyklodextrine die Akrosomenreaktion schnell einleiten könnten.

2.1.2 Feststellung der Kapazitation

Die Kapazitation läßt sich einerseits durch Sichtbarmachung der erfolgten Membranveränderungen mittels Chlortetrazyklinfärbung nachweisen und andererseits funktionell durch die Ergebnisse von Zona pellucida-Bindungs- bzw. -Penetrationstests belegen.

2.1.2.1 Färbung mit Chlortetrazyklin

Die Chlortetrazyklin(CTC)-Fluoreszenzfärbung wurde zuerst von Ward und Storey (1984) verwendet, um den funktionellen Status von Mäusespermien zu untersuchen. Mit der CTC-Färbung können akrosomenintakte und akrosomenreagierte Spermien unterschieden werden. Zusätzlich ist es möglich, die akrosomenintakten Zellen in zwei weitere, funktionell unterschiedliche Kategorien einzuteilen, nämlich unkapazitierte und kapazitierte Spermien (Das Gupta, 1993).

Chlortetrazyklin bindet an Calcium, dessen Verteilung auf der Membranoberfläche des Spermienkopfes sich während der Kapazitation ändert. Das Verteilungsmuster des Chlortetrazyklins, das mittels eines Fluoreszenzmikroskopes sichtbar wird, steht somit in Beziehung zum Kapazitationsstatus des Spermiums (Perez et al., 1995). Man kann also mit dieser Methode den zeitlichen Verlauf der Kapazitation verfolgen.

Zur Beurteilung wird eine CTC-Stammlösung, bestehend aus 500 – 1000 μM CTC in einer Pufferlösung, die 130 mM NaCl, 20 mM Tris-Puffer und 5 mM Cystein bei einem pH von 7,8 enthält, mit einer gleichen Menge der Spermiesuspension auf einem vorgewärmten Objektträger vermischt. Nach 10 – 30 Sekunden wird die Mischung mit 12,5 %igem Glutaraldehyd in Trispuffer fixiert. Nachdem ein Deckgläschen aufgebracht wird, das

versiegelt werden kann, wird die Probe möglichst bald unter dem Fluoreszenzmikroskop bei einer Wellenlänge von 365 - 470 nm ausgewertet. Die etwaige Lagerung sollte gekühlt in befeuchteter Atmosphäre und in Dunkelheit erfolgen (Ward und Storey, 1984; DasGupta, 1993; Perez et al., 1995).

Fraser et al. (1995) fanden bei der Färbung von Bullenspermien drei bestimmte Muster, die denen bei Maus und Menschen sehr ähneln. Sie unterschieden zwischen unkapazitierten akrosomenintakten Spermien, kapazitierten akrosomenintakten Spermien und kapazitierten akrosomenreagierten Spermien (Tab. 1).

Tab. 1: Auswertung der Fluoreszenzmuster

Muster	Fluoreszenzverteilung	Kapazitation	Akrosomenreaktion
F	gleichmäßige Fluoreszenz über dem gesamten Kopf	–	–
B	Fluoreszenz-freies Band über der postakrosomalen Region	+	–
AR	dünnes, abgesetztes Fluoreszenz-Band über dem Äquatoralsegment	+	+

2.1.2.2 Zona pellucida-Bindung und -Penetration

Zwar können auch unkapazitierte Spermien an die Zona pellucida binden (Peterson et al., 1984), die Bindung ist jedoch kurz und reversibel. Diese Spermien sind nicht in der Lage, eine Zona pellucida-induzierte Akrosomenreaktion zu durchlaufen (Berger et al., 1989) und die Zona zu penetrieren (Yoshida et al., 1993). Diese Fähigkeiten werden erst durch die Kapazitation erworben (Harkema et al., 1998).

2.1.2.2.1. Zona pellucida-Bindungstest

Mit zunehmender Kapazitationsdauer nimmt die Anzahl der Zona pellucida-Bindungsstellen auf den Spermien durch Exposition, Aktivierung (z.B. Tyrosin-Phosphorylierung und Dimerisierung, Flesch et al., 2001) oder erhöhte Affinität bereits vorhandener Bindungsstellen zu (Harkema et al., 1998). Damit steigt auch die Fähigkeit boviner Spermien, an die Zona pellucida zu binden, während der Kapazitation an (Topper

et al., 1999). Es werden zwei mögliche Mechanismen diskutiert. Erstens ist nach der Kapazitation die negative Nettoladung der Spermien herabgesetzt (Iqbal und Hunter, 1995b). Da an der Bindung zwischen Spermien und Zona pellucida sowohl hydrophobe als auch Ioneninteraktionen beteiligt sind (Urch und Patel, 1991; Naz und Ahmad, 1994), könnte die reduzierte negative Nettoladung der Spermien die Bindung an die Zona pellucida-Proteine erleichtern. Zweitens treten während der Kapazitation Veränderungen in der Fluidität und Permeabilität der Plasmamembran auf (Langlais und Roberts, 1985), die in Migration und Reorganisation von Lipiden und Proteinen resultieren. Heparin oder Heparin-ähnliche Glykosaminoglykane aus der Eileiterflüssigkeit könnten die Membranorganisation durch ihre Interaktion mit Proteinen aus dem Seminalplasma, die bei der Ejakulation an Phospholipide der Spermienplasmamembran binden, stimulieren (Thérien et al., 1995). Beide Mechanismen führen zu Exposition, Aktivierung oder erhöhter Affinität bereits existierender Bindungsstellen auf der Spermienplasmamembran (Topper et al., 1999).

Für Beispiele für Zona pellucida-Bindungstests siehe Kapitel 2.4.2.2.

2.1.2.2.2. Zona pellucida-Penetrationstest

Das Ziel der Kapazitation ist es, die Spermien dazu zu befähigen, an die Zona pellucida zu binden und sie zu durchdringen. Daher scheint die Penetration der Zona pellucida ein geeigneter Endpunkt für die Untersuchung der Kapazitation zu sein (Boatman et al., 1988).

Bovine Eizellen im Stadium des Germinalvesikels können von kapazitierten akrosomenreagierten Bullenspermien penetriert werden. Die Reifung der Eizellen ist offenbar nicht nötig für die Penetration des Vitellus und die Dekondensation des Spermienkopfes (Niwa et al., 1991).

Wheeler und Seidel (1987) entwickelten einen Zona pellucida-Penetrationstest, um die Kapazitation boviner Spermien zu untersuchen. Das Sperma wird 24 Stunden in TALP-Medium im Brutschrank präinkubiert und 3 Stunden mit folliculären Eizellen, die aus Ovarien gewonnen wurden, die zuvor bei -20°C tiefgefroren waren, koinkubiert. Die inseminierten Eizellen sollten innerhalb von 24 h evaluiert werden. Die Penetrationsraten dieses Tests unterschieden sich nicht signifikant von den Penetrationsraten von Eizellen, die 8 Stunden im Kanincheneileiter mit dort zuvor 8 Stunden kapazitierten Spermien

inkubiert wurden (40 bis 50 %). Somit stellt dieser Zona pellucida-Penetrationstest eine verlässliche Methode zur Evaluation der Kapazitation dar. Die Autoren stellten außerdem in einem weiteren Experiment fest, daß ovulierte Eizellen signifikant höhere Penetrationsraten aufwiesen als folliculäre Eizellen, die aus frischen Ovarien gewonnen wurden, aber etwa gleiche wie die von folliculären Eizellen aus tiefgefrorenen Eierstöcken.

Tatemoto et al. (1994) verwendeten in einem ähnlichen Versuch Eierstöcke, die zwischen einem Tag und 3 Monaten bei $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ tiefgefroren waren, und fanden keinen Unterschied bei den Penetrationsraten bezüglich der Tiefgefrierdauer. Allerdings waren die Penetrationsraten bei den toten Eizellen signifikant niedriger als bei der Verwendung von frischen Eizellen. Die Ursache hierfür ist wahrscheinlich die Unreife der toten Eizellen, da sich die Fähigkeit, die Akrosomenreaktion zu induzieren, erst während der Reifung ausbildet (Boatman und Robbins, 1991). Dies könnte auch erklären, daß die Polyspermierate der toten Eizellen erheblich höher war als bei den lebenden (siehe Kapitel 2.3.2).

Die Verwendung toter Eizellen für solche Zona pellucida-Penetrationstests bietet viele Vorteile. Man muß die Eizellen nicht reifen und kann einen Vorrat tiefgefrorener Eierstöcke anlegen. Es ist möglich, bei toten Eizellen die eingedrungenen Spermien direkt im perivitellinen Spalt zu sehen, was bei lebenden Oozyten aufgrund des dichteren Ooplasmas schwierig ist. Bei lebenden Eizellen sind zwischen der Dekondensation des Spermienkopfes und der Bildung des Vorkerns nur Schwanzreste sichtbar, die leicht übersehen werden. Ferner ist die Abgrenzung von männlichen und parthenogenetischen Vorkernen schwierig (Wheeler und Seidel, 1987).

Boatman et al. (1988) führen auch den Polyspermieblock lebender Eizellen im Zusammenhang mit der Spermienkonzentration als Problem an. Yanagimachi et al. (1979) stellten fest, daß die Zonae pellucidae von in Salzlösung gelagerten Eizellen biologische und physikalische Eigenschaften, wie Spermienpenetration und Lektinbindung, beibehalten, aber der durch die kortikale Reaktion vermittelte Polyspermieblock nicht erhalten bleibt. Boatman et al. (1988) beobachteten, daß es beim Kriterium „penetriert - nicht penetriert“ keine signifikanten Unterschiede zwischen zwei Spermienkonzentrationen gab. Wurde jedoch die Anzahl penetrierter Spermien pro Eizelle als Kriterium herangezogen - was durch die Ausschaltung des Polyspermieblocks in so behandelten Eizellen möglich wurde - war ein deutlich positiver Einfluß der Spermienkonzentration auf die Anzahl penetrierter Spermien zu finden. Die Salzlagerung hatte außerdem den Vorteil,

die Variationen zwischen den Eizellen von verschiedenen Individuen zu eliminieren. Nachteile der Verwendung toter Eizellen sind jedoch, daß weder die Membranfusionsfähigkeit, noch die weitere Entwicklung der Eizelle getestet werden können (Wheeler und Seidel, 1987).

2.2 Akrosomenreaktion in vitro

Auch die molekularen Mechanismen der Akrosomenreaktion sind bis heute nicht ganz geklärt. Im folgenden soll eine Zusammenfassung des aktuellen Standes der Erkenntnisse nach den Literaturübersichten von Breitbart (2003) und Tulsiani et al. (1998) gegeben werden.

Die Bindung des Spermiums an die Zona pellucida verursacht eine weitere Aktivierung der Adenylatzyklase, die cAMP produziert. cAMP aktiviert Phosphokinase A, die einen Calciumkanal in der äußeren akrosomalen Membran öffnet, was zu einem Anstieg des zytosolischen Calciums führt. Dadurch wird Phospholipase C aktiviert, die Diacylglycerol und Inositoltriphosphat (IP₃) produziert. Diacylglycerol aktiviert Phosphokinase C, die einen Calciumkanal in der Plasmamembran öffnet, wodurch der Calciuminflux weiter steigt. Inositoltriphosphat öffnet IP₃-abhängige Calciumkanäle in der äußeren akrosomalen Membran, was zu einer Entleerung des Akrosoms von Calcium führt, ein Vorgang, der den Calciuminflux aus der Umgebung ins Zytosol noch weiter stimuliert („Speicher-operierter Calciumeintritt“ oder „kapazitiver Calciumeintritt“). Aus diesen Vorgängen resultiert ein starker Calciumanstieg im Zytosol, der die sog. Aktin-schädigenden Proteine aktiviert.

In kapazitierten Spermien wird durch Proteintyrosinphosphorylierung Aktin zu Filamenten polymerisiert. Diese Filamente befinden sich zwischen Plasmamembran und äußerer akrosomaler Membran und bilden eine physiologische Barriere zwischen den beiden Membranen. Die Aktin-schädigenden Proteine depolymerisieren die Aktinfilamente, wodurch die Barriere zwischen Plasmamembran und äußerer akrosomaler Membran abgebaut wird. Gleichzeitig spaltet die von der membrangebundenen Phospholipase C aktivierte Phospholipase A₂ Fettsäuren von den Phospholipiden in der Membran ab, und produziert so Lysophospholipide, die die Membranfusion fördern. Die Membranen können in Kontakt treten und fusionieren. Die akrosomalen Enzyme werden freigesetzt und die Akrosomenreaktion ist vollendet.

2.2.1 Auslösung der Akrosomenreaktion in vitro

Die Kapazitation ist eine Grundvoraussetzung für die Induzierbarkeit der Akrosomenreaktion. Sie verändert die Spermienmembran dahingehend, daß sie für Stimuli, die die Akrosomenreaktion auslösen, empfänglich wird. Die physiologische Akrosomenreaktion geschieht auf die Interaktion des Spermiums mit der Zona pellucida hin.

In vitro kann man die Akrosomenreaktion durch verschiedene Agenzien auslösen.

2.2.1.1 Zona pellucida – Proteine

Die Akrosomenreaktion wird in vivo durch den Kontakt der Spermien mit der Zona pellucida in Gang gesetzt. Die Zona pellucida ist ein Netz aus mehreren Proteinen, das die Eizelle als Schutzhülle umgibt. Abhängig von der Spezies enthält sie verschiedene Glykoproteine, die als Rezeptoren für die Spermien dienen. Bei der Maus, der in dieser Hinsicht am besten untersuchten Spezies, ist die Zona pellucida aus den sulfatierten Glykoproteinen ZP1, ZP2 und ZP3 aufgebaut. ZP2- und ZP3-Heterodimere werden von ZP1 durch intermolekulare Disulfidbrücken zu einer dreidimensionalen Matrix stabilisiert (Hinsch und Hinsch, 1999). Akrosomenintakte Spermien binden an ZP3 als primären Rezeptor, der für die speziesspezifische Bindung der Spermien an die Eizelle und die Akrosomenreaktion verantwortlich ist. Bei der Akrosomenreaktion verschmelzen die äußere akrosomale Membran und die Plasmamembran miteinander. Die Bindungsstellen für ZP3 auf der Plasmamembran gehen so verloren, während Bindungsstellen für ZP2 auf der inneren akrosomalen Membran entblößt werden (Kerr et al., 2002).

Florman und First (1988) beobachteten, daß flüssige Extrakte aus boviner Zona pellucida deren Fähigkeit, die Akrosomenreaktion bei kapazitierten bovinen Spermien zu induzieren, beibehalten. Mittels kinetischer Studien stellten die Autoren fest, daß eine synchrone Akrosomenreaktion mit einer Halbwertszeit von 5 – 10 Minuten stimuliert wurde, wobei die maximale Antwort nach 20 Minuten erfolgte. Die effektive Dosis betrug 20 ng Zona pellucida-Protein/ml, die maximal effektive Dosis 50 ng/ml. Thundatil et al. (1999) erzielten durch die Behandlung mit 16 ng/ml Zona pellucida Protein einen signifikanten Anstieg der akrosomenreagierten Spermien.

2.2.1.2 Phosphatidylcholine

Wenn Spermien bei der natürlichen Auslösung der Akrosomenreaktion an das Zona pellucida-Protein 3 binden, wird ein G-Protein aktiviert, das unter anderem Phospholipase A2 stimuliert, die Phosphatidylcholin in Lysophosphatidylcholin und Arachidonsäure spaltet. Beides sind stark fusogene Substanzen, die die Fusion der Membranen von Spermium und Eizelle begünstigen (Kopf und Gerton, 1991). Somit bewirkt die Zugabe von Lysophosphatidylcholin oder bestimmten anderen Phosphatidylcholinen die Fusion von Plasmamembran und äußerer akrosomaler Membran.

Graham et al. (1986) untersuchten die Auswirkung von Phosphatidylcholin-Liposomen mit unterschiedlich langen Fettsäureketten. Nur die Liposomen mit 10 (PC10) und 12 (PC12) Fettsäuren induzierten die Akrosomenreaktion, wobei PC 10 jedoch die Motilität der Spermien stark beeinträchtigte. Die Anzahl der akrosomenreagierten Spermien stieg mit Erhöhung der PC12-Konzentration in dosisabhängiger Weise, während der Anteil der motilen Spermien zurückging. 30 μM PC12-Liposomen lösten zwar bei mehr Spermien eine Akrosomenreaktion aus als 20 μM , jedoch lag die Motilität nach 60 Minuten bei 0 %. Auch die Anzahl der Spermien pro Milliliter hatte Einfluß auf die Rate akrosomenreagierter Spermien. Je höher die Konzentration, desto weniger Spermien durchliefen die Akrosomenreaktion. Die behandelten Spermien hefteten sich genau wie kapazitierte Eberspermien an die Wände des Glasgefäßes an, während die frei schwimmenden Spermien sich wie kapazitierte, hyperaktivierte Spermien in einer Achterfigur-ähnlichen Bewegung bewegten. Bei 20 μM PC12 wurden 90 % Zona-freier Hamstereizellen penetriert, jedoch war auch die Polyspermierate am höchsten.

Graham und Foote untersuchten die Fähigkeit von Bullenspermien, in Frischsamen (1987a) und in TG-Sperma (1987b), nach Induktion der Akrosomenreaktion mit verschiedenen Konzentrationen von Dilauroylphosphatidylcholin (PC12) zonafreie Hamstereizellen zu penetrieren. Mit steigender Konzentration von PC12 und zunehmender Dauer der Koinkubation erhöhte sich die Anzahl akrosomenreagierter Spermien und sank die Motilität. Die Penetrationsraten zonafreier Hamstereizellen erreichten bei 36,7 μM PC12 (Frischsamen) bzw. 44,7 und 51,1 μM PC12 (TG-Samen) ihr Maximum und sanken danach wieder, ebenso wie die Anzahl der penetrierten Spermien. Die Ursache des Unterschieds vermuteten die Autoren in der Interaktion der PC12-Liposomen oder der Spermienmembran mit dem Eigelbverdünner. Die Spermien aus dem Frischsamen von

Bullen mit höherer Fertilität benötigten eine geringere Konzentration von PC12-Liposomen als die von Bullen mit niedrigerer Fruchtbarkeit. Die Autoren führten dies auf Unterschiede in der Zusammensetzung der Spermienmembran zurück, die die Spermien von Bullen mit höherer Fertilität empfindlicher für PC12 machen. Bei den Spermien aus dem TG-Samen verhielt es sich umgekehrt, vermutlich, weil der Tiefgefrier- und Auftauvorgang die Membranen der Spermien von Bullen mit niedrigerer Fertilität stärker vorschädigt, so daß weniger PC12 nötig ist, um sie noch weiter bis zur Auslösung der Akrosomenreaktion zu destabilisieren (Graham und Foote, 1987b).

Nolan et al. (1992) entwarfen ein Modell für die Induktion der Akrosomenreaktion durch PC12. Sie inkubierten Bullenspermien bei einer Konzentration von 10 Millionen Spermien/ml in TALP-Medium, das 10 mM Ca^{2+} enthielt. Nach 5 Minuten begann die Initiation der Akrosomenreaktion, nach 12 Minuten war die Hälfte der maximal auslösbaren Akrosomenreaktion (ca. 40 %) erreicht. Nach Meinung der Autoren wird PC12 aus den Vesikeln in die Plasmamembran transferiert. Auf die Zugabe von Calcium zum Medium verändert PC12 die Eigenschaften der Plasmamembran dahingehend, daß eine Fusion mit der äußeren akrosomalen Membran ermöglicht wird.

Durch Hydrolyse von Phospholipiden durch Phospholipase A_2 entstehen die noch potenteren Lysophospholipide. Lysophosphatidylcholin (LPC), Lysophosphatidylethanolamin (LPE) und Lysophosphatidylinositol (LPI) sind in der Lage, die Akrosomenreaktion auszulösen (Wheeler und Seidel, 1989). Lysophosphatidylserin induzierte in dieser Versuchsanordnung zwar nicht die Akrosomenreaktion, befähigte die Spermien aber zu den höchsten Penetrationsraten zonafreier Hamstereizellen im Vergleich zu LPC, LPE und LPI. Die Penetrationsraten stiegen mit zunehmendem Anteil akrosomenreagierter Spermien an, bis zu einem Schwellenwert, an dem die Motilität der Spermien zu sehr eingeschränkt wurde, um die Eizellen penetrieren zu können.

Henault und Killian (1995) stellten fest, daß mit Heparin kapazitierte Spermien aus Frischsamen, bei denen die Akrosomenreaktion mit Lysophosphatidylcholin (LPC) ausgelöst wurde, signifikant mehr zonafreie Rindereizellen in signifikant höherer Anzahl penetrierten als Spermien, die nicht mit LPC behandelt wurden. Die Autoren führten dies darauf zurück, daß die für die Membranfusion wichtigen Eigenschaften von kapazitierten, mit LPC behandelten Spermien denen der Spermien, die nur kapazitiert wurden, überlegen sind. Landim-Alvarenga et al. (2001) erzielten 90 % penetrierte zonafreie Rindereizellen

mit Spermien (50 Millionen Spermien / ml Sperm-TALP), die 15 Minuten mit 100 μ M PC12 behandelt wurden.

2.2.1.3 Calcium-Ionophor

Ionophor A23187 ist ein mobiler Ionenträger, der divalente Kationen, wie Calcium oder Magnesium, aus einem isotonischen Medium in eine organische Phase transportiert. A23187 löst bei kapazitierten Bullenspermien einen signifikanten Anstieg des Anteils lebender Spermien mit echter Akrosomenreaktion aus (Pereira et al., 2000). Das Calcium-Ionophor ermöglicht dies, indem es die Passage von Calcium-Ionen durch die Plasmamembran erleichtert (Pressman, 1976). Dadurch steigt die Calcium-Konzentration zwischen Plasmamembran und äußerer akrosomaler Membran über den Schwellenwert an, der die Akrosomenreaktion auslöst (Yanagimachi und Usui, 1974). Kapazitierte bovine Spermien zeigen eine erhöhte Empfindlichkeit gegenüber A23187 (Byrd, 1981). Das Calcium-Ionophor induziert die Akrosomenreaktion jedoch auch bei unkapazitierten Spermien in Gegenwart von Calcium. Dazu wird mindestens ein Energiesubstrat benötigt, wobei sich Laktat als am effektivsten erwiesen hat (Bhattacharyya und Pakrashi, 1991).

Ein Nachteil von A23187 ist, daß mit steigender Konzentration die Motilität der Spermien reduziert wird (Bird et al., 1989). Die Ursache hierfür ist wahrscheinlich die Behinderung mitochondrialer ATP-Produktion durch den hohen intrazellulären Calciumgehalt (Talbot et al., 1976; Bradley et al., 1979). Dies läßt sich durch die Zugabe von BSA zum Medium beheben. Albumin entfernt das Calcium-Ionophor von der Plasmamembran (Sarkadi et al., 1976). Dadurch können Calciumpumpen in Mitochondrien und Plasmamembran den intrazellulären Calciumspiegel regulieren und die Bewegung des Flagellums wieder ermöglichen (Suarez et al., 1987).

Byrd (1981) stellte fest, daß die Motilität der Spermien nach 90 Minuten Inkubation mit A23187 auf 5 % zurückging, wenn ihre Konzentration 10 Millionen Spermien/ml unterschritt. Bei einer Spermienkonzentration von 100 Millionen Spermien/ml blieb die Motilität jedoch über mehrere Stunden hoch. Eine zehn- bis dreißigminütige Inkubation mit 1 - 10 μ M A23187 reichte nicht aus, um die Akrosomenreaktion bei Spermien zu induzieren, die zuvor 5 Stunden in Tyrodes Medium mit 6 % BSA inkubiert worden waren. Erst wenn Spermien, die mindestens 2 Stunden in Tyrodes Medium mit 6 % BSA

präinkubiert waren, kontinuierlich mit 10 μ M A23187 über 120 Minuten inkubiert wurden, kam es bei 93 % zur Akrosomenreaktion.

Whitfield und Parkinson (1995) erzielten mit einer einstündigen Inkubation mit 1,0 mM A23187 einen signifikanten Anstieg der akrosomenreagierten Spermien, ebenso wie Januskauskas et al. (2000b), die mit 0,1 mM A23187 nur einen sehr geringen Anteil von akrosomenreagierten Spermien erhalten hatten und die Konzentration daher auf 1,0 mM erhöhten. Pereira et al. (2000) erreichten dagegen mit 0,1 mM A23187 nach 15 und 30 Minuten Inkubation signifikant höhere Prozentsätze von akrosomenreagierten Spermien als mit 5 IE/ml Heparin oder 5 mM Koffein. Landim-Alvarenga et al. (2001) erzielten 80 % penetrierte zonafreie Rindereizellen mit Spermien (50 Millionen Spermien / ml Sperm-TALP), die 5 Minuten mit 100 nM A23187 behandelt wurden. Jiang et al. (1991) beobachteten eine höhere Blastozystenrate mit Spermien, die für 1 Minute mit 0,1 mM A23187 behandelt wurden, als mit Spermien, die 15 Minuten mit 10 oder 100 μ g/ml Heparin inkubiert wurden, und hielten dieses System daher für vorteilhafter für die Embryoproduktion.

Watson et al. (1992) meldeten jedoch Zweifel an der physiologischen Wertigkeit der durch Calcium-Ionophor ausgelösten Akrosomenreaktion an. Sie stellten beim Eber fest, daß die mit A23187 induzierte Akrosomenreaktion wesentlich schneller abläuft als die spontane Akrosomenreaktion. Die Vesikel, die sich zwischen der Plasmamembran und der äußeren akrosomalen Membran bei der Fusion bilden, sind größer und unterscheiden sich in ihrer Größe untereinander stärker. Das Calcium kann in kürzerer Zeit und höherer Konzentration in die Zelle eindringen als bei der physiologischen Akrosomenreaktion.

Während die Zona pellucida-induzierte Akrosomenreaktion stark mit der Morphologie der humanen Spermien korrelierte, traf dies auf die Ionophor-induzierte Akrosomenreaktion nicht zu (Franken et al., 1997). Dies läßt den Schluß zu, daß mit Hilfe von Calcium-Ionophor auch Spermien, die physiologischerweise dazu nicht in der Lage wären, die Akrosomenreaktion durchlaufen. Einen weiteren Hinweis auf diese Vermutung gibt die Studie von Liu und Baker (1996). Sie fanden beim Mann eine hohe Korrelation zwischen Zona pellucida-induzierter Akrosomenreaktion und Zona-Penetration, während die Ionophor-induzierte Akrosomenreaktion weder mit der Zona pellucida-induzierten Akrosomenreaktion noch mit der Zona-Penetration korrelierte.

2.2.2 Feststellung der Akrosomenreaktion

Die zeitliche Abfolge, mit der Spermien die Akrosomenreaktion durchlaufen, stellt einen wichtigen Parameter in der Evaluation der Spermienfunktion dar (Tesarik et al., 1993).

Man kann die Akrosomenreaktion mit verschiedenen Mitteln feststellen. Im Transmissionselektronenmikroskop ist es möglich, den Zustand der Membranen direkt zu betrachten. Mittels Färbungen mit Fluoreszenz-markierten Lektinen (z.B. Con A (Concanavalin A, *Concanavalia ensiformis*), PNA (*Arachis hypogea* (peanut) Agglutinin), PSA (*Pisum sativum* Agglutinin), u.a.) oder Antikörpern (z.B. H-13, HS-33), die an spezifische Glykoproteine der Membranen binden, oder Chlortetrazyklin, das an Calcium bindet, kann man indirekt die Veränderungen der akrosomalen und der Plasmamembran darstellen.

2.2.2.1 Fluoreszenzoptische Färbung mit FITC-PSA

Cross et al. (1986) stellten fest, daß Fluorisoithiozyanat-konjugiertes *Pisum sativum*-Agglutinin (FITC-PSA) an permeabilisierten Spermien dieselbe Färbung hervorruft wie ein Antiserum gegen das akrosomale Enzym Akrosin. Daraus schlossen sie, daß es den Akrosomeninhalt färbt. Es handelt sich um ein Lektin mit einer Affinität für endständige α -D-Glykosyl- und α -D-Mannosylreste von Glykoproteinen (Trowbridge, 1974). Proakrosin, die Vorstufe von Akrosin, ist ein Glykoprotein mit solchen Saccharidgruppen, die eine hohe Affinität zu PSA haben (Schleuning und Fritz, 1976). Außerdem ist sein Molekulargewicht dem des Proteins, an das PSA bindet, sehr ähnlich (Adeniran et al., 1995).

Bei mit Alkohol permeabilisierten Spermien zeigt die Färbung der akrosomalen Region das Vorhandensein eines intakten Akrosoms an, während die Abwesenheit der Fluoreszenz auf das Fehlen des Akrosoms hinweist (Mendoza et al., 1992).

Kaul et al. (2001) evaluierten zwei Methoden der Detektion des akrosomalen Status, nämlich Fluoreszenz-Färbungen mit Chlortetrazyklin bzw. FITC-PSA, auf ihre Genauigkeit, indem sie sie mit ultrastrukturellen Untersuchungen mittels Transmissionselektronenmikroskop verglichen. Die Ergebnisse korrelierten sehr gut,

woraus die Autoren schlossen, daß beides zuverlässige Methoden zur Evaluierung des akrosomalen Status sind.

Das Gupta et al. (1993) verglichen ebenfalls die Muster der FITC-PSA-Färbung mit den ultrastrukturellen Bildern im Transmissionselektronenmikroskop. Sie stellten fest, daß Spermien mit einheitlicher Fluoreszenz über der akrosomalen Region akrosomenintakten Spermien entsprechen. Spermien, die Fluoreszenz nur über dem Äquatoralsegment aufweisen, stimmen mit vollständig akrosomenreagierten Spermien überein. Spermien mit Fluoreszenz über dem Äquatoralsegment und Flecken auf dem Rest des Akrosoms befinden sich im intermediären Zustand der Exozytose. Der Zusammenhang von kleinen Klumpen akrosomaler Matrix im Elektronenmikroskop und der fleckigen FITC-PSA-Färbung stimmt mit dem Bericht von Cross et al. (1986) überein, daß PSA an akrosomales Material bindet.

Da die Membran toter Spermien durch degenerative Vorgänge permeabel wird, färben sich deren Akrosomen ebenfalls an. Um solch ein falsch-positives Ergebnis zu vermeiden, ist es unerlässlich, zusätzlich eine zweite Färbung einzusetzen, die zwischen lebenden und toten Spermien unterscheidet (Henley et al., 1994). Im allgemeinen wird Propidiumiodid (PI) verwendet. Dieser Farbstoff dringt durch die beschädigten Membranen toter Spermien ein, während es die intakten Membranen lebender Spermien nicht überwinden kann (Steinkamp et al., 1982). Allerdings sickert es ebenso leicht wieder aus, wenn der Farbstoff aus dem umgebenden Medium durch Waschschriffe entfernt wird. Werden die Membranen dann für die Färbung mit FITC-PSA durch Ethanol permeabilisiert, kann PI, das aus den toten Zellen sickert, ursprünglich lebende, nun permeabilisierte Spermien anfärben (Terstappen et al., 1988).

Daher ist es besser, Ethidiummonoazid (EMA) zu verwenden. Dieser Farbstoff dringt ebenfalls durch beschädigte Membranen ein und bildet feste Komplexe mit der DNA. Durch Photoaktivierung wird EMA dann in ein hochreaktives Nitren umgewandelt, das eine kovalente Bindung mit der DNA ausbildet (Coffman et al., 1982). Diese Bindung ist stark genug, um Waschschriffen und Fixation zu widerstehen (Jensen und Muirhead, 1988). EMA wird bei 488 nm angeregt. Der Emissionshöhepunkt liegt bei 600 nm. Dadurch kann es von FITC unterschieden werden, das bei 512 nm emittiert.

2.2.2.2 Färbung mit Chlortetrazyklin

Wie bereits im Kapitel 2.1.2.1 dargestellt, kann mit der Chlortetrazyklinfärbung sowohl der Kapazitionszustand beurteilt, als auch die Akrosomenreaktion festgestellt werden.

2.3 Pathologie der Befruchtung / Probleme bei der IVF

2.3.1 Parthenogenese

Je länger Eizellen gereift werden, also je älter sie werden, umso eher werden sie spontan aktiviert (Ayoub und Hunter, 1993; Plante und King, 1996; Presicce und Yang, 1994; Suzuki et al, 1999). Eine künstliche Aktivierung ist möglich durch elektrische Impulse, Calcium-Ionophor, Ethanol oder Cycloheximide (Ware et al., 1989; Presicce und Yang, 1994). Der Höhepunkt der Aktivierungskompetenz liegt bei 26 bis 27 Stunden Maturation (King et al., 1988; Nagai, 1987; Ware et al., 1989). Da die übliche Reifungszeit der Eizellen in vitro nur wenig kürzer ist (ca. 24 Stunden), kann eine spontane Aktivierung ein Problem bei der IVF darstellen.

Untersuchungen haben gezeigt, daß Parthenogenoten keine absolute Entwicklungskompetenz besitzen (Plante und King, 1996). Sie bleiben in der Entwicklung zurück und werden im allgemeinen arretiert, bevor sie das Blastozystenstadium erreichen. Bei keiner der wenigen Blastozysten, die sich im Versuch entwickelt hatten, kam es zum Schlupf aus der Zona pellucida. Sie wiesen deutlich weniger Blastomeren auf als durch Befruchtung entstandene Embryonen, besonders im Embryonalknoten. Strukturelle Vergleiche zwischen den Parthenogenoten und mittels IVF geschaffenen Embryonen zeigten zu allen Zeitpunkten der Entwicklung Unterschiede, die darauf schließen lassen, daß das Unvermögen zur langfristigen Entwicklung eine metabolische Basis haben könnte. Obwohl die Entwicklung eingeschränkt ist, laufen einige Merkmale der Kernreifung und der Aktivierung des embryonalen Genoms auch ohne den Beitrag der paternalen Gene ab (Plante und King, 1996).

Lechniak et al. (1998) untersuchten 24 Parthenogenoten auf ihren Chromosomensatz. 62,5 % wiesen den normalen, diploiden Chromosomensatz auf, die übrigen zeigten verschiedene Arten der Aneuploidie: 25 % Haploidität, 4,2 % Triploidität und 8,3 % Tetraploidität.

Das Auftreten von Parthenogenese (Tab. 2) ist also ein Problem, das man bei der Auswertung von IVF-Raten berücksichtigen muß, da sich aus diesen scheinbar normal befruchteten Eizellen bzw. Embryonen kein lebensfähiges Tier entwickeln könnte (Markert und Seidel, 1981).

Tab. 2: Beispiele aus der Literatur für die Inzidenz von Parthenogenese

	Autor	Parthenogeneten
spontan / durch Alterung	Ayoub und Hunter, 1993	3,6 – 14,1 %
	King et al., 1988	26 – 45 %
	Lechniak et al., 1998	9,5 %
	Plante und King, 1996	7,5 %
	Shamsuddin und Larsson, 1993	12,4 %
künstlich induziert	Presicce und Yang, 1994	6 – 57 %
	Ware et al., 1989	21%

2.3.2 Polyspermie

Die Verschmelzung der Zellmembranen von Spermium und Eizelle löst eine Depolarisationswelle aus, die sich rasch über die gesamte Oberfläche der Eizelle ausbreitet. Gleichzeitig kommt es zu einer starken Zunahme der freien Calcium-Ionen im Zytoplasma. Beide Vorgänge lösen die Aktivierung der Eizelle aus, so daß sie die zweite meiotische Teilung mit der Abschnürung des Polkörperchens beenden kann. Die Depolarisationswelle, die über die Oberfläche der Eizelle läuft, bewirkt zudem eine Umstrukturierung der Plasmamembran, wodurch das Eindringen weiterer Spermien verhindert wird. Der frühe Calcium-Anstieg ist außerdem wichtig für einen weiteren Mechanismus zur Verhinderung von Polyspermie, der sog. Zona-Reaktion. Unmittelbar unter der Zellmembran der Eizelle liegen membranbegrenzte, vom Golgiapparat während Oogenese und Reifung gebildete sog. kortikale Granula, die proteolytische Enzyme enthalten. In ausgereiften Eizellen im Stadium des Germinalvesikels sind die kortikalen Granula gleichmäßig im gesamten Randbereich des Ooplasmas verteilt. Nach dem Eindringen des ersten Spermiums wird der Inhalt der Granula langsam in den Perivitellinraum abgegeben. Die Enzyme bewirken eine partielle Proteolyse der Glykoproteine der Zona pellucida, wodurch deren Struktur und Konsistenz derart verändert wird, daß ein Eindringen weiterer Spermien nicht möglich ist. Sollten sich zu diesem Zeitpunkt bereits zusätzliche Spermien im Perivitellinraum befinden, wird ihre Fusion mit der Eizelle dadurch verhindert, daß die Enzyme der kortikalen Granula spezifische Rezeptorproteine auf der Oberfläche der Eizelle abgebaut haben (Plasmamembranblock) (Yanagimachi, 1994).

Die Polyspermierate und die durchschnittliche Anzahl von Spermien, die die Eizelle penetrieren, nehmen mit der Dauer der Eizellreifung (bis ca. 24 h) allmählich ab, während

die Inzidenz der Entwicklung von weiblichem und männlichem Vorkern zunimmt (Niwa et al., 1991).

Unreife bovine Eizellen sind nicht fähig, polysperme Penetration zu blockieren, da sie die Fähigkeit zur Freisetzung der kortikalen Granula erst nach der meiotischen Reifung erlangen. Die aggregierten kortikalen Granula in unreifen Oozyten verteilen sich während der *in vitro* Reifung, bis sie eine Schicht bilden, die direkt unter dem Oolemma liegt (Wang et al., 1997 ; Nagano et al., 1999). Werden die Eizellen im Stadium des Germinalvesikels anisotonischen Bedingungen ausgesetzt, steigt die Polyspermierate signifikant (Agca et al., 2000). Die Größe der Follikel, aus denen die Eizellen gewonnen wurden, hat nach ordnungsgemäßer Reifung keinen Einfluß auf die Polyspermierate (Pavlok et al., 1992).

Wird die *in vitro* Maturation über die üblichen 24 Stunden hinaus verlängert, steigt die Polyspermierate an (Chian et al., 1992 ; Grupen et al., 1997). Außerdem verzögert sich die Entwicklung der männlichen Vorkerne und die Ausschleusung des zweiten Polkörperchens wird zurückgehalten (Pavlok et al., 1997). Der Polyspermieblock wird auch bei der parthenogenetischen Aktivierung von Eizellen mittels elektrischen Impulses ausgelöst (Soloy et al., 1997).

Mit steigender Anzahl der Spermien, mit denen befruchtet wird, steigt die Polyspermierate signifikant (Long et al., 1994; Abeydeera und Day, 1997). Wird die Dauer der Inkubation von Spermien und Eizellen verlängert, erhöht sich die Polyspermierate ebenfalls signifikant (Abeydeera und Day, 1997), bzw. tendenziell (Chian et al., 1995b). Die Inzidenz der Polyspermie ist bei Kumulus-umhüllten Eizellen signifikant höher als bei denudierten. Ursache hierfür ist wahrscheinlich die kapazitierende und Akrosomenreaktion-stimulierende Rolle der Kumuluszellen (Chian et al., 1995b).

Versuche am Zebu (Dode et al., 2002) ergaben keinen Unterschied der Polyspermierate bei verschiedenen Spermaaufbereitungsmethoden (diskontinuierlicher (45% und 90%) Percoll-Gradient, Swim up, Waschen durch Zentrifugation) oder unterschiedlich langen Inkubationszeiten der Gameten (3, 6, 12 und 18 h). Auch beim Bullen fanden Parrish et al. (1995) keinen Unterschied bei der Polyspermierate zwischen Swim up und Percoll.

Auch das Fertilisationsmedium kann durch unterschiedliche Zusammensetzung die Polyspermierate beeinflussen. Versuche von Roh et al. (2002) mit drei verschiedenen

Konzentrationen von NaCl ergaben, daß die Polyspermierate im Medium mit 78 mM NaCl zwar am geringsten war, sich jedoch ein signifikanter Rückgang bei der Bildung männlicher Vorkerne ergab. Die Polyspermierate im Medium mit 96 mM NaCl war immer noch niedriger als im Medium mit 114 mM, jedoch ohne Einbuße bei der Rate der männlichen Vorkernbildung. Auch bei der Blastozystenrate und der mittleren Zellzahl pro Embryo erwies sich eine Konzentration von 96 mM NaCl am günstigsten.

Versuche mit verschiedenen Bikarbonat-Konzentrationen bei Eberspermien (Abeydeera et al., 1997) ergaben keinen Unterschied der Polyspermierate zwischen 26 und 36 mM NaHCO₃. Bei 46 mM stieg sie jedoch signifikant an. Senkte man die Konzentration des Fetalen Kälberserums von 10 auf 1 %, erzielte man mit 46 mM eine höhere Penetrationsrate als mit 26 mM, ohne daß es zu einem signifikanten Anstieg der Polyspermie kam. Tajik et al. (1994) konnten in einem BO-Medium (1 mg/ml PVA, 5 mM Koffein und 10 µg/ml Heparin) mit Bikarbonatkonzentrationen zwischen 40 und 46 mM vergleichsweise höhere Polyspermieraten von Bullenspermien (10 Mio. Spermien/ml) beobachten als bei 34 bis 37 oder 49 mM Bikarbonat, diese Unterschiede waren jedoch nicht signifikant.

Kreysing et al. (1997) verglichen die IVF-Ergebnisse zweier Fertilisationssysteme, die auf Brackett und Oliphant-Medium (mit 10 mg/ml BSA, 0,1 IE/ml Heparin und 5 mM Koffein) bzw. auf TALP-Medium (Fert-TALP mit 20 µM Penicillamin, 10 µM Hypotaurin, 1 µM Epinephrin und 0,1 IE/ml Heparin) basierten. Sie stellten fest, daß das BO-System die Polyspermie stärker unterstützte als TALP-System.

Die Zugabe von Hypotaurin und β-Merkaptoethanol zu einem chemisch definierten Medium (TCM 199 mit 0,1 % PVA) erhöhte signifikant die Rate normal befruchteter Eizellen und senkte signifikant die Polyspermierate im Vergleich zu Hypotaurin allein (Mizushima und Fukui, 2001).

Pavlok (2000) erzielte mit Spermien, die 8 h in BO-Medium mit Polyvinylalkohol (PVA) und D-Penicillamin inkubiert worden waren bei kumulusfreien Eizellen in dem Fertilisationsmedium (TCM 199 mit 4 IE/ml Heparin) mit 10 % bovinem Serum signifikant höhere Fertilisations- und Polyspermieraten als in dem mit bovinem Serumalbumin (BSA). Verwendete er als Zusatz PVA, sank die Penetrationsrate auf Null. Auch bei Kumulusoozytenkomplexen stellte der Autor beim Vergleich verschiedener makromolekularer Komponenten als Zusatz zum Fertilisationsmedium signifikante

Unterschiede fest. Bovines Serum erzielte die höchsten Fertilisations- und Polyspermieraten, gefolgt von BSA. Beim Zusatz von PVA betrug die Polyspermierate 0 %. Die Heparin-Konzentration (10 bzw. 100 IE/ml) hatte keinen Einfluß auf die Ergebnisse. In einem ähnlichen Versuch wurden ebenfalls hohe Polyspermieraten im Medium mit BOS als Proteinquelle und Heparin oder Koffein beobachtet (Pavlok et al., 2001).

Wenn als Proteinsupplement Fetales Kälberserum statt Bovines Serumalbumin gewählt wurde, stieg die Polyspermierate (Leibfried-Rutledge et al., 1986). Diesen Effekt beobachteten auch Tajik et al. (1993). Die Polyspermierate war im Medium mit fetalem Kälberserum signifikant höher als in Medien mit bovinem Serumalbumin, Kälberserum oder ohne Proteinsupplementation. Alle Proteinsupplemente steigerten die Polyspermierate in einer Dosis-abhängigen Weise (Tajik et al., 1993).

Polychlorierte Biphenyle, wie z.B. Aroclor-1254, erhöhen die Polyspermierate signifikant. Die Ursache hierfür scheint eine nicht ordnungsgemäße Verteilung der kortikalen Granula während der Reifung und deren behinderte Exozytose nach der Penetration des ersten Spermiums zu sein (Pocar et al., 2001a, 2001b). Auch endotoxin-verseuchtes BSA steigert die Polyspermierate signifikant (Madison et al., 1991).

Polyspermieraten differieren zwischen unterschiedlichen Bullen (Kreysing et al., 1997; Tajik et al., 1994).

2.4 Korrelationen zwischen in vitro und in vivo Fertilisation

Bevor ein männliches Tier für Zuchtzwecke genutzt werden kann, muß getestet werden, ob es fruchtbar ist. Im Fall der künstlichen Befruchtung (KB) reicht es nicht aus, zu wissen, daß das Tier Nachkommen zeugen kann, sondern man muß mehr über den Grad der Fruchtbarkeit wissen, da das Sperma zur Befruchtung einer großen Anzahl weiblicher Tiere dienen soll. Daher haben sich über die Jahre hinweg verschiedene Methoden entwickelt, um die männliche Fruchtbarkeit vorherzusagen. Die direkten und verlässlichsten Methoden Paarung und KB sind teuer und zeitraubend und man kann nur eine bestimmte Anzahl von Bullen testen. Labormethoden unterliegen diesen Nachteilen nicht. Ein in vitro Test für die Determinierung von Bullenfruchtbarkeit, der Feldversuche ersetzen könnte, wäre von großem ökonomischen Nutzen für die KB-Industrie. Viele Studien wurden durchgeführt mit dem Ziel, Resultate von Laboruntersuchungen mit den Ergebnissen von Feldversuchen zu korrelieren.

2.4.1 Spermieneigenschaften

Die orientierende Untersuchung der Spermienqualität zur Erstellung eines Spermioграмms (Volumen, Konzentration, Motilität und Anteil morphologisch abnormer Spermien) wird routinemäßig durchgeführt. Sie ist zwar hilfreich, um eindeutige Fälle von Infertilität oder Subfertilität zu eliminieren. Eine eindeutige Vorhersage der Fruchtbarkeit in vivo ist jedoch damit nicht möglich.

2.4.1.1 Motilität

Korrelationen zwischen Spermienmotilität und Fertilität in vivo wurden in vielen Untersuchungen bestimmt, entweder subjektiv oder mit Hilfe der Computer-Bildanalyse. Die Ergebnisse variieren jedoch sehr stark (Tab. 3).

Tab. 3: Beispiele aus der Literatur für signifikante Korrelationen der Spermienmotilität mit der in vivo Fruchtbarkeit (NRR, kompetitiver Fertilitätsindex)

Autor	Methode	r
Amann, 1989	CellSoft	0,34
Bailey et al., 1994	HTMA	keine Korrelation
Brahmkshtri et al., 1999	subjektiv	0,21 (Konzeptionsrate)
Budworth et al., 1987	Semiautomatische mikrocomputerphotographische Methode	0,82 bzw. 0,83 (kompetitiver Fertilitätsindex)
Budworth et al., 1988	CellSoft	0,34 bzw. 0,17 (NRR) 0,86 bzw. 0,78 (Fertilitätsindex)
Correa et al., 1997	Sperm Quality Analyser	0,53
Farrell et al., 1998	CASA	$r^2 = 0,34 \rightarrow$ Motilität $r^2 = 0,98 \rightarrow$ Kombination aus 5 Motilitätseigenschaften
Januskauskas et al., 2000b	subjektiv	0,53
Januskauskas et al., 2001	subjektiv CASA	0,66 – 0,67 0,53 – 0,57
Januskauskas et al., 2003	subjektiv CASA	0,52 – 0,59 0,43 – 0,61
Kjaestadt et al., 1993	subjektiv	0,55
Miller et al., 1985	subjektiv	keine Korrelation
Palma et al., 1996	CASA	keine Korrelation
Söderquist et al., 1991	subjektiv	0,04 – 0,21
Zhang et al., 1998	SM-CMA	0,45 – 0,59 \rightarrow LIN post-thaw 0,43 – 0,63 \rightarrow MOT nach SU

2.4.1.2 Morphologie

Auch die Bestimmung der Morphologie gibt meist nur Hinweise auf die Fruchtbarkeit des Spermas. Barth et al. (1992) stellten fest, daß Sperma mit einem hohen Anteil von Spermien, deren Köpfe in der postakrosomalen Region extrem verschmälert sind („Birnenköpfe, pyriform heads“) eine signifikant geringere Fertilität in vivo erreicht. Eine signifikante negative Korrelation ($r = -0,38$) zwischen dem Anteil abnormer Köpfe und der NRR konnten Söderquist et al. (1991) beobachten. Correa et al. (1997) fanden eine Korrelation von $r = 0,59$ zwischen dem Anteil morphologisch normaler Spermien und der NRR.

2.4.1.3 Membranintegrität

Eine intakte Plasmamembran der Spermien gilt als wesentliche Voraussetzung für die Befruchtungsfähigkeit (Waberski et al., 1999). Die Membranintegrität läßt sich durch Färbungen mit verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen, wie Propidiumiodid, Carboxyfluoreszeindiacetat, SYBR-14 oder Hoechst 33258 darstellen. Die intakte Plasmamembran verhindert das Eindringen der nicht permeablen Farbstoffe bzw. das Austreten von Reaktionsprodukten permeabler Farbstoffe. Januskauskas et al. (2000b) fanden eine signifikante Korrelation ($r = 0,59$) zwischen der Membranintegrität, evaluiert durch Färbung mit SYBR-14, und der NRR. Ericsson et al. (1993) konnten mit Carboxyfluoreszeindiacetat jedoch keine Korrelation beobachten.

Eine andere Methode ist der Hypoosmotische Schwelltest (HOS-Test). Intakte Spermien reagieren in einem hypotonen Medium mit einer Zunahme des Zellvolumens, die mit charakteristischer Schwellung und Aufrollung des Spermischwanzes einhergeht. Correa et al. (1997) erhielten eine signifikante Korrelation ($r = 0,59$) von NRR und geschwollenen Spermien.

Annexin V bindet an Phosphatidylserinreste der Plasmamembran. Diese befinden sich normalerweise auf der Innenseite der Doppellipidschicht. Wird die Zelle durch den Streß des Tiefgefrierens und Wiederauftauens jedoch beeinträchtigt, treten Translokationen auf, lange bevor die Plasmamembran so sehr geschädigt ist, daß sie für andere Farbstoffe permeabel wird. Annexin V markiert die auf die Außenseite der Plasmamembran gewanderten Phosphatidylserinreste und ist somit ein sensiblerer Detektor für Membranschädigungen. Der Anteil der Annexin V-negativen, toten Zellen korrelierte negativ ($r = -0,4$ bis $-0,56$) mit der NRR (Januskauskas et al., 2003).

2.4.1.4 Kerneigenschaften (Chromatinstruktur)

Der Spermienchromatinstruktur-Assay (SCSA) nützt die metachromatischen Eigenschaften von Akridinorange, um die Empfänglichkeit von Spermienchromatin-DNA gegenüber säureinduzierter Denaturierung darzustellen. Behandlung mit erniedrigtem pH verursacht bei Spermien mit veränderter Chromatinstruktur die Denaturierung der DNA. Unter Bestrahlung mit Licht von 488 nm Wellenlänge fluoresziert Akridinorange grün, wenn es an doppelsträngige DNA bindet, und rot, wenn es an einzelsträngige (denaturierte) DNA

bindet. Die Auswertung erfolgt flowzytometrisch. Der Index der DNA-Denaturierung pro Zelle wird durch das Verhältnis der Rotfluoreszenz zur Gesamtfluoreszenz (= rote + grüne Fluoreszenz) dargestellt und als α_t (heute: DNA-Fragmentationsindex, DFI) bezeichnet. Die Standardabweichung ($SD\alpha_t$), der Variationskoeffizient ($CV\alpha_t$) und der Anteil der Zellen außerhalb der normalen Population ($COMP\alpha_t$ = "cells outside the main population") der α_t -Verteilung quantifizieren das Ausmaß der Denaturierung einer Probe (Ballachey et al., 1987).

Ballachey et al. (1987) erhielten eine signifikante negative Korrelation von $SD\alpha_t$ ($r = -0,58$ bzw. $-0,65$) und $COMP\alpha_t$ ($r = 0,40$ bzw. $-0,53$) mit einem Fertilitätsranking bzw. den NRR. In einem späteren Versuch (Ballachey et al., 1988) wurde die in vivo Fruchtbarkeit durch heterosperme Insemination determiniert und korrelierte signifikant negativ mit $COMP\alpha_t$ ($r = -0,74$), dem Mittelwert von α_t ($r = -0,81$) und $SD\alpha_t$ ($r = -0,94$).

Evenson und Jost (2000) konnten $COMP\alpha_t$ -Werte von 0-15 %, 16-29% und > 30% Bullen mit hoher, mittlerer und niedriger Fertilität zuordnen.

Eine signifikante Korrelation zwischen $COMP\alpha_t$ und NRR ($r = -0,53$; bzw. $r = -0,33$ bis $-0,51$) konnten Januskauskas et al. (2001 bzw. 2003) feststellen, während bei Sailer et al. (1996) $SD\alpha_t$ mit einem Fertilitätsranking signifikant korrelierte ($r = 0,617$).

2.4.1.5 Sonstiges

Kandell et al. (1992) berichteten, daß Spermien von Bullen mit höherer in vivo Fertilität eine größere Affinität zu Heparin aufweisen, und daß Heparin bei ihnen in höherem Maße die Kapaziation und die Akrosomenreaktion stimuliert. Die Ursache hierfür seien Heparin-bindende Proteine aus dem Seminalplasma. Die Autoren untersuchten das Vorkommen des Proteins mit der höchsten Affinität für Heparin (B5) und stellten fest, daß B5 bei den Bullen mit der höchsten Fertilität nur in der Spermienmembran, bei den Bullen mit der niedrigsten Fertilität dagegen nur im Seminalplasma vorhanden war. Bei den Bullen mit erniedrigter Fruchtbarkeit kam B5 entweder in beidem oder gar nicht vor.

Auch Marx und Ax (1985) beobachteten eine signifikant höhere Heparinbindungsfähigkeit von TG-Sperma bei der Gruppe der Bullen mit höherer NRR als bei der Gruppe mit niedrigerer NRR. Die Anzahl der Bindungsstellen für Heparin unterschied sich jedoch

nicht zwischen den Bullen. Dagegen konnten Merkies et al. (2000) keine Korrelation der Gesamtmenge an gebundenem Heparin und der NRR feststellen.

Auf der Suche nach Proteinmarkern im Seminalplasma, die Hinweise auf die Fruchtbarkeit geben könnten, entdeckten Killian et al. (1993), daß das Seminalplasma von Bullen mit höherer Fertilität signifikant mehr eines 26 kDa- und eines 55 kDa-Proteins enthielt als das von Bullen mit niedrigerer Fertilität, während im Seminalplasma von letzteren signifikant größere Mengen zweier 16 kDa-Proteine enthalten waren. Aufgrund biochemischer Eigenschaften vermuteten die Autoren, daß es sich dabei um Phospholipase A₂ und die Heparin-bindenden Proteine BSP-A1, BSP-A2 und BSP-A3, die während der Ejakulation an Cholinphospholipide der Plasmamembran binden und den Cholesterolefflux fördern, handelt.

2.4.2 Spermienfunktionstests

Um die Spermaqualität adäquat zu beurteilen, muß auch die funktionelle Kompetenz der Spermien miteinbezogen werden, wie die Fähigkeit, die Kapazitation zu durchlaufen, auf einen geeigneten Stimulus die Akrosomenreaktion durchzuführen, an die Zona pellucida zu binden, die Eizelle zu penetrieren und einen männlichen Vorkern auszubilden. Zuletzt läßt auch die Entwicklungskompetenz des aus der Zygote entstehenden Embryos Rückschlüsse auf die Spermienqualität zu. Die Untersuchung der Spermienfunktion hat sich für die Vorhersage der Fruchtbarkeit als von größerem Wert erwiesen als die Bewertung einzelner Spermaparameter.

2.4.2.1 Kapazitation und Akrosomenreaktion

Die Akrosomenreaktion kann *in vitro* durch die Inkubation mit kapazitierenden Zusätzen (z.B. Heparin, Chondroitinsulfat) spontan ablaufen oder durch verschiedene Stimulanzen (z.B. A23187) induziert werden. Da nur kapazitierte Spermien die Akrosomenreaktion durchlaufen können, gibt die Akrosomenreaktion gleichzeitig auch einen Hinweis auf die Kapazitation.

Blottner et al. (1990) inkubierten Spermien 30 Minuten mit 10 µg/ml Heparin und induzierten dann die Akrosomenreaktion mit Hyamin 2389. Der Anteil der Spermien mit einer induzierten Akrosomenreaktion korrelierte signifikant mit der NRR ($r = 0,607$).

Januskauskas et al. (2000a) konnten keine Korrelation zwischen NRR und Heparin-induzierter Kapazitation bzw. Akrosomenreaktion feststellen, obwohl die Frequenz von Kapazitation und Akrosomenreaktion nach 60 minütiger Inkubation mit 5 µg/ml Heparin signifikant anstieg.

Whitfield und Parkinson (1992) inkubierten Spermien 6 Stunden lang mit 10 µg/ml Heparin und entdeckten eine signifikante Korrelation ($r = 0,86$) des prozentualen Anstiegs der akrosomenreagierten Spermien mit der NRR.

Ax et al. (1985) teilten 8 Bullen in zwei Fertilitätsgruppen ein und inkubierten deren Samenproben mit verschiedenen Konzentrationen von Chondroitinsulfat. Sie stellten fest, daß die Spermien der Bullen aus der höheren Fertilitätsgruppe mit einem signifikant höheren Anstieg der Akrosomenreaktion auf die Inkubation mit 10 und 50 µg/ml Chondroitinsulfat reagierten.

Lenz et al. (1988) inkubierten Bullensperma mit 50 µg/ml Chondroitinsulfat und maßen den Anstieg der Akrosomenreaktion. Sie erstellten aus den erhaltenen Werten von 8 Bullen mit bekannter NRR eine polynomische Regressionslinie. Anschließend verglichen sie die Werte von 18 Bullen mit unbekannter Fertilität mit diesen Daten, und berechneten daraus eine NRR. Die Werte der berechneten NRR und der nach KB tatsächlich erzielten NRR korrelierten signifikant ($r = 0,98$ für die Referenzbullen; $r = 0,81$ für Referenz- und Testbullen).

Graham und Foote (1987a) lösten die Akrosomenreaktion mit Dilauroylphosphatylcholin (PC12)-Liposomen aus. Sie stellten fest, daß Frischsamen von Bullen mit höherer Fertilität weniger PC12 benötigt, um die Akrosomenreaktion zu induzieren, als Samen von Bullen mit niedrigerer Fertilität. Der Anteil akrosomenreagierter Spermien korrelierte signifikant mit der NRR (r bis zu $-0,77$). Bei der Verwendung von TG-Sperma (Graham und Foote 1987b) brauchten Spermien von Bullen mit niedrigerer Fertilität weniger PC12 zur Auslösung der Akrosomenreaktion als die von Bullen mit höherer Fertilität. Der Anteil akrosomenreagierter Spermien korrelierte signifikant mit der NRR (r bis zu $-0,85$).

Whitfield und Parkinson (1995) inkubierten Bullenspermien 1 Stunde lang mit 1 μM Calcium-Ionophor A23187. Der Anstieg der induzierten Akrosomenreaktion im Vergleich zu einer unbehandelten Kontrollprobe korrelierte signifikant ($r = 0,86$) mit der NRR. Auch die auf der Basis des Anstieges der Akrosomenreaktion vorhergesagten NRR korrelierten signifikant mit den tatsächlichen NRR.

Januskauskas et al. (2000b) lösten die Akrosomenreaktion mit 1 μM A23187 aus und fanden eine signifikante Korrelation ($r = 0,60$) des Anteils akrosomenreagerter Spermien mit zurückbleibender Fluoreszenz am Äquatoralsegment. Diese Veränderung konnte jedoch nur mit dem Mikroskop gemessen werden, da sie nicht vom Flowzytometer erfaßt wurde.

Durch die Kryokonservierung des Spermas (verdünnen, kühlen, tiefgefrieren und wieder auftauen) kommt es zu Schädigungen in der Plasmamembran, die den strukturellen Veränderungen bei der Kapazitation ähneln (Cormier et al., 1997). Da die Kapazitation die Membran destabilisiert (Langlais und Roberts, 1985), ist anzunehmen, daß frühzeitig kapazitierte Spermien eine verkürzte Lebensspanne und ein vermindertes Befruchtungspotenzial haben (Watson, 1995). Im Vergleich zu Frischsamen werden mit TG-Sperma achtmal soviel lebende Spermien benötigt, um vergleichbare Fertilisationraten nach KB zu erreichen (Shannon und Vishwanath, 1995). Tatsächlich stellten Thundatil et al. (1999) fest, daß der Anteil lebender unkapazitierter Spermien in TG-Sperma signifikant mit der NRR korrelierte ($r = 0,5$), während der Anteil der akrosomenreagierten Spermien eine negative Korrelation mit der NRR aufwies.

Bei der Untersuchung der Akrosomenreaktion konnten Saacke und White (1972) beobachten, daß der Anteil akrosomenintakter Spermien in TG-Sperma mit der NRR korrelierte ($r = 0,81$), und daß die Korrelation mit zunehmender Inkubation der Spermien zunahm. Ebenso korrelierte der Anteil akrosomenintakter Spermien in Frischsamen mit den Ergebnissen einer heterospermen Insemination (Saacke et al., 1980). Dagegen konnten weder Bousquet et al. (1983), Cumming (1995) noch Brahmkshtri et al. (1999) eine signifikante Korrelation des Anteils akrosomenintakter Spermien nach dem Auftauen mit der NRR feststellen. Collin et al. (2000) ermittelten bei TG-Sperma nach dem Auftauen jedoch eine signifikante Korrelation ($r = 0,44$) des Anteils akrosomenreagerter Spermien mit der NRR.

2.4.2.2 Zona pellucida – Bindungstest

Fazeli et al. (1993) entwickelten einen Zona pellucida-Bindungstest, um die Fertilität von Bullensperma vorherzusagen. Sie verglichen die Anzahl gebundener Spermien der Probanden mit der Anzahl einer Kontrollprobe und erstellten aus den Ergebnissen des Quotienten „Anzahl der gebundenen Spermien des Kontrollbullens / Anzahl der gebundenen Spermien des Versuchsbullens“ eine Rangfolge. Sie fanden eine Korrelation zwischen Zona pellucida-Bindungsfähigkeit und Fruchtbarkeit. Dagegen konnten Zhang et al. (1998) mit diesem relativen Index keinen Zusammenhang zwischen Bindungsfähigkeit und Fertilität entdecken, wohl aber zwischen der absoluten Anzahl gebundener Spermien und der Fruchtbarkeit der Bullen ($r = 0,50$).

Mögliche Ursachen dieser unterschiedlichen Ergebnisse könnten in der Variation von Eizellqualität und Spermaaufbereitung begründet sein. Daher entwickelten Braundmeier et al. (2002) einen kompetitiven Test, bei dem die Spermien zweier Proben mit verschiedenen Farbstoffen präpariert und gleichzeitig mit derselben Eizelle inkubiert werden. Durch Serien von Vergleichspaaren konnte eine Rangfolge der Bullen erstellt werden, die jedoch nicht mit den NRR korrelierte. Auch die Ergebnisse einer heterospermen Insemination in vivo wiesen keinen Zusammenhang mit der kompetitiven Bindung in vitro auf.

Anstelle von intakten Eizellen können auch halbierte Zonae pellucidae verwendet werden. Fazeli et al. (1997) erzielten mit diesem sog. Hemizona Assay eine signifikante Korrelation ($r = 0,46$) zwischen dem Hemizona Index (Anzahl der gebundenen Spermien an der Außenseite der Test-Hemizona / Anzahl der gebundenen Spermien an der Außenseite der Kontroll-Hemizona) und den NRR. Der Vorteil dieses Tests liegt darin, daß die beiden Spermaproben anhand derselben Zona direkt verglichen werden können, so daß Unterschiede beim Ergebnis nicht durch die Eigenschaften verschiedener Eizellen bedingt sein können.

2.4.2.3 Befruchtungs- bzw. Penetrationsraten

1976 stellten Yanagimachi et al. fest, daß männliche Spermien nach Präinkubation in einem geeigneten Medium fähig sind, zonafreie Hamstereizellen zu penetrieren. Dazu müssen die Spermien zuvor Kapazitation und Akrosomenreaktion durchlaufen haben.

Brackett et al. (1982b) fanden keinen Unterschied zwischen den Penetrationsraten der Spermien (Frischsamen) eines Bullen mit hoher und eines mit niedriger Fertilität, wenn sie Eizellen von superovulierten Hamstern verwendeten. Bei Eizellen von unbehandelten Hamstern erzielte der Bulle mit der höheren NRR niedrigere Penetrationsraten. In einem ähnlichen Versuch mit TG-Sperma (Bousquet und Brackett, 1982) penetrierte jedoch das Sperma des Bullen mit der höheren NRR mehr zonafreie Eizellen von unbehandelten Hamstern, mit mehr Spermien pro Eizelle, als der Bulle mit der niedrigeren NRR. In einem weiteren Versuch mit dem TG-Sperma von vier Bullen (Bousquet et al., 1983), in dem sich kein Zusammenhang zwischen den NRR und den Penetrationsraten ergab, kamen die Autoren allerdings zu dem Schluß, daß dieser Test zwar nützlich sei, um subfertile Bullen auszufiltern, jedoch – zumindest bei Bullen, deren in vivo Fertilität um weniger als 4 % variiert – damit keine Fruchtbarkeits-Rangfolge erstellt werden könne.

Dagegen berichteten Brahmkshtri et al. (1999) über eine signifikante Korrelation ($r = 0,72$) der Penetrationsrate zonafreier Hamstereizellen mit der Konzeptionsrate, wenn sie TG-Sperma und Eizellen von superovulierten Hamstern verwendeten.

Auch Eaglesome und Miller (1989) stellten fest, daß das TG-Sperma von Bullen mit höherer Fertilität mehr zonafreie Hamstereizellen mit mehr Spermien pro Eizelle penetrierte als das von Bullen mit niedrigerer Fertilität, sich das Verhältnis jedoch umkehrte, wenn sie Frischsamen verwendeten. Die Autoren kamen zu dem Schluß, daß der Penetrationstest mit zonafreien Hamstereizellen nicht mit Frischsamen durchgeführt werden kann, um die Ergebnisse einer künstlichen Besamung mit TG-Samen vorherzusagen.

Davis et al. (1987) fanden mit dem konventionellen Test keine signifikante Korrelation zwischen Penetrationsraten und NRR, obwohl bullenindividuelle Unterschiede sichtbar waren. Daher bedienten sie sich der heterospermen Insemination mit fluoreszenzmarkierten Spermien, um den Samen zweier Bullen direkt miteinander vergleichen zu können, ohne daß die unterschiedliche Qualität der Eizellen das Ergebnis

beeinflussen konnte. Damit erzielten sie eine signifikante Korrelation ($r = 0,90$) zwischen Non-Return- und Penetrationsraten.

Bei diesen Tests stammen die Gameten jedoch nicht von derselben Spezies. Um dieser Problematik (siehe S.19) zu entgehen, entwickelten Henault und Killian (1995) daher einen Penetrationstest mit bovinen Eizellen. Außerdem bedienten sie sich der heterospermen Insemination, um das Spermium von je 2 Bullen, mit verschiedenen Fluorochromen gefärbt, direkt vergleichen zu können. Von den 16 Paarungen zeigte sich bei 13 eine signifikant höhere Penetrationsrate für den Bullen mit der besseren *in vivo* Fertilität. Aus diesen Ergebnissen schlossen die Autoren, daß der heterosperme Penetrationstest mit zonafreien Rindereizellen eine verlässliche Methode sei, um Unterschiede bei der relativen Fertilität von Bullen aufzudecken.

Marquant – Le Guenne et al. (1990) verwendeten verschiedene Heparin-Konzentrationen für die Kapazitation und konnten eine signifikante Korrelation ($r = 0,83$) zwischen den Penetrationsraten von Rindereizellen und den NRR nur bei $0,05 \mu\text{g/ml}$ Heparin feststellen. Dagegen konnte Oghoda et al. (1988) keine Korrelation zwischen Penetrations- und Non-Return-Raten beobachten.

Bei der Kinetik der Spermienpenetration bestehen deutliche Unterschiede zwischen verschiedenen Bullen (Ward et al., 2002). Die Autoren hielten diese Tatsache für einen nützlichen Marker zur Vorhersage der Fertilität *in vivo*, da sie feststellten, daß die Spermien von Bullen mit einer hohen NRR Eizellen deutlich schneller penetrierten als die von Bullen mit einer niedrigen NRR. Dies könnte auch einen Effekt auf die Teilungs- und Blastozystenrate haben, da eine frühe Penetration auch zu einer früheren ersten Zellteilung führt. Die daraus entstehenden Embryonen sind entwicklungsmäßig kompetenter als Embryonen, die sich später geteilt haben (Ward et al., 2002).

2.4.2.4 Teilungs- und Blastozystenraten

Auch auf die weitere Entwicklung der befruchteten Eizelle hat das eingedrungene Spermium einen Einfluß, der sich in Teilungs- und Blastozystenraten niederschlägt.

Palma et al. (1996) verglichen die IVF-Ergebnisse zweier Fertilitätsgruppen miteinander und konnten signifikant höhere Teilungs- und Blastozystenraten bei der Gruppe mit der höheren Fruchtbarkeit beobachten. In der Untersuchung von Zhang et al. (1997) korrelierte

sowohl die Teilungsrate ($r = 0,59$) als auch die Blastozystenrate ($r = 0,35$) signifikant mit der NRR.

Dagegen konnten Schneider et al. (1999) keinen Zusammenhang zwischen den NRR und den Teilungs- und Blastozystenraten ihrer drei Fertilitätsgruppen erkennen, was die Autoren darauf zurückführten, daß die NRR der Tiere zu nahe beieinanderlagen. Ebenso stellten Miller et al. (1985) keine Korrelation von Teilungs- und Blastozystenraten mit der NRR fest.

Shamsuddin und Larsson (1993) fanden zwar eine signifikante lineare Beziehung zwischen den Teilungsraten und den NRR, jedoch keinen Zusammenhang mit der Blastozystenrate.

Da die Blastozystenrate von der Teilungsrate abhängig ist, optimierten Hillery et al. (1990) die Teilungsraten zweier Fertilitätsgruppen von Bullen mit individuellen Heparinkonzentrationen so, daß alle Probanden ca. 70 % erreichten. Die Bullengruppe mit den höheren NRR erzielte daraufhin signifikant höhere Blastozystenraten.

Ward et al. (2001) entdeckten deutliche Unterschiede zwischen verschiedenen Bullen bei der Kinetik der frühen Embryonalentwicklung, gemessen am Zeitpunkt der ersten Zellteilung nach der Insemination. Der Parameter mit der höchsten Korrelation zur NRR war die Teilungsrate 33 h nach der Insemination ($r = 0,69$). Eine ebenfalls signifikante Korrelation ergab sich zwischen der Blastozystenrate an Tag 7 und der NRR.

Bullen haben einen starken Einfluß auf den Anteil der Eizellen, die sich zu Blastozysten entwickeln. Dieser Effekt ist auf den Zeitpunkt der ersten Zellteilung nach der Insemination zurückzuführen. Aus Zygoten, die sich früh teilen, entstehen mehr Blastozysten, von denen auch mehr schlüpfen. Die unterschiedlichen Kinetiken der ersten Zellteilung können nach Meinung der Autoren dazu herangezogen werden, zwischen Bullen mit hoher und Bullen mit niedriger Fertilität in vivo zu differenzieren (Ward et al., 2001).

Der Zeitpunkt der ersten Zellteilung nach Insemination hängt natürlich auch vom Zeitpunkt der Spermienpenetration nach Insemination ab, der ebenfalls von den Bullen beeinflußt wird (siehe Kapitel 2.4.2.3).

2.4.3 Kombinationen von Tests

Oft weisen einzelne Samenparameter keine hohe Korrelation mit der in vivo Fruchtbarkeit auf, sofern das Spermia im normalen Rahmen liegt. Je mehr Parameter jedoch kombiniert werden, desto genauer kann die Vorhersage sein. Da es sich bei der Befruchtung um einen Prozeß handelt, der verschiedene Spermienfunktionen erfordert, ist die Kombination von mehreren Tests zur Korrelation von in vitro und in vivo Fruchtbarkeit sinnvoller.

Während die signifikante Korrelation mit der NRR für die lineare Motilität nach dem Auftauen, die Konzentration motiler Spermien nach Swim up und die Zona pellucida-Bindungsfähigkeit nur $r = 0,59$, $r = 0,63$ bzw. $r = 0,50$ betrug, ergab die Kombination dieser drei Parameter einen Korrelationskoeffizienten von $0,75$ (Zhang et al., 1998). In einem weiteren Versuch korrelierte sogar keine der drei Eigenschaften für sich signifikant mit der NRR (Zhang et al., 1999), durch Kombination dieser und vier weiterer Parameter (Gesamtmotilität nach dem Auftauen, Spermienkonzentration nach Swim up, Teilungs- und Blastozystenrate) berechneten die Autoren jedoch eine geschätzte NRR, die mit der später tatsächlich erzielten NRR höchstsignifikant korrelierte ($r = 0,92$).

Auch Linford et al. (1976) erreichten mit der Kombination der durchgeführten Tests eine bessere Korrelation als mit jedem einzelnen. Die höchste Korrelation ergab sich aus der Verbindung von Zytoplasmatröpfchen im vorderen Teil des Mittelstückes mit der progressiven Motilität bzw. dem Anteil toter Spermien.

Betrachteten Farrell et al. (1998) nur die Gesamtmotilität des Spermias, ergab sich $r^2 = 0,34$. Wurden jedoch bis zu fünf einzelne Motilitätsparameter untereinander kombiniert, erhöhte sich die Korrelation auf $r^2 = 0,98$. Wood et al. (1986) erhielten mit der Verknüpfung von Motilität nach Verdünnung in Kochsalzlösung, Motilität nach dem Auftauen, dem Anteil von Krümmlingen und dem Anteil proximaler Zytoplasmatröpfchen einen Korrelationskoeffizienten von ca. $0,8$ mit der NRR.

Die Kombination von Membranintegrität nach dem Auftauen und dem Kapazitationsstatus nach Swim up ergab in den Untersuchungen von Januskauskas et al (2000b) eine höhere Korrelation mit der NRR ($r^2 = 0,46$) als der beste Einzelparameter (Membranintegrität nach dem Auftauen: $r^2 = 0,39$).

3 Materialien und Methoden

3.1 Zeitlicher Verlauf der Kapazitation, ermessen anhand der induzierten Akrosomenreaktion, sowie Fertilisations- und Polyspermieraten bei Bullen mit unterschiedlichen Non-Return-Raten

3.1.1 Versuchsaufbau und untersuchte Tiere

Es wurde untersucht, ob der zeitliche Verlauf der Spermienkapazitation bei verschiedenen Bullen unterschiedlich ausfällt, und ob diese Unterschiede einen Zusammenhang mit den Non-Return-Raten der Bullen aufweisen.

Dazu wurde TG-Sperma von sechs verschiedenen Bullen unter kapazitierenden Bedingungen inkubiert und zu Beginn und nach 1, 2, 3, 4 und 5 Stunden die Akrosomenreaktion ausgelöst. 300 Spermien wurden zu jedem Zeitpunkt hinsichtlich ihrer Vitalität und ihres akrosomalen Status beurteilt. Pro Bulle wurden fünf Wiederholungen durchgeführt, also insgesamt 1500 Spermien evaluiert.

Es sollte ferner festgestellt werden, ob die Fertilisations- und Polyspermieraten der Bullen individuelle Unterschiede aufweisen und ob diese mit den Non-Return-Raten in Zusammenhang stehen.

Hierzu wurden *in vitro* gereifte Eizellen befruchtet und hinsichtlich ihrer Fertilisations- und Polyspermieraten beurteilt. Pro Bulle wurden 8 Durchgänge durchgeführt und insgesamt ca. 400 Eizellen evaluiert.

Für die Versuche wurde tiefgefrorenes Sperma von sechs geprüften Altbullen der Rasse Deutsches Fleckvieh verwendet. Die Straws enthielten 250 µl (bzw. bei Bulle F 500 µl) Sperma in einem Tris-Eidotter-Verdünner. Die Non-Return-Raten betragen für Bulle A: 50,7 %; Bulle B: 51,4 %; Bulle C: 49,5 %; Bulle D: 60,5 %; Bulle E: 61,9 % und Bulle F 59,1 %.

3.1.2 In vitro Kapazitation der Samenproben

3.1.2.1 Aufbereitung des Spermas

Das Tiefgefriersperma wurde im Wasserbad bei 38°C 15 Sekunden lang aufgetaut. Anschließend wurde es mit der Swim up-Methode aufbereitet. Hierzu wurden 15 ml-Falconröhrchen mit je 1 ml Swim up-Medium (Tab. 4) befüllt und je 100 µl des Spermas vorsichtig unterschichtet. Die beschickten Röhrchen wurden 1 h im Brutschrank bei 100 % Luftfeuchtigkeit, 5 % O₂ und 5 % CO₂ inkubiert. Anschließend wurden die Überstände (ca. 950 µl) mit den aufgeschwommenen Spermien abgenommen, für jeden Bullen gepoolt und 7 Minuten bei 1200 U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen.

Tab. 4: Swim up - Medium

Chemikalie	(100 ml)
Sperm TL–Stammlsg. (Tab. 5)	100 ml
Natriumpyruvat	11 mg
BSA	600 mg
Gentamicin	5 mg

Tab. 5: Sperm TL - Stammlösung

Chemikalie	(100 ml)
NaCl	580 mg
KCl	23 mg
NaHCO ₃	209 mg
NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O	4 mg
Hepes	238 mg
Phenolrot	1 mg
MgCl ₂ x 6 H ₂ O	31 mg
CaCl ₂ x 2 H ₂ O	38,4 mg
Natriumlaktat (Sirup)	368 µl
Embryowasser	100 ml

Das Pellet wurde mit 100 µl Befruchtungsmedium (Tab. 6) resuspendiert. 10 µl der Spermien suspension wurden mit 190 µl destilliertem Wasser verdünnt, damit eine Zählkammer nach Neubauer beschickt und die Konzentration bestimmt. Anschließend wurde die Suspension mit Befruchtungsmedium auf 10×10^6 Spermien/ml eingestellt.

3.1.2.2 In vitro Kapazitation der Spermaproben

Pro Bulle wurden zwölf 15 ml-Falconröhrchen, die je 1 ml Befruchtungsmedium enthielten, vorbereitet. In jedes Röhrchen wurden 100 µl der Spermien suspension suspendiert, mit 200 µl Mineralöl überschichtet und im Brutschrank offen inkubiert.

Tab. 6: Befruchtungsmedium (Fert TALP)

Chemikalie	(100 ml)
NaCl	666,6 µg
KCl	23,8 µg
NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O	7,2 µg
Gentamycin	500 µl
NaHCO ₃	210 µg
Phenolrot	25 µl
Pyruvat	2,9 µg
CaCl ₂ x 2 H ₂ O	30,3 µg
MgCl ₂ x 6 H ₂ O	10 µg
Natriumlaktat (Sirup)	141 µl
BSA faf	400 µg
Heparin	1 mg
Penicillamin	60 ng
Hypotaurin	22 ng
Embryowasser	100 ml

3.1.2.3 Auslösen der Akrosomenreaktion mit Calcium-Ionophor A23187

Die Auslösung der Akrosomenreaktion erfolgte zum Zeitpunkt 0, 1h, 2h, 3h, 4h und 5h. Zudem wurde jedesmal eine Negativkontrolle gemacht.

Die sich in der Zwischenzeit abgesetzten Spermien wurden aufsuspendiert und pro Falconröhrchen 10 µl einer A23187-Lösung (bestehend aus 1 µl Stammlösung (= 5 mM A23187 / 1 L DMSO) + 9 µl Befruchtungsmedium), entsprechend einer Konzentration von 5 µM/l, hinzugegeben. Anschließend wurde 30 Minuten offen im Brutschrank inkubiert. Nach der Inkubation wurde die Spermisuspension in 1,5 ml-Reaktionsgefäße überführt und 8 Minuten bei 2000 U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen.

3.1.2.4 Färbung mit Ethidiummonoazid (EMA)

Das Pellet wurde mit 250 µl einer Lösung, bestehend aus 1,5 ml PBS (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline) mit 2% PVP-40 (Polyvinylpyrrolidon) und 10 µl einer EMA-Stammlösung (= 1 mg Ethidiummonoazid / 1 ml Ethanol abs.), resuspendiert. Die Suspension wurde in 24-Well-Tissue-Culture-Schalen überführt und bei Raumtemperatur auf einem Rüttler zuerst 10 Minuten in Dunkelheit und anschließend 25 Minuten unter einer 60 W-Schreibtischlampe inkubiert.

Zur Entfernung des ungebundenen Farbstoffs wurde die Suspension anschließend wieder in 1,5 ml-Reaktionsgefäße überführt und die Kulturschalen fünf mal mit je 500 µl PBS + 2% PVP-40 gespült. Die auf zwei Reaktionsgefäße verteilten Suspension und Spülflüssigkeit wurden 8 Minuten bei 2000 U/min zentrifugiert, der Überstand abgenommen, die beiden Pellets mit insgesamt 1 ml PBS + 2% PVP-40 resuspendiert und in einem Reaktionsgefäß gepoolt. Wieder wurde 8 Minuten bei 2000 U/min zentrifugiert und der Überstand abgenommen.

3.1.2.5 Färbung mit Fluorisothiozyanat-Pisum sativum Agglutinin (FITC-PSA)

Alle weiteren Schritte wurden nach Möglichkeit im Dunkeln durchgeführt. Mit dem Pellet wurde ein Ausstrich angefertigt und auf einer Wärmeplatte getrocknet. Anschließend wurden die Ausstriche 30 Minuten bei 4°C in absolutem Ethanol fixiert und wieder auf der Wärmeplatte getrocknet.

Die FITC-PSA-Färbelösung wurde jedesmal frisch hergestellt. Dazu wurden zuerst 10 µl FITC-PSA-Stammlösung (= 1 mg FITC-PSA / 1 ml PBS) mit 990 µl PBS gemischt. Anschließend wurden 250 µl von dieser Lösung mit 750 µl PBS gemischt, so daß die endgültige Färbelösung eine Konzentration von 2,5 µg/ml hatte.

Die Ausstriche wurden mit 200 µl der Färbelösung überschichtet und 10 Minuten in einer feuchten Kammer inkubiert. Danach wurde die Färbelösung abgekippt, die Ausstriche mit Aqua dest. abgespült, 5 Minuten in Aqua dest. eingelegt, nochmals abgespült und auf der Wärmeplatte getrocknet.

3.1.2.6 Fluoreszenzoptische Beurteilung der Vitalität und des akrosomalen Zustandes

Die Auswertung erfolgte unter einem inversen Fluoreszenzmikroskop bei einer Wellenlänge von 450 bis 490 nm und 1000facher Vergrößerung. Es wurden 300 Spermien pro Ausstrich beurteilt.

Die Beurteilung erfolgte gemäß Tab. 7.

Tab. 7: Beurteilung der mit FITC-PSA/EMA gefärbten Spermien

Beurteilung	Vitalität	Akrosomenreaktion	Bild
schwach roter Kopf und grüne Kappe	lebend	negativ	1
schwach roter Kopf	lebend	positiv	2
leuchtend roter Kopf und grüne Kappe	tot	negativ	3
leuchtend roter Kopf	tot	positiv	4

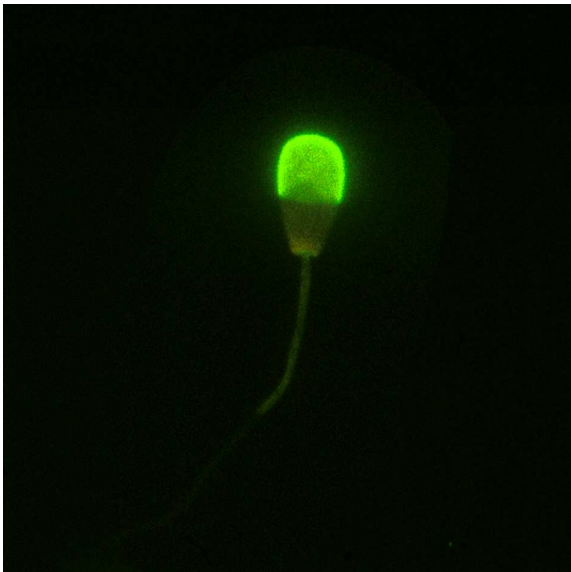


Bild 1: lebend akrosomintakt



Bild 2: lebend akrosomenreagiert

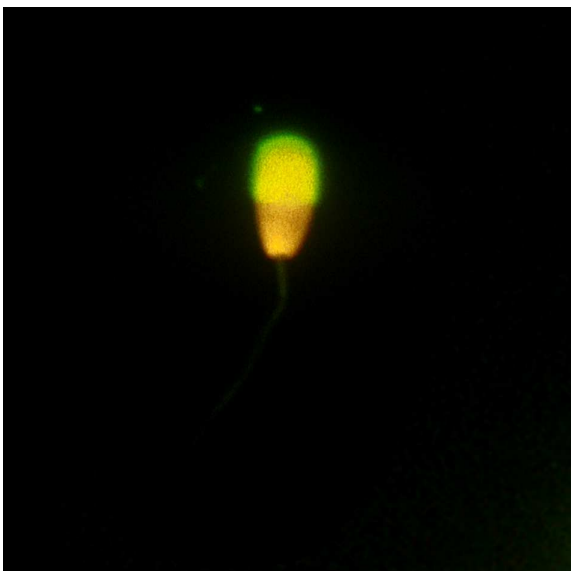


Bild 3: tot akrosomintakt

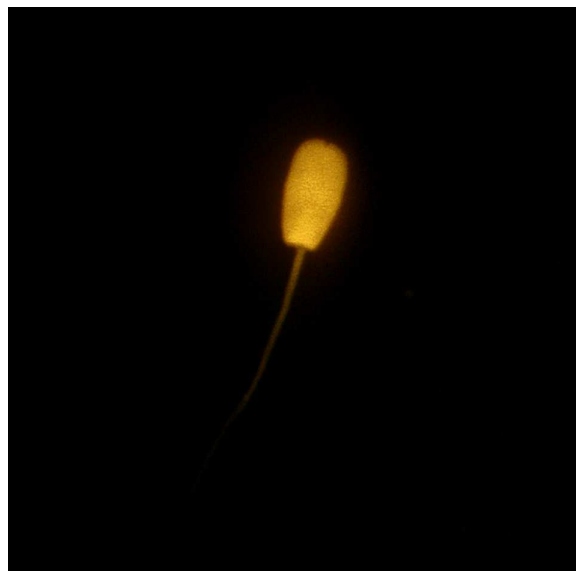


Bild 4: tot akrosomenreagiert

3.1.3 In vitro Fertilisation

3.1.3.1 Eizellgewinnung und -reifung

Zur Gewinnung der Eizellen wurden Ovarien geschlachteter Kühe verwendet. Die frisch entnommenen Eierstöcke wurden von Resten des Eileiters und des Mesovariums befreit und in einer Thermoskanne mit vorgewärmtem PBS transportiert. Im Labor wurden sie mit warmem Wasser und PBS gewaschen und im Wasserbad in PBS aufbewahrt.

Die Eizellgewinnung erfolgte durch Slicing. Der Boden einer großen Petrischale aus Glas wurde mit Slicing-Medium (Tab. 8) bedeckt. Die Oberfläche der Ovarien wurde mit einem Schneidegerät, in das 5 Rasierklingen im Abstand von ca. 1 mm eingespannt sind, bis zu einer Tiefe von ca. 1 bis 2 Millimetern wiederholt eingeschnitten. Die Eizellen wurden mittels einer mit Slicing-Medium gefüllten Tropfflasche aus den Schnitten herausgespült. Der Inhalt der Petrischalen wurde zur Entfernung der gröberen Teile zuerst durch ein Sieb gegossen und dann durch einen Embryonenfilter. Der Rückstand, der die Eizellen und feine Gewebefetzen enthält, wurde mit Slicing-Medium von der Oberfläche des Filters gespült und auf Petrischalen verteilt.

Mit einer selbstgezogenen Glaspipette wurden unter einer Stereolupe die Kumulusoozytenkomplexe herausgesucht und in kleine Petrischalen mit 2,5 ml Slicing-Medium überführt. Anschließend wurden sie noch zweimal im gleichen Medium gewaschen und dabei unter dem Stereomikroskop bei ca. 45facher Vergrößerung auf ihre Qualität (siehe unten) untersucht. Zum Schluß wurden die Kumulusoozytenkomplexe der Qualität 1 bis 3 in einer Petrischale mit Reifungsmedium (Tab. 9) gesammelt. Dann wurden sie in Gruppen zu jeweils 50 - 60 Kumulusoozytenkomplexen auf 4-Well-Schalen verteilt, nachdem sie zuvor noch einmal in Reifungsmedium gewaschen worden waren.

Tab. 8: Slicing - Medium

Cemikalie	(1000 ml)
PBS	1000 ml
Glucose	1,0 g
Na-Pyruvat	36 µg
Penicillin	20 µg
Streptomycin	40 µg
Heparin	11,2 µg
BSA	300 µg
Calciumchlorid	100 µg
Magnesiumchlorid	100 µg

Tab. 9: Reifungsmedium

Cemikalie	(10 ml)
TCM 199	8 ml
FKS	1 ml
EGF	100 ng

Die Kumulusoozytenkomplexe wurden anhand der morphologischen Beschaffenheit von Zytoplasma und Kumuluszellen nach den von Leibfried und First (1979) aufgestellten Kriterien (Tab. 10) klassifiziert.

Tab. 10: Qualitätskategorien der Kumulusoozytenkomplexe

Kategorie	Zytoplasma	Kumulus oophorus
1	dunkel, homogen	kompakt, mindestens fünfzig
2	dunkel, homogen	kompakt, stellenweise weniger als fünf Lagen
3	dunkel, homogen	kompakt, mehrlagig, leichte Zellexpansion
4	enthält schwarze Klümpchen	voll expandiert
5	dunkel oder degeneriert	wenig oder gar keine Zellen

Die Reifung der Kumulusoozytenkomplexe erfolgte 24 h im Brutschrank bei 39°C, 5 % O₂- und 5 % CO₂-Spannung und 100 % Luftfeuchte.

3.1.3.2 In vitro Fertilisation

Spermaaufbereitung und Einstellung der Spermienkonzentration wurden wie in Kapitel 3.1.2.1 durchgeführt.

Anschließend wurden von jedem Bullen 50 µl der Spermisuspension zu je einer Gruppe gereifter Kumulusoozytenkomplexe gegeben, nachdem diese zuvor zweimal in Hepes TALP-Medium (Tab. 11) und einmal in Fert TALP-Medium gewaschen und in eine 4-Well-Schale mit Fert TALP-Medium umgesetzt worden waren. Dies ergab eine Spermienkonzentration von 1×10^6 Spermien/ml.

Tab. 11: Hepes TALP - Medium

Chemikalie	(100 ml)
NaCl	666,6 µg
KCl	23,8 µg
NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O	7,2 µg
Gentamycin	500 µl
NaHCO ₃	16,8 µg
Phenolrot	2 µg
Hepes (freie Säure)	135 µg
Hepes (Natriumsalz)	146,3 µg
Pyruvat	2,9 µg
CaCl ₂ x 2 H ₂ O	30,3 µg
MgCl ₂ x 6 H ₂ O	10 µg
Natriumlaktat (Sirup)	141 µl
BSA V	400 µg
Embryowasser	100 ml

Die Koinkubation von Kumulusoozytenkomplexen und Spermien erfolgte 18-20 Stunden im Brutschrank bei 39°C, 5 % CO₂-Spannung und 100 % Luftfeuchte.

3.1.3.3 Denudieren der Eizellen

Die Gruppen fertilisierter Kumulusoozytenkomplexe wurden in mit 2 ml Hepes SOF-Medium (Tab. 12) befüllte 15-ml-Falconröhrchen überführt und durch zweiminütiges

Vortexen von den Resten des Kumulus befreit. Nach zweimaligem Waschen in Hepes SOF-Medium wurden die denudierten Eizellen für die Lacmoidfärbung vorbereitet.

Tab. 12: Hepes SOF – Medium

Chemikalie	(100 ml)
NaCl	629,4 µg
KCl	53,4 µg
KH ₂ PO ₄	16,2 µg
NaHCO ₃	42 µg
Phenolrot	5 µl
Hepes (freie Säure)	240 µg
Hepes (Natriumsalz)	260 µg
Pyruvat	3,6 µg
CaCl ₂ x 2 H ₂ O	25,2 µg
Natriumlaktat (Sirup)	47 µl
MgCl ₂ x 6 H ₂ O	10 µg
Glukose	27 µg
Penicillin	3,9 mg
Streptomycin	7,98 mg
BSA V	400 µg
Embryowasser	100 ml

3.1.3.4 Färbung der Eizellen mit Lacmoid

Ca. 20 denudierte Eizellen wurden mittels einer Glaspipette mit möglichst wenig Medium in einer Reihe in die Mitte eines Objektträgers gesetzt. Anschließend wurde ein Deckgläschen auf die zuvor an den Rändern des Objektträgers aufgetragenen Vaselinlinien aufgesetzt und vorsichtig angedrückt, bis es Kontakt zum Medium bekam, ohne die Oozyten zu zerdrücken. Die Objektträger wurden für 24 h in eine Färbebox mit Fixierlösung (Ethanol absolut : Eisessig = 3:1) gesetzt. Danach wurden sie für 30 Minuten in absoluten Ethanol gelegt. Zur Färbung wurde an einen Rand des Deckgläschens ein Tropfen einprozentige Lacmoidfärbelösung gesetzt, welcher mittels Kapillarreaktion zwischen Deckglas und Objektträger hindurchläuft. Nach einer Einwirkzeit von fünf

Minuten wurde die überflüssige Lacmoidlösung mit Entfärbelösung (Eisessig : Glycerol : Aqua bidestillata = 1:1:3) auf gleiche Weise herausgespült.

3.1.3.5 Beurteilung der Eizellen

Die gefärbten Eizellen wurden mit einem Phasenkontrast-Mikroskop bei 400-facher Vergrößerung untersucht und hinsichtlich ihres Fertilisations- und Polyspermiezustandes beurteilt. Dabei galten Eizellen, die zwei Vorkerne oder einen Vorkern und ein eingedrungenes Spermium aufwiesen, als regulär fertilisiert (Bild 5), während Eizellen, die mehr als 2 Vorkerne (Bild 6) oder 2 Vorkerne und ein oder mehrere Spermien enthielten, als polysperm klassifiziert wurden.

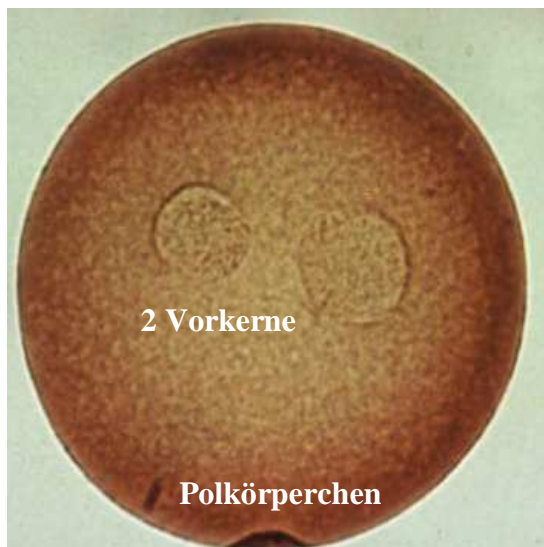


Bild 5: regulär fertilisierte Eizelle

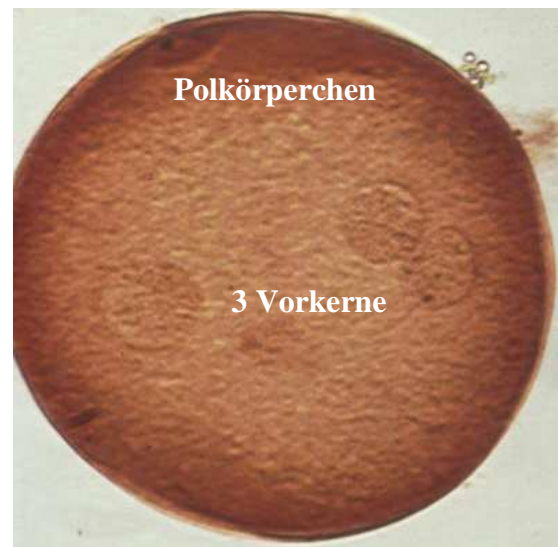


Bild 6: polysperm penetrierte Eizelle

3.2 Zusammenhang zwischen Spermienkonzentration bei der IVF und Fertilisations-, Polyspermie- und Blastozystenraten

3.2.1 Versuchsaufbau und untersuchte Tiere

Es wurde untersucht, ob Fertilisations-, Polyspermie- und Blastozystenraten bei Verwendung unterschiedlicher Spermienkonzentrationen bullenindividuelle Unterschiede aufweisen. Hierzu wurden Eizellen mit dem Sperma von vier Bullen in je drei verschiedenen Konzentrationen befruchtet. Ein Teil der Eizellen wurde gefärbt und hinsichtlich ihrer Fertilisations- und Polyspermieraten beurteilt (insgesamt ca. 350 Eizellen pro Bulle in 5 bis 6 Versuchsdurchgängen). Die restlichen Eizellen wurden in Kultur gesetzt und am Tag 8 und 9 bezüglich der Blastozystenrate untersucht (insgesamt 400 bis 500 Eizellen pro Bulle in 5 Versuchsdurchgängen).

Für die Versuche wurde tiefgefrorenes Sperma von vier geprüften Altbullen der Rasse Deutsches Fleckvieh verwendet. Die Straws enthielten 500 µl Sperma in einem Tris-Eidotter-Verdünner. Die Non-Return-Raten betragen für Bulle G: 78,1%; Bulle H: 77,4%; Bulle J: 73,1% und Bulle K: 71,0%.

3.2.2 In vitro Fertilisation

Die Aufbereitung des Spermas und die Einstellung der Spermienkonzentration erfolgte wie in Kapitel 3.1.2.1.

Die Gewinnung der Eizellen erfolgte bei diesem Versuch durch Follikelpunktion. Hierzu wurden alle Follikel mit einem Durchmesser von 2 bis 8 mm mit einer 20 G-Kanüle punktiert und die Follikelflüssigkeit mit den Eizellen von je ca. 15 Eierstöcken in 50-ml-Falkonröhrchen mit 15 ml vorgewärmten Holdingmedium (Tab. 13) überführt. Nachdem sich die Eizellen abgesetzt hatten, wurde ein Großteil des Überstand abgenommen und der Rest auf große Petrischalen verteilt. Die Selektion der Kumulusoozytenkomplexe erfolgte wie in Kapitel 3.1.3.1.

Tab. 13: Holding Medium

Chemikalie	(100 ml)
Wasser	90 ml
Medium 199 (10 x)*	10 ml
NaHCO ₃	42 µg
Phenolrot	5µl
Hepes (freie Säure)	180 µg
Hepes (Natriumsalz)	195 µg
Kanamycinsulfat	5 µg
BSA	40 µg

* Das Pulver, das in einem Liter Wasser aufgelöst werden muß, in 100 ml aufgelöst.

Zum Schluß wurden von jedem Bullen 7 µl, 25 µl und 50 µl der Spermiesuspension zu je einer Gruppe gereifter Kumulusoozytenkomplexe gegeben, nachdem diese zuvor zweimal in Hepes TALP und einmal in Fert TALP gewaschen und in eine Vier-well-Schale mit Fert TALP umgesetzt worden waren. Dies ergab eine Spermienkonzentration von $0,14 \times 10^6$, $0,5 \times 10^6$ und 1×10^6 Spermien/ml.

Die Koinkubation von Kumulusoozytenkomplexen und Spermien erfolgte 18-20 Stunden im Brutschrank bei 39°C, 5 % CO₂-Spannung und 100 % Luftfeuchte.

3.2.3 Denudieren der Eizellen und Lacmoidfärbung

Bei diesem Versuch wurden pro Gruppe etwa 40 ungeteilte Oozyten für die Lacmoidfärbung herausgesucht. Färbung und Beurteilung der Eizellen erfolgten wie in Kapitel 0 und 3.1.3.5.

Die restlichen Eizellen wurden einmal in SOF (Synthetic Oviductal Fluid)-Kulturmedium (Tab. 14) gewaschen und in 4-Well-Schalen mit mineralölüberschichtetem SOF-Kulturmedium in Kultur gesetzt.

Tab. 14: SOF-Kulturmedium

Chemikalie	(10 ml)
SOF-Stammlösung	8,7 ml
OCS (10%)	1 ml
BME (essentielle AS)	200 µl
MEM (nicht essent. AS)	100 µl

Tab. 15: SOF-Stammlösung

Chemikalie	(100 ml)
NaCl	629 mg
KCl	53 mg
KH ₂ PO ₄	16 mg
CaCl ₂ x 2 H ₂ O	25 mg
MgCl ₂ x 6 H ₂ O	10 mg
NaHCO ₃	211 mg
Phenolrot	0,13 mg
Pyruvat	3 mg
Glutamin	14,6 mg
Laktat (Sirup)	47 µl
Embryowasser	100 ml

3.2.4 Embryokultur und Beurteilung der Blastozysten

Die Kultur der befruchteten Eizellen erfolgte 7-8 Tage im Brutschrank bei 39°C, 5 % O₂- und 5 % CO₂-Spannung und 100 % Luftfeuchte.

An Tag 8 und 9 wurden die Embryonen bezüglich ihres Entwicklungszustandes untersucht. Gewertet wurden kompakte, expandierte und geschlüpfte Blastozysten.

3.3 Einfluß der Spermaaufbereitung mittels Swim up auf Motilität und Morphologie

Um zu untersuchen, welchen Einfluß die Aufbereitung des Spermias auf einzelne Samenparameter hat, wurden Motilität und Morphologie vor und nach dem Swim up beurteilt.

3.3.1 Motilität

Zur Beurteilung der Spermienmotilität wurde je eine Spermaprobe jedes Bullen aus Kapitel 3.1.1 mittels computergestützter Motilitätsmessung vor und nach dem Swim up beurteilt. Die Vorgehensweise erfolgte wie bei Haake (2001) beschrieben. Es wurden von 12 verschiedenen Gesichtsfeldern einer Probe zehnssekündige Videoaufzeichnungen bei 200facher Vergrößerung im negativen Phasenkontrast gemacht. Diese Videosequenzen wurden anschließend vom Computer digitalisiert und ausgewertet.

3.3.2 Morphologie

Zur Beurteilung der Spermienmorphologie wurden vor und nach dem Swim up von je fünf Spermaproben jedes Bullen aus Kapitel 3.2.1 Ausstriche mit Bromphenolblau-Nigrosin angefertigt. Pro Ausstrich wurden 300 Spermien (insgesamt 1500 Spermien pro Bulle) bei 1000facher Vergrößerung bewertet. Die Beurteilung erfolgte nach Barth und Oko (1989). Dabei wurde zwischen primären Anomalien (Mißbildungen des Kopfes, des Mittelstückes und des Schwanzes) und sekundären Anomalien (abgelöste Köpfe, abgelöste Kopfkappen und Krümmlinge) unterschieden.

3.4 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Statistikprogramm SAS System, Version 6.12. Es wurden Mittelwerte, Standardabweichungen und Korrelationen errechnet und gepaarte T-Tests, Varianzanalysen und Least Square Means-Tests durchgeführt.

4 Ergebnisse

4.1 Zeitlicher Verlauf der *in vitro* Kapazitation, gemessen anhand der induzierten Akrosomenreaktion, sowie Fertilisations- und Polyspermieraten bei Bullen mit unterschiedlichen Non-Return-Raten

4.1.1 *In vitro* Kapazitation

Für die Auswertung der Ergebnisse wurden die Bullen zu Fertilitätsgruppen zusammengefaßt (Tab. 16).

Tab. 16: Einteilung der Bullen in Fertilitätsgruppen

Fertilitätsgruppe	Bulle	NRR	durchschnittliche NRR der Fertilitätsgruppe
Gruppe I	A	50,7 %	50,5 %
	B	51,4 %	
	C	49,5 %	
Gruppe II	D	60,5 %	60,5 %
	E	61,9 %	
	F	59,1 %	

Pro Bulle wurden in 5 Wiederholungen bei insgesamt 1500 Spermien (300 pro Wiederholung) der Anteil der lebenden akrosomenreagierten Spermien beurteilt.

4.1.1.1 Anteil lebender akrosomenreagierter Spermien an allen Spermien

Während der fünfstündigen Inkubation sank der Anteil lebender akrosomenreagierter Spermien, bezogen auf alle Spermien, bei allen Bullen signifikant ab ($p < 0.001$), sowohl bei den Proben, bei denen die Akrosomenreaktion mit Calcium-Ionophor ausgelöst wurde, als auch bei den unbehandelten Proben (Abb. 1).

Ein signifikanter Unterschied zwischen den behandelten und den unbehandelten Proben bestand bei Bulle A zu jedem Zeitpunkt, bei Bulle D zu keinem Zeitpunkt. Bei den übrigen Bullen zeigte sich am Anfang und am Ende der Inkubation ein signifikanter Einfluß der Behandlung mit Calcium-Ionophor (Abb. 1). Die Werte der behandelten Proben lagen

jedoch immer über denen der unbehandelten. In der Gruppe mit der höheren in vivo Fruchtbarkeit (Gruppe I) lagen die Werte der behandelten Proben bis zur ersten Stunde der Inkubation signifikant über denen der unbehandelten ($p = 0,001$), in der Gruppe mit der niedrigeren Fertilität (Gruppe II) war jedoch zu keinem Zeitpunkt ein signifikanter Unterschied vorhanden (Tab. 17).

Die Werte der einzelnen Bullen unterschieden sich in beiden Behandlungsgruppen (mit und ohne A23187) bis zum Schluß signifikant voneinander ($p < 0,001$) (Abb. 1). Wurden die Bullen zu Fertilitätsgruppen zusammengefaßt, lagen bei den unbehandelten Spermien die Werte von Gruppe I bis zur ersten Stunde der Inkubation signifikant unter denen von Gruppe II, bei den Ionophor-behandelten Spermien unterschieden sich die beiden Gruppen jedoch zu keinem Zeitpunkt signifikant (Tab. 17).

Tab. 17: Lebende akrosomenreagierte Spermien - Anteil in % von allen Spermien; Werte von Gruppe I * und Gruppe II ** ohne und mit Zusatz von A23187; MW \pm STABW

Inkubations- dauer in Stunden	Gruppe I		Gruppe II	
	ohne A23187	mit A23187	ohne A23187	mit A23187
0	65,1 \pm 9,2 ^{aA}	85,5 \pm 3,6 ^b	71,1 \pm 11,9 ^B	70,1 \pm 2,8
1	66,8 \pm 9,3 ^{aA}	81,5 \pm 6,8 ^b	68,8 \pm 7,5 ^B	69,3 \pm 3,8
2	63,6 \pm 6,6	67,6 \pm 9,4	64,9 \pm 10,0	65,7 \pm 11,3
3	55,6 \pm 4,9	59,5 \pm 8,9	54,6 \pm 11,9	57,3 \pm 12,0
4	44,3 \pm 2,8	50,6 \pm 12,6	36,4 \pm 16,4	44,1 \pm 10,4
5	34,0 \pm 7,3	43,1 \pm 11,4	24,6 \pm 20,8	28,8 \pm 18,3

* Gruppe I: Bulle A – C (\emptyset NRR 60,5 %) **Gruppe II: Bulle D – F (\emptyset NRR 50,5 %)

verschiedene Indizes in einer Zeile kennzeichnen signifikante Unterschiede

a, b \rightarrow Unterschiede zwischen "ohne A23187" und "mit A23187" in Gruppe I

A, B \rightarrow Unterschiede zwischen Gruppe I und Gruppe II in der Kategorie "ohne A23187"

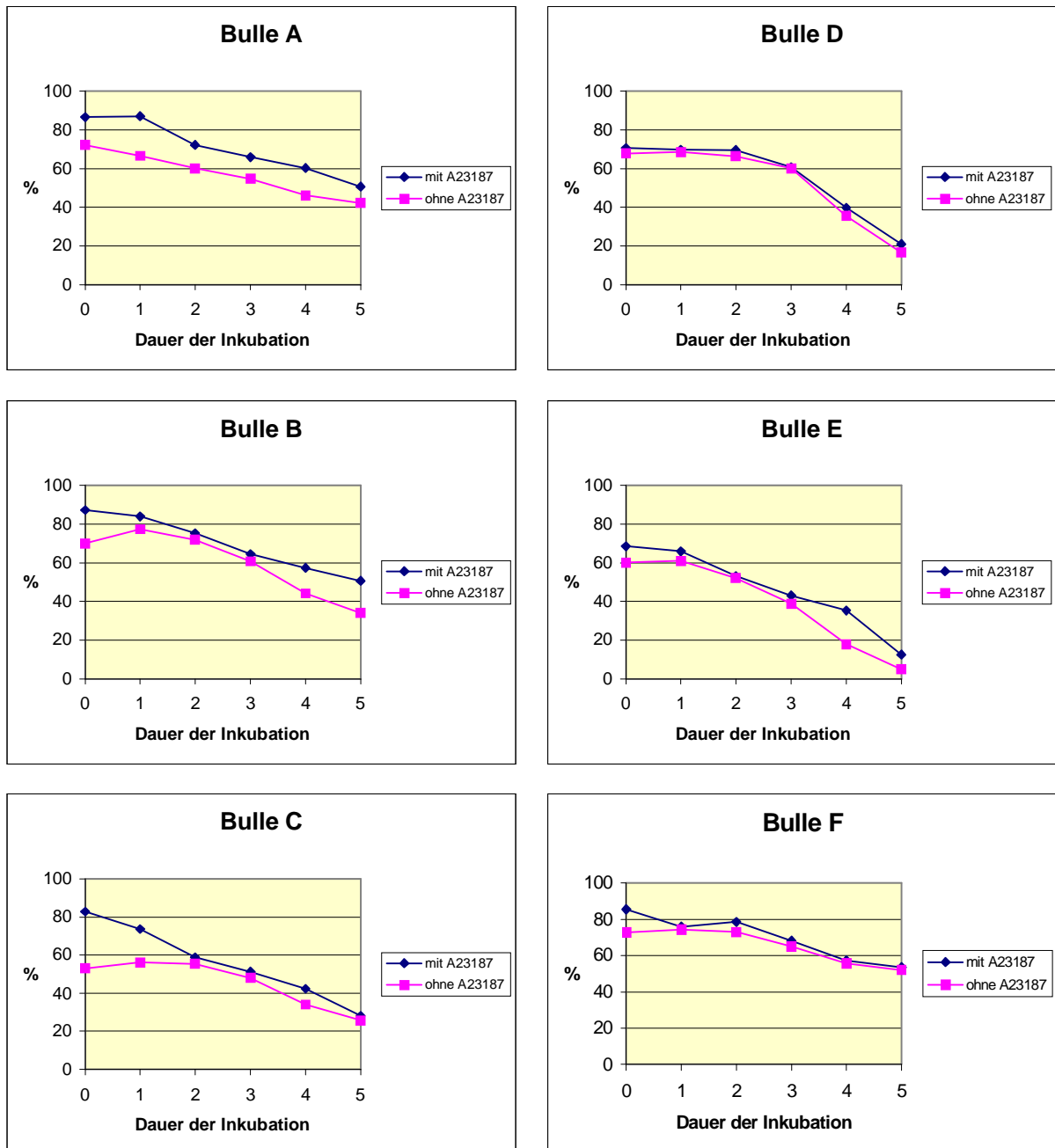


Abb. 1: Lebende akrosomenreagierte Spermien - Anteil in % von allen Spermien;
 Bulle A – C: Ø NRR 60,5 %; Bulle D – F: Ø NRR 50,5 %;
 Mittelwerte mit und ohne Zusatz von A23187;

Eine signifikante Korrelation mit der NRR bestand nur für die Werte der mit Calcium-Ionophor behandelten Proben zum Zeitpunkt Null ($r = 0,96$; $p < 0,01$).

Der Anteil lebender akrosomenreagerter Spermien sank nicht deswegen, weil immer weniger lebende Spermien die Akrosomenreaktion durchliefen, sondern weil der Anteil lebender Spermien mit zunehmender Dauer der Inkubation kontinuierlich abnahm. Im

Folgenden werden deshalb die lebenden akrosomenreagierten Spermien, ausgedrückt als Anteil an allen lebenden Spermien, dargestellt.

4.1.1.2 Anteil lebender akrosomenreagerter Spermien an allen lebenden Spermien

Während der fünfstündigen Inkubation stieg der Anteil akrosomenreagerter Spermien bezogen auf die lebenden Spermien bei allen Bullen signifikant an ($p < 0.001$), sowohl bei den Proben, bei denen die Akrosomenreaktion mit Calcium-Ionophor ausgelöst wurde, als auch bei den unbehandelten Proben (Abb. 2).

Ein signifikanter Unterschied zwischen den Ionophor-behandelten Spermaproben und den unbehandelten Proben bestand für Bulle A und C bis zum Zeitpunkt 4, für Bulle B bis Zeitpunkt 1, Bulle E nur zum Zeitpunkt 2 und 3. Bei Bulle F hatte die Behandlung mit Calcium-Ionophor nur vor Beginn der Inkubation einen signifikanten Einfluß und bei Bulle D war zu keinem Zeitpunkt ein signifikanter Effekt festzustellen (Abb. 2). Die Werte der behandelten Proben lagen jedoch immer über denen der unbehandelten. In Gruppe I lagen die Werte der behandelten Spermien bis zum Ende der Inkubation signifikant über denen der unbehandelten Spermien ($p < 0,05$), in Gruppe II war jedoch zu keinem Zeitpunkt ein signifikanter Unterschied erkennbar (Tab. 18).

Die Werte der einzelnen Bullen unterschieden sich in beiden Behandlungsgruppen (mit und ohne A23187) bis zur dritten Inkubationsstunde signifikant voneinander ($p < 0,001$) (Abb. 2). Wurden die Bullen zu Fertilitätsgruppen zusammengefaßt, lagen bei den unbehandelten Spermien die Werte von Gruppe I bis zur ersten Stunde der Inkubation signifikant unter denen von Gruppe II, bei den Ionophor-behandelten Spermien jedoch bis zur dritten Inkubationsstunde über den Werten von Gruppe II (Tab. 18).

Eine signifikante Korrelation mit der NRR bestand nur für die Werte der mit Calcium-Ionophor behandelten Proben zum Zeitpunkt Null ($r = 0,9$; $p < 0,05$).

Tab. 18: Lebende akrosomenreagierte Spermien - Anteil in % von allen lebenden Spermien; Werte von Gruppe I * und Gruppe II ** ohne und mit Zusatz von A23187; MW \pm STABW

Inkubations- dauer in Stunden	Gruppe I		Gruppe II	
	ohne A23187	mit A23187	ohne A23187	mit A23187
0	77,6 \pm 7,6 ^{aC}	94,8 \pm 1,3 ^{bA}	84,5 \pm 3,4 ^D	88,3 \pm 7,2 ^B
1	83,1 \pm 6,9 ^{aC}	95,9 \pm 1,6 ^{bA}	90,7 \pm 2,8 ^D	91,1 \pm 4,4 ^B
2	89,3 \pm 5,6 ^a	97,0 \pm 1,7 ^{bA}	96,6 \pm 3,0	94,9 \pm 3,4 ^B
3	93,2 \pm 4,4 ^a	98,9 \pm 0,9 ^{bA}	99,0 \pm 1,7	97,4 \pm 2,9 ^B
4	96,3 \pm 3,5 ^a	99,9 \pm 0,2 ^b	99,2 \pm 1,4	97,7 \pm 4,1
5	98,5 \pm 2,6 ^a	100,0 \pm 0,0 ^b	100,0 \pm 0,0	100,0 \pm 0,0

* Gruppe I: Bulle A – C (ØNRR 60,5 %) **Gruppe II: Bulle D – F (ØNRR 50,5 %)
 verschiedene Indizes in einer Zeile kennzeichnen signifikante Unterschiede
 a, b \rightarrow Unterschiede zwischen "ohne A23187" und "mit A23187" in Gruppe I
 A, B \rightarrow Unterschiede zwischen Gruppe I und Gruppe II in der Kategorie "mit A23187"
 C, D \rightarrow Unterschiede zwischen Gruppe I und Gruppe II in der Kategorie "ohne A23187"

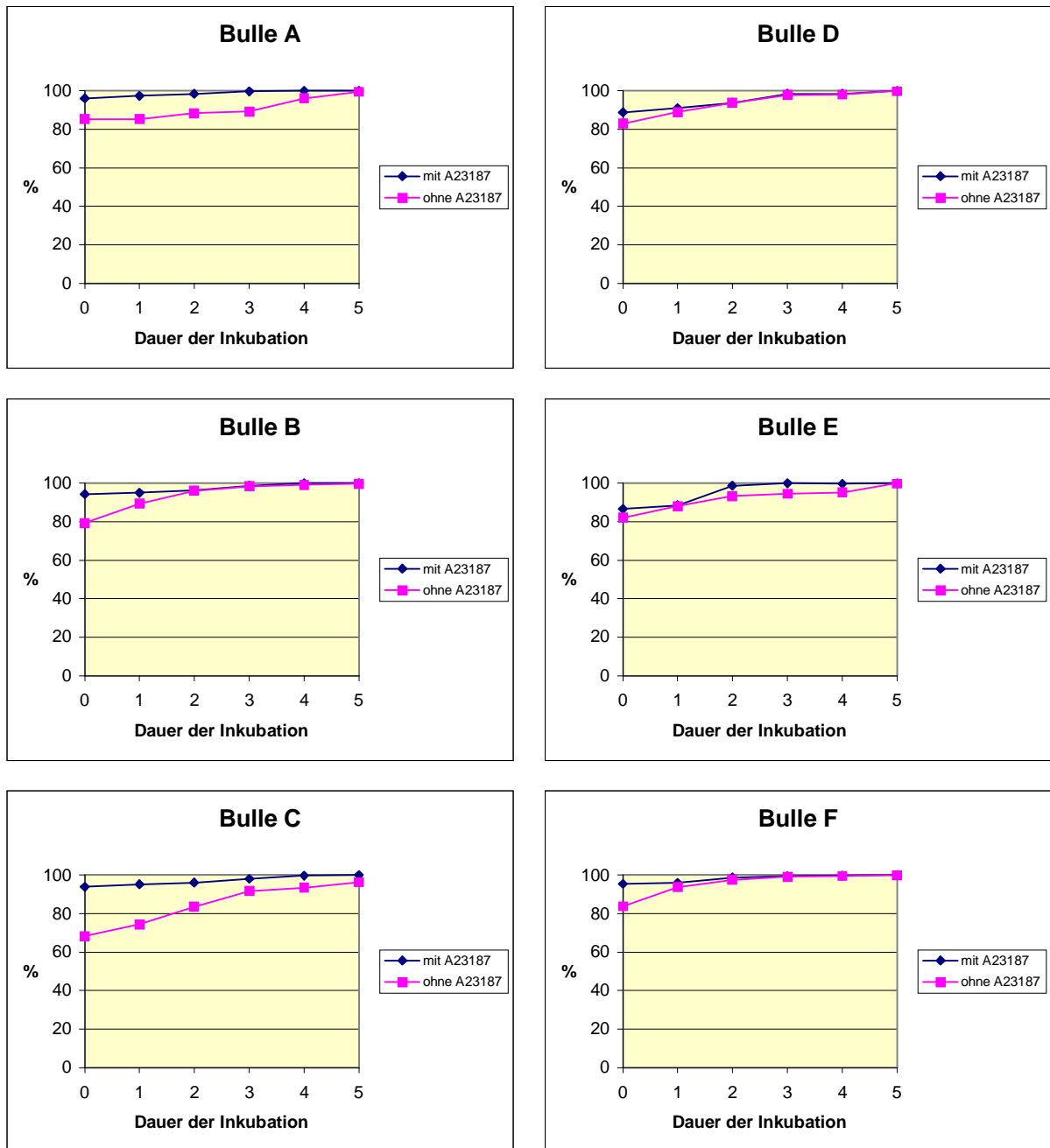


Abb. 2: Lebende akrosomenreagierte Spermien - Anteil in % von allen lebenden Spermien; Bullen A – C: Ø NRR 60,5 %; Bullen D – F: Ø NRR 50,5 %; Mittelwerte mit und ohne Zusatz von A23187;

4.1.1.3 Induzierte Akrosomenreaktion bei den lebenden akrosomenreagierten Spermien (Anteil an allen Spermien)

Im Folgenden soll die induzierte Akrosomenreaktion betrachtet werden, die sich aus der Differenz zwischen den Werten der Proben, bei denen die Akrosomenreaktion mit Calcium-Ionophor ausgelöst wurde, und den Werten der unbehandelten Proben ergibt.

Der zeitliche Verlauf der induzierten Akrosomenreaktion verhielt sich bei den einzelnen Bullen individuell verschieden. Die Werte der einzelnen Bullen unterschieden sich zu jedem Zeitpunkt signifikant ($p < 0,05$) (Abb. 3). Das Ausmaß der induzierten Akrosomenreaktion war bei Gruppe I zum Zeitpunkt 0, 1 ($p = 0,001$), 3 und 5 ($p < 0,05$) signifikant höher als bei Gruppe II (Tab. 19).

Eine signifikante Korrelation der induzierten Akrosomenreaktion mit der NRR war zu keinem Zeitpunkt feststellbar.

Tab. 19: Anteil der Spermien mit induzierter Akrosomenreaktion in %
(lebende akrosomenreagierte Spermien als Prozentsatz von allen Spermien)
Werte von Gruppe I * und Gruppe II **; MW \pm STABW

Inkubations- dauer in Stunden	Gruppe I	Gruppe II
0	20,4 \pm 8,1 ^a	10,3 \pm 4,4 ^b
1	14,8 \pm 7,7 ^a	4,6 \pm 3,8 ^b
2	6,5 \pm 5,3	5,0 \pm 4,2
3	7,4 \pm 4,4 ^a	4,1 \pm 2,9 ^b
4	11,7 \pm 4,2	8,9 \pm 7,2
5	9,5 \pm 6,3 ^a	4,9 \pm 3,5 ^b

* Gruppe I: Bulle A – C (ØNRR 60,5 %)

**Gruppe II: Bulle D – F (ØNRR 50,5 %)

verschiedene Indizes innerhalb einer Zeile kennzeichnen signifikante Unterschiede

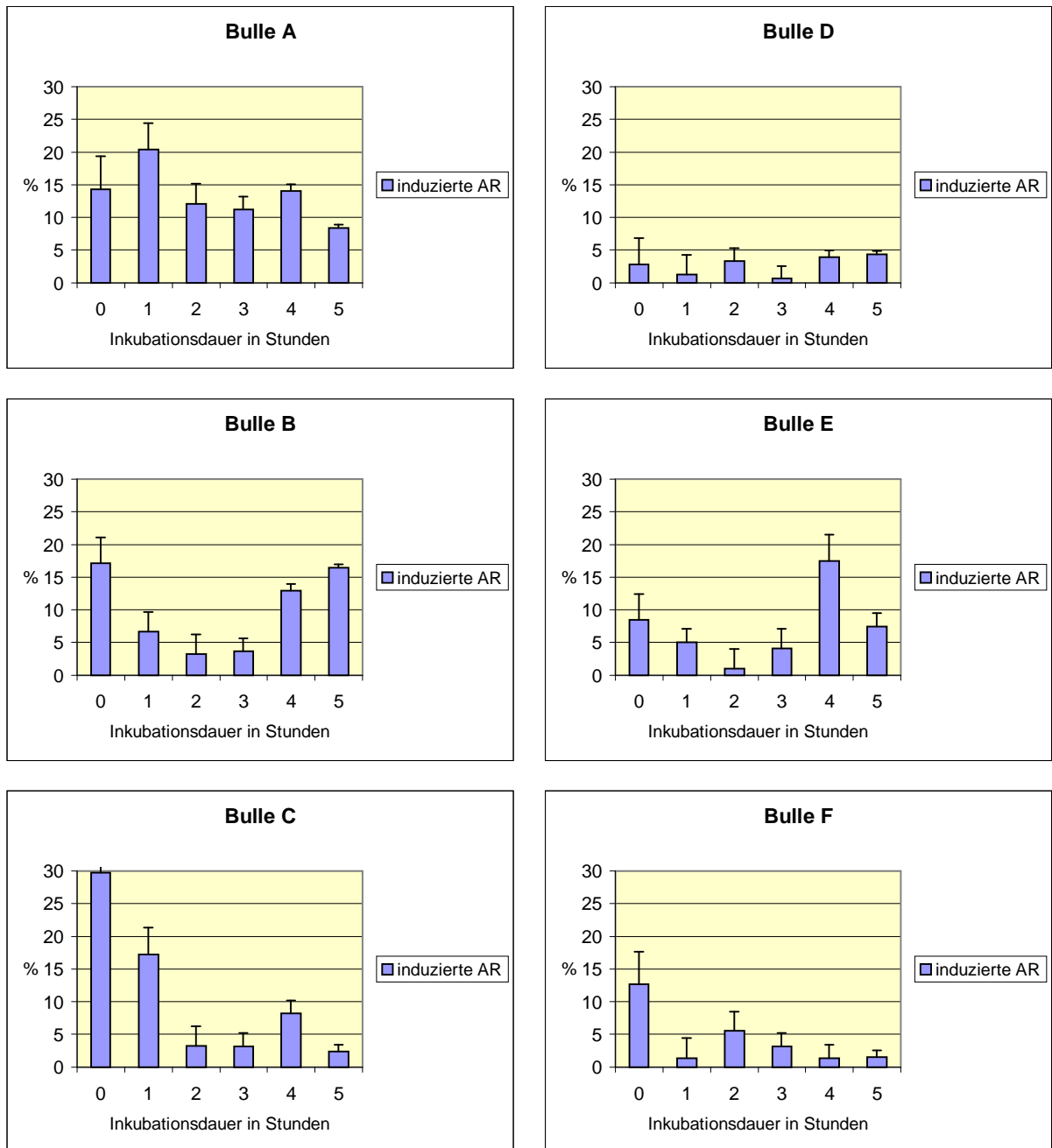


Abb. 3: Induzierte Akrosomenreaktion in % beim Anteil der lebenden akrosomen-
reagierten Spermien an allen Spermien;
Bullen A – C: Ø NRR 60,5 %; Bullen D – F: ØNRR 50,5 %; MW ± STABW

4.1.1.4 Induzierte Akrosomenreaktion bei den lebenden akrosomenreagierten Spermien (Anteil an den lebenden Spermien)

Der zeitliche Verlauf der induzierten Akrosomenreaktion verhielt sich bei den einzelnen Bullen individuell verschieden (Abb. 4). Gruppe I begann mit einem hohen Ausgangswert, der kontinuierlich signifikant absank. Der Wert der Gruppe II sank in der ersten Inkubationsstunde signifikant ab und blieb dann auf einem gleichmäßigen Niveau (Tab. 20). Die Werte der einzelnen Bullen unterschieden sich zu jedem Zeitpunkt signifikant ($p < 0,05$) (Abb. 4). Das Ausmaß der induzierten Akrosomenreaktion von Gruppe I war bis zur dritten Inkubationsstunde ($p = 0,001$) und zum Zeitpunkt 5 ($p < 0,05$) signifikant höher als bei Gruppe II (Tab. 20).

Eine signifikante Korrelation der induzierten Akrosomenreaktion mit der NRR war zu keinem Zeitpunkt feststellbar.

Tab. 20: Anteil der Spermien mit induzierter Akrosomenreaktion in %
(lebende akrosomenreagierte Spermien als Prozentsatz aller lebender Spermien)
Werte von Gruppe I * und Gruppe II **; MW \pm STABW

Inkubations- dauer in Stunden	Gruppe I	Gruppe II
0	20,4 \pm 8,1 ^a	10,3 \pm 4,4 ^b
1	14,8 \pm 7,7 ^a	4,6 \pm 3,8 ^b
2	6,5 \pm 5,3 ^a	5,0 \pm 4,2 ^b
3	7,4 \pm 4,4 ^a	4,1 \pm 2,9 ^b
4	11,7 \pm 4,2	8,9 \pm 7,2
5	9,5 \pm 6,3 ^a	4,9 \pm 3,5 ^b

* Gruppe I: Bulle A – C (ØNRR 60,5 %) **Gruppe II: Bulle D – F (ØNRR 50,5 %)
verschiedene Indizes innerhalb einer Zeile kennzeichnen signifikante Unterschiede

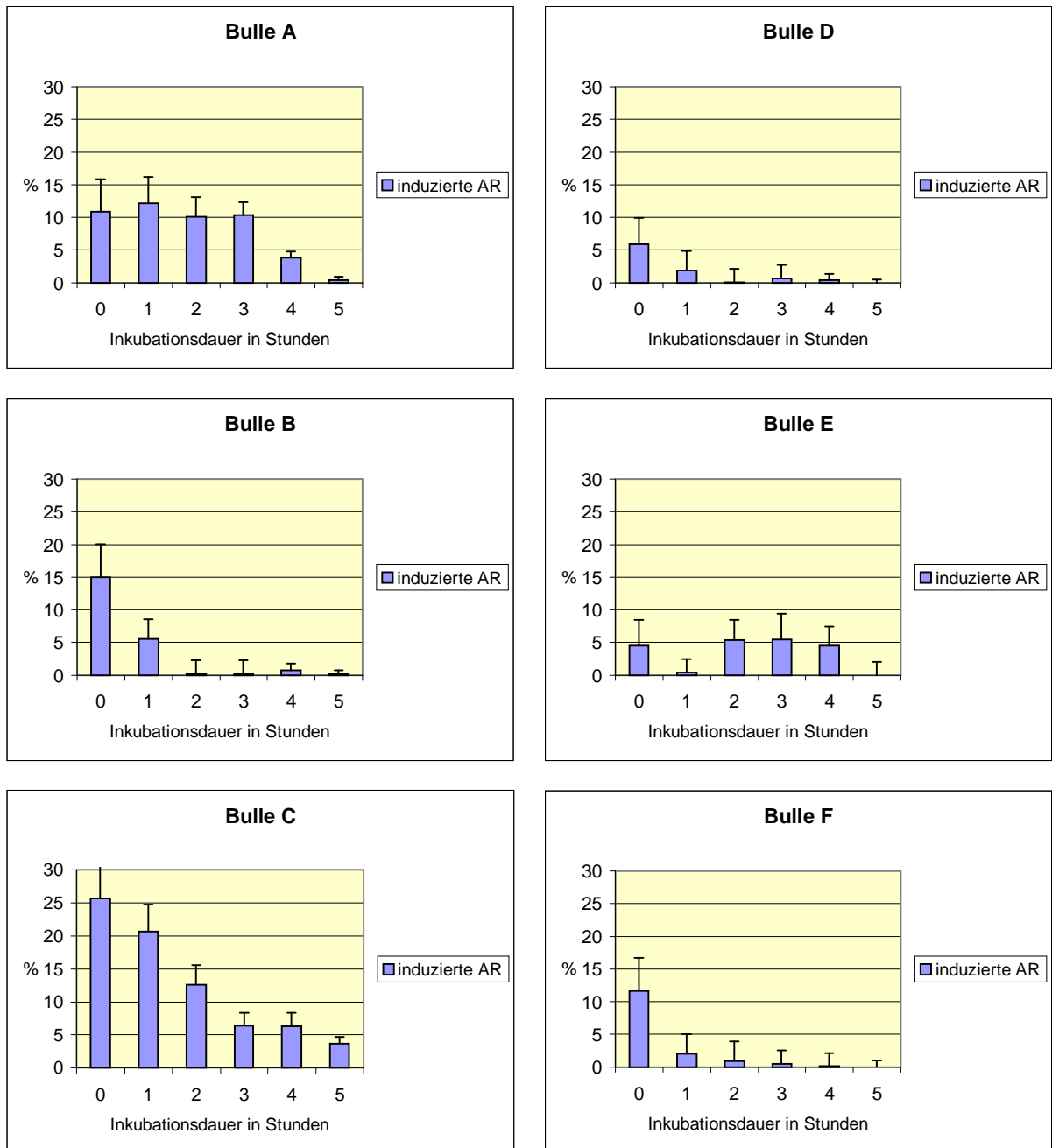


Abb. 4: Induzierte Akrosomenreaktion in % beim Anteil der lebenden akrosomenreagierten Spermien von den lebenden Spermien;
 Bullen A – C: \bar{X} NRR 60,5 %; Bullen D – F: \bar{X} NRR 50,5 %; MW \pm STABW

4.1.2 In vitro Fertilisation

Pro Bulle wurden in acht Versuchsdurchgängen insgesamt ca. 400 (401 – 416) Eizellen beurteilt.

4.1.2.1 Anteile der unbefruchteten, regulär befruchteten und polysperm penetrierten Eizellen

Bei der gewählten Spermienkonzentration von 1 Million Spermien / ml unterschieden sich die Ergebnisse der beiden Fertilitätsgruppen nur bezüglich der Rate der unbefruchteten Eizellen signifikant ($p < 0,05$) (Tab. 21).

Tab. 21: Unbefruchtete, regulär befruchtete und polysperm penetrierte Eizellen in Gruppe I* und Gruppe II** ; Anteil in % aller bewertbaren Eizellen; MW \pm STABW

Bullen	unbefruchtet	regulär befruchtet	polysperm
Gruppe I	10,3 \pm 5,5 ^a	53,9 \pm 10,1	35,7 \pm 11,1
Gruppe II	6,9 \pm 7,1 ^b	54,3 \pm 13,5	38,7 \pm 14,1

* Gruppe I: Bulle A – C (ØNRR 60,5 %) ** Gruppe II: Bulle D – F (ØNRR 50,5 %)
verschiedene Indizes in einer Spalte kennzeichnen signifikante Unterschiede

Bei jedem der drei IVF-Parameter unterschieden sich die Werte der einzelnen Bullen signifikant. Diese Unterschiede waren bei den unbefruchteten Eizellen am ausgeprägtesten. Die Werte der drei Parameter unterschieden sich bei jedem Bullen, außer bei Bulle D, wo kein Unterschied zwischen den regulär befruchteten und den polysperm penetrierten Eizellen bestand. Zu den bullenspezifischen Unterschieden innerhalb der Gruppen ist zu bemerken, daß in Gruppe I Bulle C signifikant weniger unbefruchtete Eizellen als die anderen Bullen hatte ($p < 0,001$).

In Gruppe II hatte Bulle F signifikant mehr unbefruchtete Eizellen ($p < 0,001$), Bulle E mehr regulär befruchtete Eizellen ($p < 0,01$) und Bulle D mehr polysperm befruchtete Eizellen ($p < 0,01$) als die jeweils anderen Bullen aus dieser Gruppe.

Ein Zusammenhang mit der NRR konnte für keinen der drei Parameter gefunden werden.

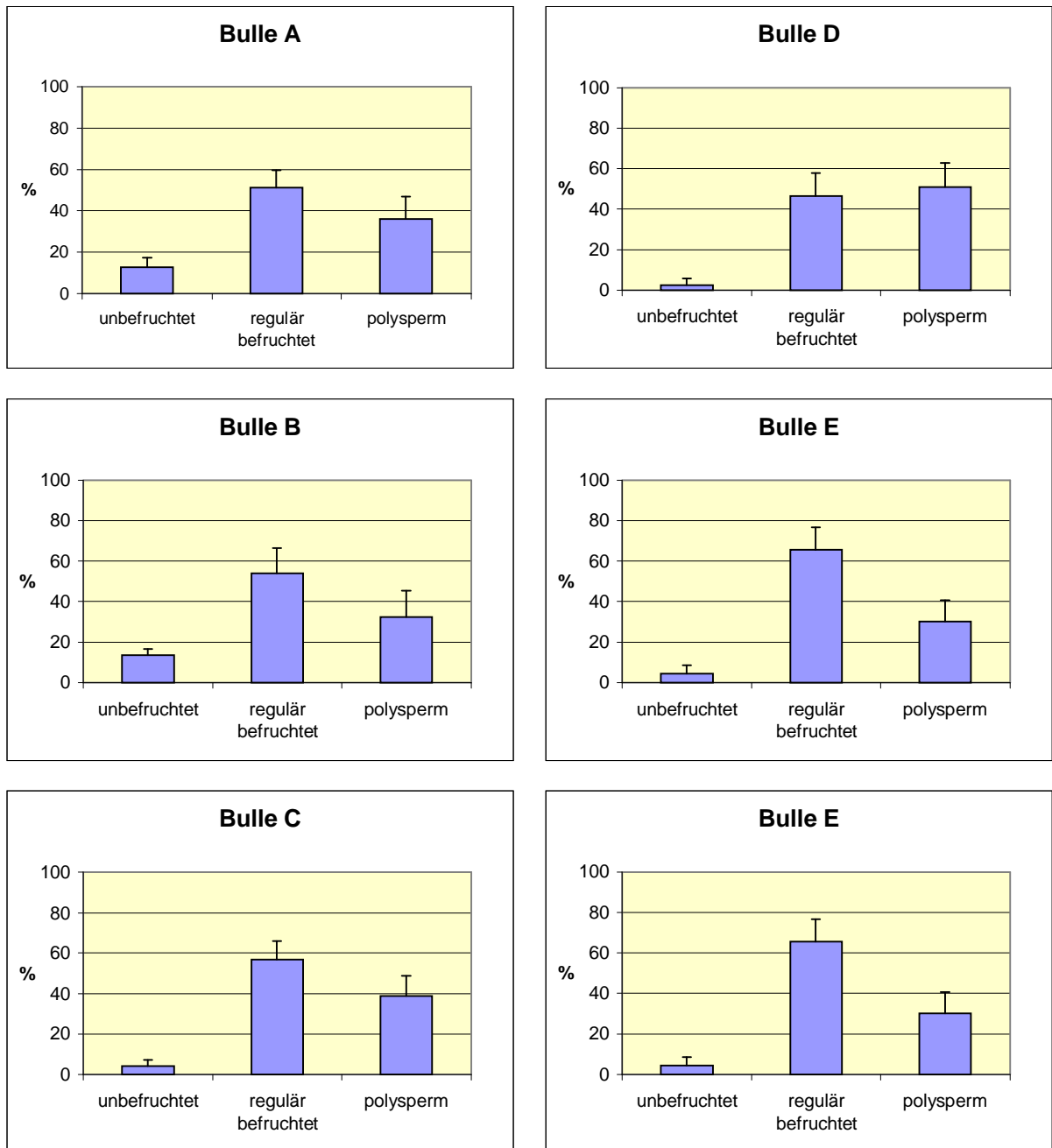


Abb. 5: Unbefruchtete, regulär befruchtete und polysperm penetrierte Eizellen; Anteil in % der bewertbaren Eizellen; Bullen A – C: Ø NRR 60,5 %, Bullen D – F: Ø NRR 50,5 %; MW ± STABW

4.2 Zusammenhang zwischen Spermienkonzentration bei der IVF und Fertilisations-, Polyspermie- und Blastozystenraten

Für die Fertilisations- und Polyspermieraten wurden in 5 bis 6 Versuchsdurchgängen ca. 350 (332 – 386) Eizellen pro Bulle, bzw. ca. 470 (426 – 494) Eizellen pro Konzentration beurteilt (insgesamt 1404). Für die Blastozystenraten wurden in 5 Wiederholungen 401 bis 512 Eizellen pro Bulle, bzw. 581 bis 667 Eizellen pro Konzentration untersucht (insgesamt 1844).

4.2.1 Fertilisationsraten

Bei jedem der vier Bullen trat ein signifikanter Anstieg der Fertilisationsraten (regulär befruchtete Eizellen) zwischen $0,14$ und $0,5 \times 10^6$ Spermien/ml auf, während der Unterschied zwischen $0,5$ und 1×10^6 Spermien/ml nicht mehr signifikant ausfiel (Abb. 6).

Im Bullenvergleich zeigten sich individuelle, verschieden stark ausgeprägte Unterschiede ($p < 0,05$), die ab $0,5 \times 10^6$ Spermien/ml jedoch nicht mehr erkennbar waren (Abb. 7).

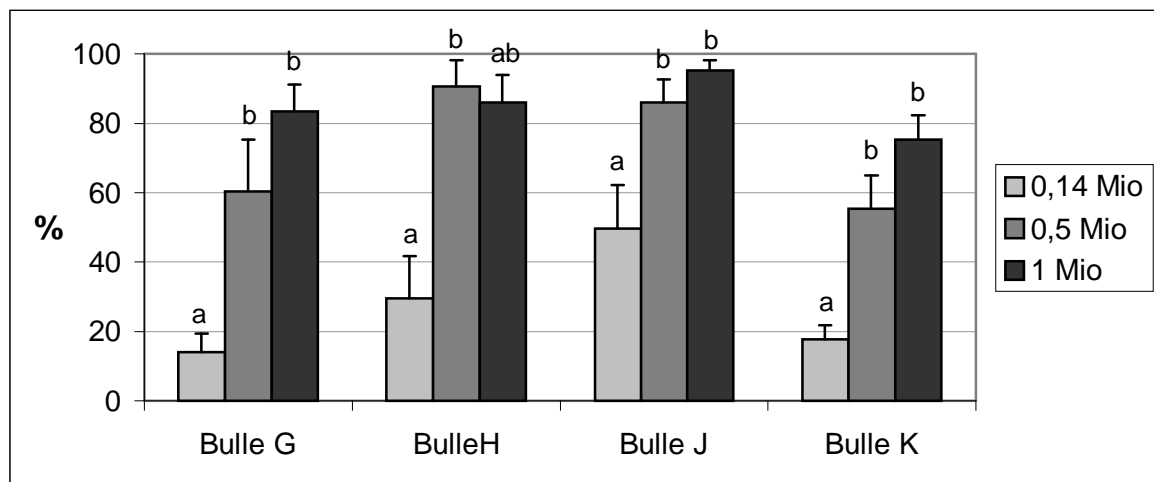


Abb. 6: Vergleich der Fertilisationsraten der drei Spermienkonzentrationen $0,14 \times 10^6$, $0,5 \times 10^6$ und 1×10^6 Spermien / ml für die vier Bullen; MW \pm STABW
verschiedene Indizes kennzeichnen signifikante Unterschiede innerhalb einer Gruppe

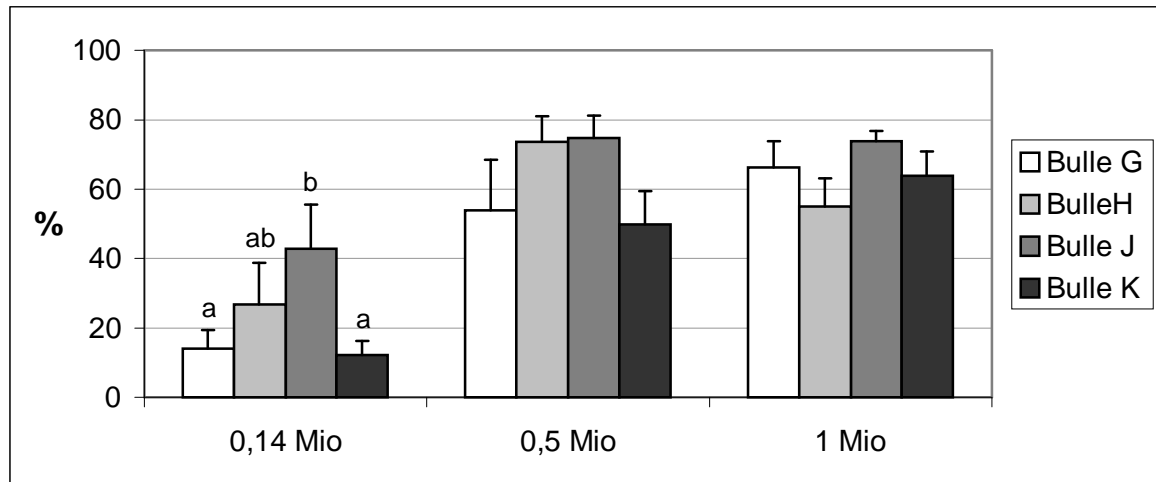


Abb. 7: Vergleich der Fertilisationsraten der vier Bullen bei den Spermienkonzentrationen $0,14 \times 10^6$, $0,5 \times 10^6$ und 1×10^6 Spermien / ml; MW \pm STABW
verschiedene Indizes kennzeichnen signifikante Unterschiede innerhalb einer Gruppe

4.2.2 Polyspermieraten

Die Polyspermierate stieg mit zunehmender Spermienkonzentration bei jedem Bullen an (Abb. 8). Bullenindividuelle Unterschiede stellten sich bei den Polyspermieraten lediglich als Tendenzen dar (Abb. 9).

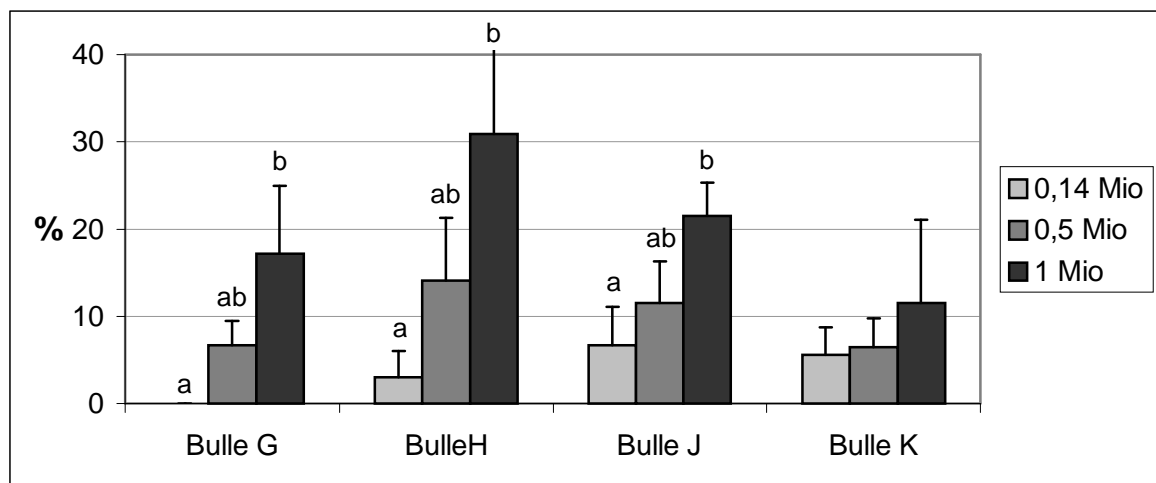


Abb. 8: Vergleich der Polyspermieraten der drei Spermienkonzentrationen $0,14 \times 10^6$, $0,5 \times 10^6$ und 1×10^6 Spermien / ml für die vier Bullen; MW \pm STABW
verschiedene Indizes kennzeichnen signifikante Unterschiede innerhalb einer Gruppe

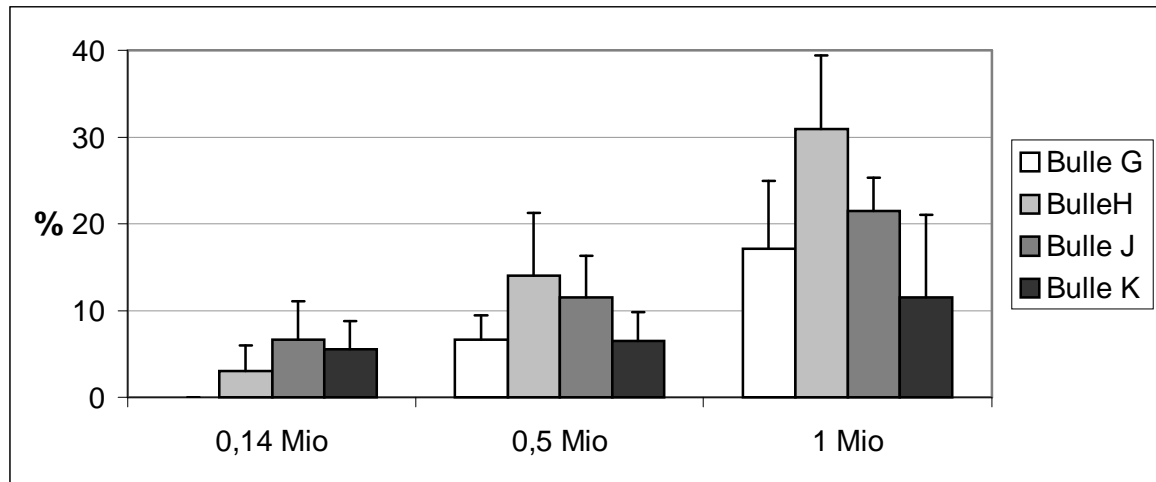


Abb. 9: Vergleich der Polyspermieraten der vier Bullen bei den Spermienkonzentrationen $0,14 \times 10^6$, $0,5 \times 10^6$ und 1×10^6 Spermien / ml; MW \pm STABW

4.2.3 Blastozystenraten

Die Blastozystenraten wiesen außer bei Bulle J keinen Zusammenhang mit der Spermienkonzentration auf (Abb. 10). Im Bullen-Vergleich ergaben sich individuelle, teils signifikante Unterschiede bei den Blastozystenraten (Abb. 11).

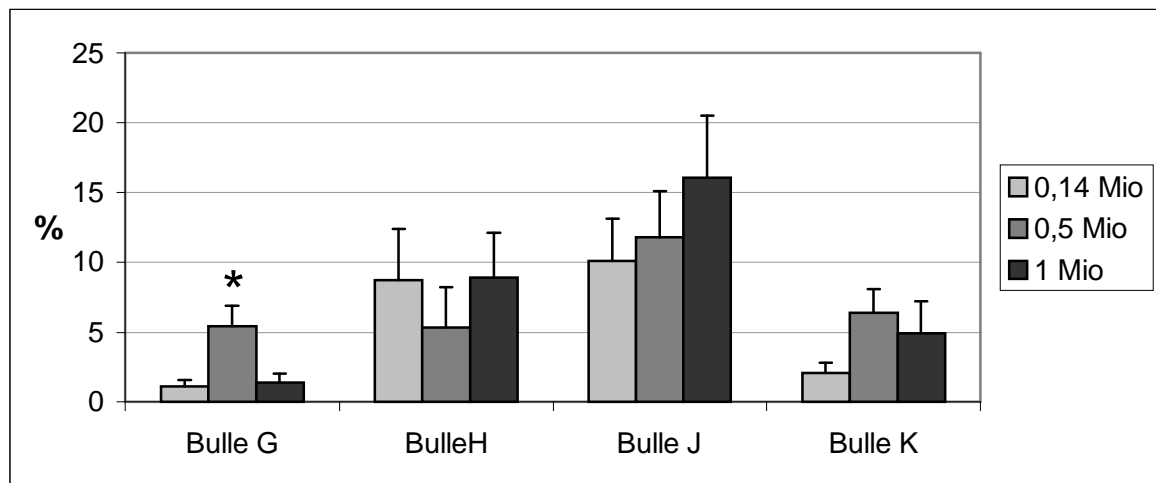


Abb. 10: Vergleich der Blastozystenraten der drei Spermienkonzentrationen $0,14 \times 10^6$, $0,5 \times 10^6$ und 1×10^6 Spermien / ml für die vier Bullen; MW \pm STABW
verschiedene Indizes kennzeichnen signifikante Unterschiede innerhalb einer Gruppe

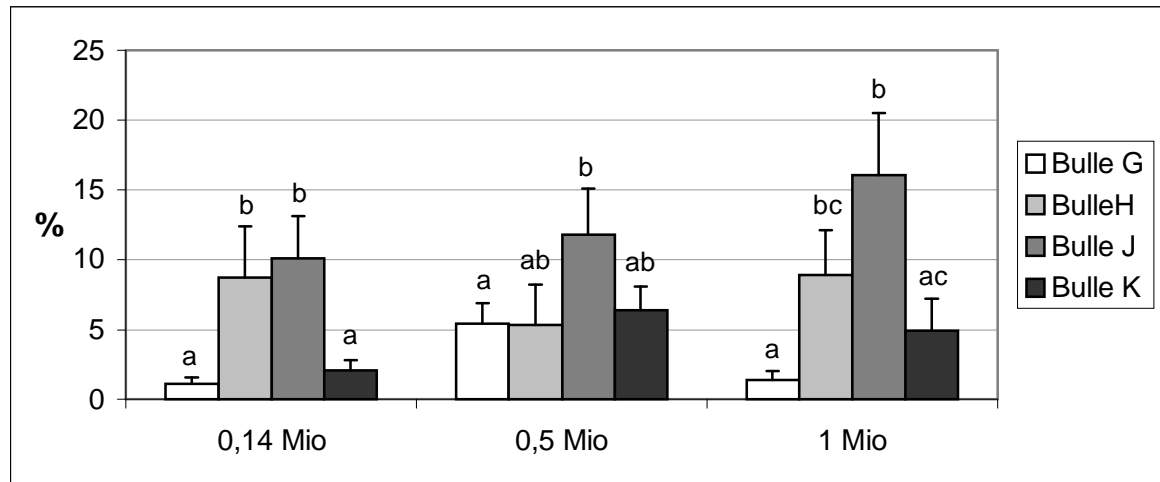


Abb. 11: Vergleich der Blastozystenraten der vier Bullen bei den Spermienkonzentrationen $0,14 \times 10^6$, $0,5 \times 10^6$ und 1×10^6 Spermien / ml; MW + STABW verschiedene Indizes kennzeichnen signifikante Unterschiede innerhalb einer Gruppe

4.3 Einfluß der Spermaaufbereitung mittels Swim up auf Motilität und Morphologie

4.3.1 Computergestützte Untersuchung der Spermienmotilität

Die Ergebnisse der computergestützten Untersuchung der Spermienmotilität sind in Tab. 22 (vor Swim up) und

Tab. 23 (nach Swim up) aufgelistet. Ausgewertet wurden der Anteil aller motilen Spermien, der Anteil linear beweglicher Spermien und die Durchschnittsgeschwindigkeit des Spermienkopfes entlang der gemittelten Bahn (= average path velocity, VAP).

Tab. 22: Computergestützt ermittelte Motilitätsparameter *vor* dem Swim up; MW \pm STABW

Bulle	motile Spermatozoen gesamt (%)	linear motile Spermatozoen (%)	VAP ($\mu\text{m}/\text{sec}$)
A	53,2 \pm 4,8	40,2 \pm 5,4	77,8 \pm 16,1
B	63,0 \pm 6,8	39,1 \pm 10,1	70,2 \pm 22,3
C	70,8 \pm 3,7	54,9 \pm 7,5	95,9 \pm 8,9
D	80,4 \pm 7,9	59,7 \pm 9,3	102,7 \pm 19,7
E	64,2 \pm 2,4	52,3 \pm 8,9	68,5 \pm 12,8
F	66,7 \pm 6,2	48,2 \pm 11,3	66,2 \pm 17,5

Tab. 23: Computergestützt ermittelte Motilitätsparameter *nach* dem Swim up; MW \pm STABW

Bulle	motile Spermatozoen gesamt (%)	linear motile Spermatozoen (%)	VAP ($\mu\text{m}/\text{sec}$)
A	85,3 \pm 5,3	83,7 \pm 7,3	93,5 \pm 23,4
B	87,1 \pm 7,5	84,0 \pm 9,8	88,3 \pm 73,3
C	95,2 \pm 3,9	92,6 \pm 6,2	102,8 \pm 9,5
D	92,7 \pm 4,1	88,7 \pm 8,8	105,3 \pm 14,7
E	88,9 \pm 5,6	85,4 \pm 8,5	85,1 \pm 27,1
F	94,6 \pm 8,1	92,4 \pm 12,2	83,7 \pm 18,5

Sowohl vor als auch nach der Aufbereitung des Spermias mittels Swim up bestanden signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Bullen, wobei die Unterschiede vorher ausgeprägter waren ($p = 0,0001$ bis $0,04$). Nach der Selektion der Spermien näherten sich die Werte einander an ($p = 0,0001$ bis $0,02$). Der Prozentsatz aller beweglichen und der linear motilen Spermien war nach Swim up signifikant höher ($p = 0,0001$). Die VAP stieg nur bei 2 Bullen signifikant an ($p = 0,02$). Ein Zusammenhang mit der NRR konnte für keinen der gemessenen Parameter festgestellt werden, weder vor noch nach Swim up.

4.3.2 Subjektive Untersuchung der Spermienmorphologie

Die Ergebnisse der subjektiven Untersuchung der Spermienmorphologie sind in Tab. 24 (vor Swim up) und Tab. 25 (nach Swim up) aufgelistet.

Für die statistische Auswertung wurden die primären und sekundären Anomalien jeweils zusammengefaßt.

Der Prozentsatz der morphologisch abnormen Spermien nahm durch die Selektion mittels Swim up bei jedem Bullen signifikant ab ($p < 0,05$). Die Werte der einzelnen Bullen unterschieden sich weder vor und nach Swim up signifikant.

Tab. 24: Prozentsatz der morphologisch abnormen Spermien vor dem Swim up; MW \pm STABW

Bulle	Primäre Anomalien		Sekundäre Anomalien		
	Kopf	Mittelstück/ Schwanz	abgelöste Köpfe	abgelöste Kopfkappen	Krümmlinge
G	4,7 \pm 1,4	2,3 \pm 1,4	0,9 \pm 0,2	0,6 \pm 0,4	1,1 \pm 0,4
H	3,3 \pm 0,9	1,9 \pm 0,4	1,1 \pm 0,4	0,7 \pm 0,4	0,9 \pm 0,4
J	5,7 \pm 1,2	2,3 \pm 0,4	1,7 \pm 0,4	1,1 \pm 0,3	1,5 \pm 0,6
K	4,5 \pm 0,9	2,4 \pm 0,6	2,3 \pm 0,3	1,1 \pm 0,4	1,5 \pm 0,4

Tab. 25: Prozentsatz der morphologisch abnormen Spermien nach dem Swim up; MW \pm STABW

Bulle	Primäre Anomalien		Sekundäre Anomalien		
	Kopf	Mittelstück/ Schwanz	abgelöste Köpfe	abgelöste Kopfkappen	Krümmlinge
G	1,3 \pm 0,6	0,4 \pm 0,3	0,1 \pm 0,2	0,6 \pm 0,4	0,1 \pm 0,2
H	1,1 \pm 0,2	0,5 \pm 0,4	0,1 \pm 0,2	0,1 \pm 0,2	0,2 \pm 0,2
J	1,7 \pm 0,5	0,5 \pm 0,4	0,1 \pm 0,2	0,2 \pm 0,3	0,1 \pm 0,2
K	1,1 \pm 0,3	0,6 \pm 0,3	0,1 \pm 0,2	0,1 \pm 0,2	0,1 \pm 0,2

5 Diskussion

Die Beurteilung der Spermaqualität zur Abschätzung der Befruchtungsfähigkeit ist ein zentrales Anliegen bei der Bewertung der Fruchtbarkeit von männlichen Zuchttieren. Ziel ist eine einfache und genaue Methode zur Vorhersage der Fruchtbarkeit, insbesondere beim Rind.

Die Fortschritte, die beim Rind bei der IVF und bei Embryokultursystemen erzielt wurden, haben es ermöglicht, den Zusammenhang zwischen der *in vivo* Fruchtbarkeit von Bullen und den Ergebnissen der IVF zu untersuchen (Hillery et al., 1990; Marquant-Le Guienne et al., 1990; Shamsuddin und Larsson, 1993; Lonergan et al., 1994; Schneider et al., 1999; Larsson und Rodriguez-Martinez, 2000). Speziell dazu wurden auch Testverfahren entwickelt, die bestimmte Spermienfunktionen bei der *in vitro* Kapazitation untersuchen, wie z. B. die Erfassung der Induzierbarkeit der Akrosomenreaktion (Lenz et al., 1988; Whitfield und Parkinson, 1992, 1995; Januskauskas et al., 2000a, b), die Fähigkeit, Heparin zu binden (Marks und Ax, 1985, Merkies et al., 2000), Zona pellucida-Bindungstests (Fazeli et al., 1993; Zhang et al., 1998) oder Penetrationsassays (Oghoda et al., 1988; Henault und Killian, 1995).

In der vorliegenden Arbeit wurde zuerst untersucht, ob der zeitliche Verlauf der Spermienkapazitation, gemessen anhand der induzierten Akrosomenreaktion, einen Zusammenhang mit der Non-Return-Rate von Bullen aufweist. Dazu wurden Spermien aus TG-Samenproben von 6 Bullen mit bekannter Non-Return-Rate (NRR) fünf Stunden lang unter kapazitierenden Bedingungen inkubiert und die Akrosomenreaktion zu Beginn der Inkubation und nach jeder Stunde mit Calcium-Ionophor A23187 ausgelöst. Anschließend wurden sie mit FITC-PSA und EMA gefärbt und unter dem Fluoreszenzmikroskop beurteilt.

Es stellte sich heraus, daß bereits zu Beginn ein relativ hoher Prozentsatz der lebenden Spermien akrosomenreagiert war (ca. 70 bis 85 %). Dies war wahrscheinlich durch die Aufbereitung des TG-Spermas durch Swim up bedingt, eine Methode, die eine kapazitierende Wirkung hat. Der Anteil lebender Spermien, die die Akrosomenreaktion durchliefen, stieg mit zunehmender Inkubationsdauer signifikant an. Bullenspezifische Unterschiede, die zu Anfang deutlich waren, glichen sich mit der Zeit aus. Die Bullen der Gruppe mit der höheren *in vivo* Fertilität hatten anfangs mehr akrosomenintakte Spermien, die nach Zugabe von A23187 zu einem höheren Prozentsatz die Akrosomenreaktion

durchliefen, als die der Bullengruppe mit der niedrigeren Fruchtbarkeit. Eine signifikante Korrelation mit der NRR ließ sich für die mit Calcium-Ionophor behandelten Spermien zum Zeitpunkt Null beobachten.

Daß Bullen mit höherer in vivo Fertilität mehr akrosomenintakte Spermien haben, ist auch von Saacke und White (1972) beobachtet worden. Dagegen konnten weder Bousquet et al. (1983), Cumming (1995) noch Brahmkshtri et al. (1999) eine signifikante Korrelation des Anteils akrosomintakter Spermien mit der NRR feststellen. Dies könnte jedoch daran liegen, daß sie das Sperma direkt nach dem Auftauen ohne weitere Aufbereitung untersuchten.

Der Nachweis einer Beziehung zwischen induzierter Akrosomenreaktion und NRR stimmt mit den Ergebnissen von Whitfield und Parkinson (1995) und Januskauskas et al. (2000b) überein. Whitfield und Parkinson (1995) inkubierten mit Percoll aufbereitetes TG-Sperma von 6 Bullen eine Stunde lang in TALP-Medium mit 1 μM A23187. Anschließend wurden die Spermien mit PI gefärbt und unter dem Fluoreszenzmikroskop ausgewertet. Der Anteil akrosomenreagierter Spermien in der behandelten Probe wurde mit dem in der Negativkontrolle verglichen. Der Anteil der induzierten Akrosomenreaktion korrelierte signifikant mit der NRR ($r = 0,86$; $p < 0,05$). Mit diesen Werten erstellten die Autoren eine Regressionsgleichung, mit der sie die geschätzten NRR von 7 weiteren Bullen anhand deren induzierter Akrosomenreaktion errechneten, die mit den tatsächlichen NRR signifikant korrelierten ($r = 0,84$; $p < 0,005$).

Januskauskas et al. (2000b) inkubierten mit Swim up aufbereiteten TG-Samen von 15 Bullen eine Stunde lang in Sperm-TALP-Medium mit 1 μM A23187. Die Spermien wurden mit PI und FITC-PNA gefärbt und unter dem Fluoreszenzmikroskop ausgewertet. Dann wurde die Differenz zwischen den akrosomenreagierten Spermien in der Probe, die mit Calcium-Ionophor behandelt wurde, und denen in der unbehandelten Probe errechnet. Der Differenzwert der Spermien, die noch einen Rest Fluoreszenz in der Äquatorialregion aufwiesen, korrelierte signifikant mit der NRR ($r = 0,6$; $p < 0,01$).

Zusammenfassend läßt sich aus diesen und den eigenen Ergebnissen schließen, daß Ausmaß und zeitlicher Verlauf einer induzierten Akrosomenreaktion Hinweise auf die tatsächliche Fruchtbarkeit eines Bullen geben können.

Die positive Beziehung zwischen dem Anteil an akrosomenintakten Spermien und der Fruchtbarkeit könnte damit zu erklären sein, daß die Plasmamembran der Spermien solcher Bullen gegen Schädigungen, die durch die Kryokonservierung entstehen, resistenter sind. Diese Schädigungen ähneln den strukturellen Veränderungen bei der Kapazitation. Kapazitierte Spermien haben einen erhöhten Metabolismus, eine erhöhte Membranfluidität und -permeabilität. Aufgrund eines unkontrollierten Calcium-Influx können sie spontan die Akrosomenreaktion durchlaufen (Cormier et al., 1997). Dies könnte ein Grund dafür sein, daß die Bullen mit der niedrigeren Fruchtbarkeit mehr akrosomenreagierte Spermien in der Negativkontrolle hatten. Calcium spielt eine sehr wichtige Rolle bei der Akrosomenreaktion (siehe Kapitel 2.2). Die Tatsache, daß Bullen mit höherer Fruchtbarkeit auf den durch Calcium-Ionophor A23187 gegebenen Stimulus hin in höherem Maße die Akrosomenreaktion durchlaufen, könnte dadurch bedingt sein, daß der Mechanismus, der für den Calciuminflux in die Spermien sorgt, bei diesen Bullen besser funktioniert.

Des weiteren sollte in der vorliegenden Arbeit der individuelle Einfluß verschiedener Bullen auf Parameter der *in vitro* Fertilisation und ein möglicher Zusammenhang dieser Ergebnisse mit der *in vivo* Fruchtbarkeit der Bullen untersucht werden.

Daß Bullen individuell unterschiedliche Fertilisationsraten, (Marquant-Le Guienne et al., 1990; Henault und Killian, 1995), Polyspermieraten (Niwa und Oghoda, 1988; Tajik et al., 1994) und Blastozystenraten (Eyestone und First, 1989; Hillery et al., 1990; Shi et al., 1990; Zhang et al., 1997) aufweisen, wurde bereits in mehreren Studien festgestellt.

Die *in vitro* Fertilisation *in vitro* gereifter Eizellen mit dem TG-Sperma (1×10^6 Spermien/ml) von 6 Bullen, die sich bezüglich ihrer *in vivo* Fruchtbarkeit (NRR) unterschieden, ergab signifikante Unterschiede zwischen einzelnen Bullen bei den Raten unbefruchteter, regulär fertilisierter und polysperm penetrierter Eizellen. Es war jedoch bei keinem der Parameter eine Korrelation zur NRR gegeben. Marquant-Le Guienne et al. (1990) hatten eine solche Korrelation nachweisen können, jedoch nur bei einer Heparinkonzentration von 0,05 µg/ml im Fertilisationsmedium. In den eigenen Untersuchungen wurden dagegen 10 µg/ml verwendet, was theoretisch individuelle Unterschiede verdecken könnte. In Untersuchungen von Henault und Killian (1995) wurden zwar auch 10 µg/ml Heparin benutzt, aber hier wurden mittels heterospermer Insemination Bullen paarweise verglichen. Das sich daraus ergebende Ranking bezüglich der *in vitro* Fertilität korrelierte mit der durch die NRR definierten Reihenfolge.

Ein grundsätzliches Problem bei der Verwendung der *in vitro* Fertilisation als Test für das *in vivo* Befruchtungsvermögen eines Bullen ist die sehr hohe Spermienkonzentration bei der Insemination. Dies ist ein Problem, das durchaus auch mit der Situation bei der Beurteilung des Befruchtungsvermögens durch Ermittlung der Konzeptionsraten bzw. NRR vergleichbar ist. Den Einfluß der Spermienkonzentration auf Fertilisationsraten erklärten Saacke et al. (1994) mit dem Verhältnis von Samenqualität und -quantität. Dabei stützten sie sich auf das Konzept von Salisbury und Vandemark (1961), das besagt, daß die Fruchtbarkeit mit steigender Spermienkonzentration bis zu einem bestimmten Schwellenwert, an dem weibliche Faktoren Grenzen setzen, zunimmt. Individuelle Bullen unterscheiden sich bezüglich der Rate, mit der sie sich mit steigender Spermienkonzentration ihrer maximalen Fruchtbarkeit nähern, und die maximale Fruchtbarkeit ist anscheinend von dieser Rate unabhängig (den Daas, 1992). Es hat sich herausgestellt, daß bestimmte subfertile Bullen auch durch eine Erhöhung der Spermienkonzentration nicht in der Lage sind, eine physiologische Fruchtbarkeit zu erreichen (den Daas, 1992). Daraus schlossen Saacke et al. (1994), daß es zwei Hauptfaktoren gibt, die die Reproduktionsleistung beeinflussen, nämlich kompensierbare und unkompensierbare Faktoren. Während erstere sich durch eine Erhöhung der Spermienkonzentration ausgleichen lassen, hat dies auf letztere keinen Einfluß. Kompensierbare Spermiendefekte sind solche, die das Spermium daran hindern, die Eizelle zu erreichen, an sie zu binden, sie zu penetrieren und den Polyspermieblock zu initiieren. Dazu gehören Vitalität, Motilität, Morphologie, funktionelle und molekulare Eigenschaften. Sofern nicht alle Spermien einer Probe denselben Defekt haben, kann durch eine Erhöhung der Konzentration die absolute Anzahl von Spermien ohne diese Beeinträchtigung gesteigert werden, was die Chancen einer Befruchtung erhöht. Unkompensierbare Spermiendefekte wirken sich dagegen so aus, daß die Spermien zwar die Eizelle befruchten können, die Embryonalentwicklung jedoch nicht einleiten oder nicht aufrechterhalten können. Hierbei handelt es sich meist um Chromosomdefekte. In diesen Fällen kann auch durch eine Erhöhung der Spermienkonzentration keine Verbesserung der Fruchtbarkeit erreicht werden (Saacke et al., 1994; 2000). Mit den üblichen Parametern der IVF (Penetrationsrate etc.) dürften damit nicht-kompensierbare Spermiendefekte nicht oder nur bedingt nachgewiesen werden können.

Um den Einfluß der Spermienkonzentration auf die IVF-Ergebnisse zu untersuchen, wurden *in vitro* gereifte Eizellen mit dem TG-Sperma vier verschiedener Bullen in drei unterschiedlichen Konzentrationen ($0,14 \times 10^6$, $0,5 \times 10^6$ und 1×10^6 Spermien/ml)

inseminiert. Bei den Raten regulär befruchteter Eizellen war ein signifikanter Anstieg zwischen $0,14 \times 10^6$ und $0,5 \times 10^6$ Spermien/ml zu beobachten. Der Unterschied zwischen $0,5 \times 10^6$ und 1×10^6 Spermien/ml fiel dagegen nicht mehr signifikant aus. Die Polyspermieraten stiegen mit zunehmender Spermienkonzentration bei jedem Bullen an, während die Blastozystenraten außer bei einem Bullen keinen Zusammenhang mit der Spermienkonzentration aufwiesen. In allen drei Klassen waren bullenspezifische Unterschiede zu erkennen, die jedoch nur bei den Raten regulär befruchteter Eizellen (niedrigste Spermienkonzentration) und den Blastozystenraten (alle Spermienkonzentrationen) signifikant ausfielen.

Kroetsch und Stubbings (1992) kamen bei Untersuchungen über den Effekt von Bulle und Spermienkonzentration auf Fertilisations- und Polyspermieraten zu ähnlichen Ergebnissen. Sie inseminierten *in vitro* gereifte, kumulusfreie Eizellen in Fert-TALP-Medium mit dem TG-Sperma von 10 Bullen, in den Konzentrationen 1000, 10.000, 100.000, 1 Mio, 2 Mio und 4 Mio Spermien/ml. Der Einfluß der einzelnen Bullen zeigte sich nur bei den niedrigen Spermienkonzentrationen von 1000 bis 100.000 Spermien/ml. Ab 1 bis 4 Mio Spermien/ml konnten die Autoren keinen bullenspezifischen Effekt mehr feststellen. Dagegen hatte die Spermienkonzentration einen höchst signifikanten Einfluß auf Fertilisations- und Polyspermieraten, die mit steigender Konzentration zunahmen. Auch Kurtu et al. (1996) konnten keinen Einfluß der Spermienkonzentration ($0,5 \times 10^6$, 1×10^6 und 2×10^6 Spermien/ml) auf die Teilungsraten mehr feststellen. Dagegen berichteten Ward et al. (2003), daß eine Verringerung der Spermienkonzentration die Wahrscheinlichkeit, Unterschiede zwischen verschiedenen Bullen zu erkennen, nicht erhöht. Sie fertilisierten Kumulusoozytenkomplexe in einem TALP-Medium mit $10 \mu\text{g/ml}$ Heparin mit dem TG-Samen von vier Bullen in den Konzentrationen $0,0016 \times 10^6$, $0,031 \times 10^6$, $0,063 \times 10^6$, $0,125 \times 10^6$, $0,25 \times 10^6$ und $0,5 \times 10^6$ Spermien/ml. Die NRR korrelierte am stärksten mit den Fertilisations- und Teilungsraten bei den höchsten Spermienkonzentrationen. Bei den Ergebnisse von Ward et al. (2003) ist aber zu beachten, dass der hier verwendete Konzentrationsbereich bei der Insemination unter dem der zuvor zitierten Studien (Kroetsch und Stubbings, 1992; Kurtu et al., 1996) liegt.

Bei der Beurteilung des Einflusses der Spermienkonzentration bei der IVF und einem möglichen Zusammenhang mit der *in vivo* Fertilisation ist zu bedenken, daß das übliche Verfahren zur *in vitro* Kapazitation eine Selektion der Spermien beinhaltet. Deshalb sollte im Rahmen dieser Untersuchungen der Einfluß der Spermaufbereitung durch Swim up auf

die Parameter Motilität und Morphologie untersucht werden. Durch die Aufbereitung des Spermas mit Swim-up stiegen die Parameter Gesamtmotilität und lineare Motilität im Vergleich zu den Werten der aufgetauten Spermaproben signifikant an. Da das Swim up-Verfahren die Eigenbeweglichkeit der Spermien als Selektionsmethode nutzt, sind im überschichteten Medium nur die zielgerichtet motilen Spermien zu finden, die dorthin aufgeschwommen sind, während die unbeweglichen Samenzellen auf dem Grund zurückbleiben (Rodriguez-Martinez et al., 1997).

Vor dem Swim up bestanden bezüglich der Parameter Gesamtmotilität und lineare Motilität signifikante Unterschiede zwischen den Bullen. Nach der Aufbereitung des Spermas hatten sich die Werte der Bullen jedoch einander angeglichen, wahrscheinlich weil durch die Swim up-Prozedur die beweglichsten Spermien selektiert werden (Parrish und Foote, 1987). Diese Prozedur könnte also bullenindividuelle oder sogar fruchtbarkeitsrelevante Unterschiede in der Spermienmotilität nivellieren. Durch die Aufbereitung des Spermas mit Swim up sanken die Anteile primärer und sekundärer Anomalien im Vergleich zu den Werten der aufgetauten Spermaproben signifikant ab. Da Anomalien, die das Mittelstück und den Schwanz betreffen, den „Bewegungsapparat“ der Spermien behindern (Saacke et al., 1994), und Anomalien des Kopfes die hydrodynamischen Eigenschaften der Spermien beeinträchtigen können (Dresdner und Katz, 1981), sind nur wenige der morphologisch abnormen Spermien in der Lage, in das Medium aufzuschwimmen. Die Selektion motiler und morphologisch einwandfreier Samenzellen im Rahmen der in vitro Kapazitation könnte mit dazu beitragen, daß die Parameter der in vitro Fertilisation, wenn überhaupt, nur in einem sehr engen und für jeden Bullen individuell zu bestimmenden Konzentrationsbereich in Beziehung stehen.

Die vorliegenden Untersuchungen zeigen, dass Parameter der Akrosomenfunktion von Spermien bessere Hinweise auf die Fruchtbarkeit von Bullen geben können als die bei der in vitro Fertilisation zu messenden Parameter wie Penetrationsrate, Polyspermierate oder die weitere in vitro Entwicklung von Zygoten zur Blastozyste.

6 Zusammenfassung

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, den Einfluß verschiedener Bullen auf den zeitlichen Verlauf der *in vitro* Kapazitation und die Ergebnisse der *in vitro* Fertilisation zu untersuchen, und zu prüfen, ob ein Zusammenhang mit der *in vivo* Fruchtbarkeit der Bullen besteht. Zusätzlich wurde der Effekt unterschiedlicher Spermienkonzentrationen auf Parameter der *in vitro* Fertilisation sowie die Auswirkung der Spermaaufbereitung mittels Swim up auf Samenparameter ermittelt.

TG-Sperma von 6 Bullen mit unterschiedlichen Non-Return-Raten wurde mit der Swim up-Methode aufbereitet, fünf Stunden lang unter kapazitierenden Bedingungen inkubiert und die Akrosomenreaktion zu Beginn der Inkubation und nach jeder Stunde mit Calcium-Ionophor A23187 ausgelöst. Anschließend wurden die Proben mit FITC-PSA und EMA gefärbt und unter dem Fluoreszenzmikroskop beurteilt.

Der Anteil lebender Spermien, die die Akrosomenreaktion durchliefen, stieg mit zunehmender Inkubationsdauer signifikant an. Bullenspezifische Unterschiede glichen sich mit der Zeit aus. Die Bullen der Gruppe mit der höheren *in vivo* Fertilität hatten initial einen höheren Anteil akrosomenintakter Spermien. Bei diesen Bullen zeigte nach Zugabe von A23187 ein höherer Prozentsatz der Spermien eine Akrosomenreaktion als bei den Bullen mit der niedrigeren Fruchtbarkeit. Eine signifikante Korrelation mit der NRR ließ sich aber nur für die mit Calcium-Ionophor behandelten Spermien zum Zeitpunkt Null beobachten.

Die *in vitro* Fertilisation *in vitro* gereifter Eizellen mit dem TG-Sperma (1×10^6 Spermien/ml) derselben 6 Bullen ergab signifikante bullenindividuelle Unterschiede bei den Raten unbefruchteter, regulär fertilisierter und polysperm penetrierter Eizellen. Es bestand aber keine Beziehung zur NRR der Bullen.

Um den eventuell maskierenden Einfluß der Spermienkonzentration auf die IVF-Ergebnisse abzuklären, wurden *in vitro* gereifte Eizellen mit dem TG-Sperma vier verschiedener Bullen in drei unterschiedlichen Konzentrationen ($0,14 \times 10^6$, $0,5 \times 10^6$ und 1×10^6 Spermien/ml) inseminiert. Die Raten regulär befruchteter Eizellen stiegen nur bis $0,5 \times 10^6$ Spermien/ml signifikant an. Die Polyspermieraten stiegen mit zunehmender Spermienkonzentration bei jedem Bullen an, während die Blastozystenraten außer bei einem Bullen keinen Zusammenhang mit der Spermienkonzentration aufwiesen. In allen

drei Klassen waren bullenspezifische Unterschiede zu erkennen, die jedoch nur bei den Raten regulär befruchteter Eizellen (niedrigste Spermienkonzentration) und den Blastozystenraten (alle Spermienkonzentrationen) signifikant ausfielen. Es konnte keine Korrelation der IVF-Ergebnisse mit den NRR festgestellt werden.

Durch die Aufbereitung der TG-Samenproben mit Swim up stiegen die Parameter Gesamtmotilität und lineare Motilität im Vergleich zu den Werten der aufgetauten Spermproben signifikant an. Vor dem Swim up bestanden signifikante Unterschiede zwischen den Bullen, nach der Aufbereitung des Spermias hatten sich die Werte der Bullen jedoch einander angeglichen. Die Anteile primärer und sekundärer Anomalien verringerten sich durch die Swim-up Behandlung des Spermias signifikant. Weder vor noch nach der Aufbereitung des Spermias konnten signifikante Unterschiede zwischen den Bullen gemessen werden.

Die vorliegenden Untersuchungen zeigen, daß Parameter der Akrosomenfunktion von Spermien bessere Hinweise auf die Fruchtbarkeit von Bullen geben können als die bei der in vitro Fertilisation zu messenden Parameter wie Penetrationsrate, Polyspermierate oder die weitere in vitro Entwicklung von Zygoten zur Blastozyste.

7 Summary

Individual differences between bulls measured by in vitro capacitation or in vitro fertilization and the relationship with the non-return rates

The aim of this study was to evaluate the influence of individual bulls on the time course of in vitro capacitation and in vitro fertilization parameters and to check for a relationship with the in vivo fertility of the bulls. Furthermore the effect of different sperm concentrations on IVF results and the influence of sperm separation by swim up on sperm motility and morphology were examined.

Frozen-thawed sperm from 6 bulls with different non-return rates were subjected to a swim up procedure and incubated for five hours under capacitating conditions. At 0, 1, 2, 3 4, and 5 hours of incubation the acrosome reaction was induced with calcium ionophore A23187. Spermatozoa were stained with FITC-PSA and EMA and evaluated under the fluorescence microscope.

The percentage of live spermatozoa undergoing the acrosome reaction significantly increased with increasing time of incubation. Differences between bulls were markedly reduced with incubation time. When bulls were grouped according to their non-return rate bulls with a higher in vivo fertility had initially higher proportions of acrosome intact spermatozoa. Likewise addition of A23187 resulted in a higher percentage of acrosome reacted spermatozoa than in spermatozoa of bulls with lower fertility. However a significant correlation with the NRR was only found for the ionophore-treated spermatozoa at the beginning of the incubation period.

When spermatozoa of these bulls were used for in vitro fertilization of in vitro matured oocytes (1×10^6 sperm/ml) significant differences between bulls with regard to the rates of unfertilised, regularly fertilised and polyspermic fertilization could be observed. There was no correlation between IVF results and non-return rates of these bulls.

To evaluate the potentially masking effect of sperm concentration on IVF parameters, in vitro matured oocytes were fertilised with the frozen-thawed sperm of four bulls in three different sperm concentrations ($0,14 \times 10^6$, $0,5 \times 10^6$ und 1×10^6 sperm/ml). The lowest sperm concentration provided a significantly lower percentage of regularly fertilised oocytes. Rates of polyspermy increased parallel with sperm concentration, while blastocyst

rates showed no relationship with sperm concentration, except for one bull. Bull specific differences were evident in all three parameters, but significant only for the rates of regularly fertilised oocytes (lowest sperm concentration) and blastocyst rates (all sperm concentrations).

The preparation of sperm with the swim up technique significantly increased the percentage of motility and progressively motile spermatozoa in comparison with untreated sperm. Before swim up there were significant differences between bulls. After sperm selection those differences diminished. The percentage of spermatozoa with abnormal morphology decreased after swim up separation in comparison with the untreated sperm. Neither before nor after sperm preparation significant differences between bulls concerning morphology were evident.

The present study shows that parameters of the acrosomal function of spermatozoa are a better marker for bull fertility than parameters of a vitro fertilization procedure such as penetration rate, rate of polyspermic oocytes or the further development of zygotes to blastocysts.

8 Anhang

Medien

Autor		Brackett u. Oliphant	Iritani et al.	Ijaz u. Hunter	Parrish et al.
Jahr		1975	1984	1989	1988
		BO-Medium	mod. Krebs-Ringer-Bikarbonat	Calcium-freies Tyrode' s	mod. Tyrode' s = Sperm TALP
Chemikalie					
NaCl	mM	112,00	94,60	105,05	100,0
KCl	mM	4,02	4,78	2,30	3,1
CaCl ₂	mM	2,25	1,71		2,0
KH ₂ PO ₄	mM		1,19		
NaH ₂ PO ₄	mM	0,83			0,3
MgCl ₂	mM	0,52		0,49	0,4
MgSO ₄	mM		1,19		
NaHCO ₃	mM	37,00	25,07	25,00	25,0
Glukose	mM	13,90	5,56	13,87	
Natriumpyruvat	mM	1,25	0,50	1,00	1,0
Natriumlaktat	mM		21,58	1,12 ml	21,6
Hepes	mM			5,04	10,0
Kristallines BSA	g/l	3,00	4,00	6,00	6,0
Penicillin	µg/l	31,00	75,00		
Streptomycin-sulfat	µg/l		50,00		
Gentamicin	µg/ml				50,0
Heparin	µg/ml				10,0
Aqua dest.	ml	1000	1000	1000	1000

9 Literaturverzeichnis

Abe, H., Sendai, Y., Satoh, T., and Hoshi, H. (1995)

Secretory products of bovine oviductal epithelial cells support the viability and motility of bovine spermatozoa in culture in vitro.

J Exp Zool **272**, 54-61

Abeydeera, L. R., and Day, B. N. (1997)

Fertilization and subsequent development in vitro of pig oocytes inseminated in a modified tris-buffered medium with frozen-thawed ejaculated spermatozoa.

Biol Reprod **57**, 729-34

Abeydeera, L. R., Funahashi, H., Kim, N. H., and Day, B. N. (1997)

Chlortetracycline fluorescence patterns and in vitro fertilisation of frozen-thawed boar spermatozoa incubated under various bicarbonate concentrations.

Zygote **5**, 117-25

Adeniran, A. J., Shoshani, I., Minuth, M., Awad, J. A., Elce, J. S., and Johnson, R. A. (1995)

Purification, characterization, and N-terminal amino acid sequence of the adenylyl cyclase-activating protease from bovine sperm.

Biol Reprod **52**, 490-9

Agca, Y., Liu, J., Rutledge, J. J., Critser, E. S., and Critser, J. K. (2000)

Effect of osmotic stress on the developmental competence of germinal vesicle and metaphase II stage bovine cumulus oocyte complexes and its relevance to cryopreservation.

Mol Reprod Dev **55**, 212-9

Amann, R. P. (1989)

Can the fertility potential of a seminal sample be predicted accurately?

J Androl **10**, 89-98

Anderson, S. H., and Killian, G. J. (1994)

Effect of macromolecules from oviductal conditioned medium on bovine sperm motion and capacitation.

Biol Reprod **51**, 795-9

Anzar, M., and Graham, E. F. (1995)

Effect of filtration on post-thaw quality of bull semen.

Theriogenology **43**, 429-49

Auer, W. (1993)

Erprobung der Samenanreicherung durch Transmigration (TM) für die IVF boviner Oozyten.

Wien Tierärztl Mschr **80**, 154

Austin, C. R. (1951)

Observations on the penetration of sperm into the mammalian egg.

Aust J Sci Res (Series B) **4**, 581-96

Austin, C. R. (1952)

The „capacitation“ of mammalian sperm.
Nature **170**, 326

Avery, B., and Greve, T. (1995)

Impact of Percoll on bovine spermatozoa used for in vitro fertilization.
Theriogenology **44**, 871-8

Ax, R. L., Dickson, K., and Lenz, R. W. (1985)

Induction of acrosome reactions by chondroitin sulfates in vitro corresponds to nonreturn rates of dairy bulls.
J Dairy Sci **68**, 387-90

Ayoub, M. A., and Hunter, A. G. (1993)

Inhibitory effect of bovine follicular fluid on in vitro maturation of bovine oocytes.
J Dairy Sci **76**, 95-100

Bailey, J. L., Robertson, L., and Buhr, M. M. (1994)

Relationships among in vivo fertility, computer-analysed motility and in vitro Ca^{2+} flux in bovine spermatozoa.
Can J Anim Sci **74**, 53-58

Ballachey, B. E., Evenson, D. P., and Saacke, R. G. (1988)

The sperm chromatin structure assay. Relationship with alternate tests of semen quality and heterospermic performance of bulls.
J Androl **9**, 109-15

Ballachey, B. E., Hohenboken, W. D., and Evenson, D. P. (1987)

Heterogeneity of sperm nuclear chromatin structure and its relationship to bull fertility.
Biol Reprod **36**, 915-25

Barth, A. D., Bowman, P. A., Bo, G. A., and Mapletoft, R. J. (1992)

Effect of narrow sperm head shape on fertility in cattle.
Can Vet J **33**, 31-39

Barth, A. D., and Oko, R. J. (1989)

Abnormal morphology of bovine spermatozoa.
1 ed. Ames: Iowa State University Press, 131-92

Behnke, E. J. (1987)

Bovine sperm capacitation and oocyte maturation in vitro.
Ph.D. Thesis, Univ. Minnesota, St. Paul

Berger, T., Marrs, R. P., and Moyer, D. L. (1985)

Comparison of techniques for selection of motile spermatozoa.
Fertil Steril **43**, 268-73

Berger, T., Turner, K. O., Meizel, S., and Hedrick, J. L. (1989)

Zona pellucida-induced acrosome reaction in boar sperm.
Biol Reprod **40**, 525-30

Bhattacharyya, A., and Pakrashi, A. (1991)

Requirement of an extracellular energy substrate for the guinea pig sperm acrosome reaction induced by calcium ionophore.

Mol Reprod Dev **28**, 286-91.

Bird, J. M., Carey, S., and Houghton, J. A. (1989)

Motility and acrosomal changes in ionophore-treated bovine spermatozoa and their relationship with in vitro penetration of zona-free hamster oocytes.

Theriogenology **32**, 227-42

Blottner, S., Nehring, H., and Torner, H. (1990)

Individual differences in capacitation of bull spermatozoa by heparin in vitro: relationship to fertility.

Theriogenology **34**, 619-28

Boatman, D. E., Andrews, J. C., and Bavister, B. D. (1988)

A quantitative assay for capacitation: evaluation of multiple sperm penetration through the zona pellucida of salt-stored hamster eggs.

Gamete Res **19**, 19-29

Boatman, D. E., and Robbins, R. S. (1991)

Detection of a soluble acrosome reaction-inducing factor, different from serum albumin, associated with the ovulated egg-cumulus complex.

Mol Reprod Dev **30**, 396-401

Boice, M. L., Geisert, R. D., Blair, R. M., and Verhage, H. G. (1990)

Identification and characterization of bovine oviductal glycoproteins synthesized at estrus.

Biol Reprod **43**, 457-65

Bondioli, K. R., and Wright, R. W., Jr. (1983)

In vitro fertilization of bovine oocytes by spermatozoa capacitated in vitro.

J Anim Sci **57**, 1001-5

Boquest, A. C., and Summers, P. M. (1999)

Effects of 17 β -oestradiol or oestrous stage-specific cow serum on the ability of bovine oviductal epithelial cell monolayers to prolong the viability of bull spermatozoa.

Anim Reprod Sci **57**, 1-14

Bousquet, D., and Brackett, B. G. (1982)

Penetration of zona-free hamster ova as a test to assess fertilizing ability of bull sperm after frozen storage.

Theriogenology **17**, 199-213

Bousquet, D., Brackett, B. G., Dressel, M. A., and H., A. C. (1983)

Efforts to correlate laboratory with field observations on bull semen fertility.

Theriogenology **20**, 601-13

Brackett, B. G., Bousquet, D., Boice, M. L., Donawick, W. J., Evans, J. F., and Dressel, M. A. (1982a)

Normal development following in vitro fertilization in the cow.

Biol Reprod **27**, 147-58

- Brackett, B. G., Cofone, M. A., Boice, M. L., and Bousquet, D. (1982b)**
Use of zona-free hamster ova to assess sperm fertilizing ability of bull and stallion.
Gamete Res **5**, 217-27
- Brackett, B. G., Oh, Y. K., Evans, J. F., and Donawick, W. J. (1980)**
Fertilization and early development of cow ova.
Biol Reprod **23**, 189-205
- Brackett, B. G., and Oliphant, G. (1975)**
Capacitation of rabbit spermatozoa in vitro.
Biol Reprod **12**, 260-74
- Bradley, M. P., Van Eerten, M. T. W., Rayns, D. G., and Forrester, I. J. (1979)**
Membrane integrity and the regulation of calcium in mammalian spermatozoa.
Biol Reprod **20** (Suppl. 1), 61
- Brahmkshtri, B. P., Edwin, M. J., John, M. C., Nainar, A. M., and Krishnan, A. R. (1999)**
Relative efficacy of conventional sperm parameters and sperm penetration bioassay to assess bull fertility in vitro.
Anim Reprod Sci **54**, 159-68
- Braundmeier, A. G., Demers, J. M., Shanks, R. D., Saacke, R. G., and Miller, D. J. (2002)**
Examination of the binding ability of bovine spermatozoa to the zona pellucida as an indicator of fertility.
J Androl **23**, 645-51
- Breitbart, H. (2003)**
Signaling pathways in sperm capacitation and acrosome reaction.
Cell Mol Biol **49**, 321-7
- Budworth, P. R., Amann, R. P., and Chapman, P. L. (1988)**
Relationships between computerized measurements of motion of frozen-thawed bull spermatozoa and fertility.
J Androl **9**, 41-54
- Budworth, P. R., Amann, R. P., and Hammerstedt, R. H. (1987)**
A microcomputer-photographic method for evaluation of motility and velocity of bull sperm.
J Dairy Sci **70**, 1927-36
- Byrd, W. (1981)**
In vitro capacitation and the chemically induced acrosome reaction in bovine spermatozoa.
J Exp Zool **215**, 35-46
- Chang, M. C. (1951)**
Fertilizing capacity of spermatozoa deposited in the fallopian tubes.
Nature **168**, 697-98

Cheng, W. T. K. (1985)

In vitro fertilization of farm animals

Ph.D. Thesis, Anim. Res. Stn., Cambridge, Engl.

Chian, R. C., Lapointe, S., and Sirard, M. A. (1995a)

Capacitation in vitro of bovine spermatozoa by oviduct epithelial cell monolayer conditioned medium.

Mol Reprod Dev **42**, 318-24

Chian, R. C., Nakahara, H., Niwa, K., and Funahashi, H. (1992)

Fertilization and early cleavage in vitro of ageing bovine oocytes after maturation in culture.

Theriogenology, 665-72

Chian, R. C., Okuda, K., and Niwa, K. (1995b)

Influence of cumulus cells on in vitro fertilization of bovine oocytes derived from in vitro maturation.

Anim Reprod Sci **38**, 37-48

Chian, R. C., and Sirard, M. A. (1995)

Fertilizing ability of bovine spermatozoa cocultured with oviduct epithelial cells.

Biol Reprod **52**, 156-62

Coffman, G. L., Gaubatz, J. W., Yielding, K. L., and Yielding, L. W. (1982)

Demonstration of specific high affinity binding sites in plasmid DNA by photoaffinity labeling with an ethidium analog.

J Biol Chem **257**, 13205-7

Collin, S., Sirard, M. A., Dufour, M., and Bailey, J. L. (2000)

Sperm calcium levels and chlortetracycline fluorescence patterns are related to the in vivo fertility of cryopreserved bovine semen.

J Androl **21**, 938-43

Cormier, N., Sirard, M. A., and Bailey, J. L. (1997)

Premature capacitation of bovine spermatozoa is initiated by cryopreservation.

J Androl **18**, 461-8

Correa, J. R., Pace, M. M., and Zavos, P. M. (1997)

Relationships among frozen-thawed sperm characteristics assessed via the routine semen analysis, sperm functional tests and fertility of bulls in an artificial insemination program.

Theriogenology **48**, 721-31

Correa, J. R., and Zavos, P. M. (1996)

Preparation and recovery of frozen-thawed bovine spermatozoa via various sperm selection techniques employed in assisted reproductive technologies.

Theriogenology **46**, 1225-32

Crabo, B. C., Loseth, K. J., and Weidel, L. (1992)

Trapping of morphological types of bull spermatozoa by Sephadex/glass wool filters.

Proc 12th Int Congr Anim Reprod, 423-25

Cross, N. L., Morales, P., Overstreet, J. W., and Hanson, F. W. (1986)

Two simple methods for detecting acrosome reacted human sperm.

Gamete Res **15**, 213-26

Cumming, I. R. (1995)

Suitability of the intact acrosome method for the prediction of fertility in bovine artificial insemination.

Vet Rec **136**, 289-91

DasGupta, S., Mills, C. L., and Fraser, L. R. (1993)

Ca²⁺-related changes in the capacitation state of human spermatozoa assessed by a chlortetracycline fluorescence assay.

J Reprod Fertil **99**, 135-43

Davis, A. P., Graham, J. K., and Foote, R. H. (1987)

Homospermic versus heterospermic insemination of zona-free hamster eggs to assess fertility of fluorochrome-labeled acrosome-reacted bull spermatozoa.

Gamete Res **17**, 343-54

den Daas, N. (1992)

Laboratory assessment of semen characteristics.

Anim Reprod Sci **28**, 87-94

Dinkins, M. B., and Brackett, B. G. (2000)

Chlortetracycline staining patterns of frozen-thawed bull spermatozoa treated with beta-cyclodextrins, dibutyryl cAMP and progesterone.

Zygote **8**, 245-56

Dode, M. A., Rodovalho, N. C., Ueno, V. G., and Fernandes, C. E. (2002)

The effect of sperm preparation and co-incubation time on in vitro fertilization of *Bos indicus* oocytes.

Anim Reprod Sci **69**, 15-23

Dresdner, R. D., and Katz, D. F. (1981)

Relationships of mammalian sperm motility and morphology to hydrodynamic aspects of cell function.

Biol Reprod **25**, 920-30

Eaglesome, M. D., and Miller, S. A. (1989)

Prediction of fertility of bovine semen: preliminary studies with the hamster egg penetration test.

Theriogenology **31**, 643-51

Ehrenwald, E., Foote, R. H., and Parks, J. E. (1990)

Bovine oviductal fluid components and their potential role in sperm cholesterol efflux.

Mol Reprod Dev **25**, 195-204

Ellington, J. E. (1991)

The bovine oviduct and its role in reproduction: a review of the literature.

Cornell Vet **81**, 313-28

Ellington, J. E., Ignatz, G. G., Ball, B. A., Meyers-Wallen, V. N., and Currie, W. B. (1993)

De novo protein synthesis by bovine uterine tube (oviduct) epithelial cells changes during co-culture with bull spermatozoa.

Biol Reprod **48**, 851-6

Ellington, J. E., Padilla, A. W., Vredenburg, W. L., Dougherty, E. P., and Foote, R. H. (1991)

Behavior of bull spermatozoa in bovine uterine tube epithelial cell co-culture: an in vitro model for studying the cell interactions of reproduction.

Theriogenology **35**, 977-89

Ericsson, S. A., Garner, D. L., Thomas, C. A., Downing, T. W., and Marshall, C. E. (1993)

Interrelationships among fluorometric analyses of spermatozoal function, classical semen quality parameters and the fertility of frozen-thawed bovine spermatozoa.

Theriogenology **39**, 1009-24

Evenson, D., and Jost, L. (2000)

Sperm chromatin structure assay is useful for fertility assessment.

Methods Cell Sci **22**, 169-89

Eyestone, W. H., and First, N. L. (1989)

Co-culture of early cattle embryos to the blastocyst stage with oviducal tissue or in conditioned medium.

J Reprod Fertil **85**, 715-20

Farrell, P. B., Presicce, G. A., Brockett, C. C., and Foote, R. H. (1998)

Quantification of bull sperm characteristics measured by computer-assisted sperm analysis (CASA) and the relationship to fertility.

Theriogenology **49**, 871-9

Fazeli, A. R., Steenweg, W., Bevers, M. M., de Loos, F. A., van den Broek, J., and Colenbrander, B. (1993)

Development of a sperm zona pellucida binding assay for bull semen.

Vet Rec **132**, 14-6

Fazeli, A. R., Zhang, B. R., Steenweg, W., Larsson, B., Beyers, M. M., van den Broek, J., Rodriguez-Martinez, H., and Colenbrander, B. (1997)

Relationship between sperm-zona pellucida binding assays and the 56-day nonreturn rate of cattle inseminated with frozen-thawed bull semen.

Theriogenology **48**, 853-63

Flesch, F. M., Wijnand, E., van de Lest, C. H., Colenbrander, B., van Golde, L. M., and Gadella, B. M. (2001)

Capacitation dependent activation of tyrosine phosphorylation generates two sperm head plasma membrane proteins with high primary binding affinity for the zona pellucida.

Mol Reprod Dev **60**, 107-15

Florman, H. M., and First, N. L. (1988)

The regulation of acrosomal exocytosis. I. Sperm capacitation is required for the induction of acrosome reactions by the bovine zona pellucida in vitro.

Dev Biol **128**, 453-63

Forster, M. S., Smith, W. D., Lee, W. I., Berger, R. E., Karp, L. E., and Stenchever, M. A. (1983)

Selection of human spermatozoa according to their relative motility and their interaction with zona-free hamster eggs.

Fertil Steril **40**, 655-60

Franken, D. R., Bastiaan, H. S., Kidson, A., Wranz, P., and Habenicht, U. F. (1997)

Zona pellucida mediated acrosome reaction and sperm morphology.

Andrologia **29**, 311-7

Fraser, L. R., Abeydeera, L. R., and Niwa, K. (1995)

Ca²⁺-regulating mechanisms that modulate bull sperm capacitation and acrosomal exocytosis as determined by chlortetracycline analysis.

Mol Reprod Dev **40**, 233-41

Fukui, Y., Sonoyama, T., Mochizuki, H., and Ono, H. (1990)

Effects of heparin dosage and sperm capacitation time on in vitro fertilization and cleavage of bovine oocytes matured in vitro.

Theriogenology **34**, 579-91

Gerena, R. L., and Killian, G. J. (1990)

Electrophoretic characterization of proteins in oviduct fluid of cows during the estrous cycle.

J Exp Zool **256**, 113-20

Gorus, F. K., and Pipeleers, D. G. (1981)

A rapid method for the fractionation of human spermatozoa according to their progressive motility.

Fertil Steril **35**, 662-5

Graham, E. F., and Graham, J. K. (1990)

The effect of whole ejaculate filtration on the morphology and the fertility of bovine semen.

J Dairy Sci **73**, 91-7

Graham, J. K., and Foote, R. H. (1987a)

Dilauroylphosphatidylcholine liposome effects on the acrosome reaction and in vitro penetration of zona-free hamster eggs by bull sperm: I. A fertility assay for fresh semen.

Gamete Res **16**, 133-45

Graham, J. K., and Foote, R. H. (1987b)

Dilauroylphosphatidylcholine liposome effects on the acrosome reaction and in vitro penetration of zona-free hamster eggs by bull sperm: II. A fertility assay for frozen-thawed semen.

Gamete Res **16**, 147-58

- Graham, J. K., Foote, R. H., and Parrish, J. J. (1986)**
Effect of dilauroylphosphatidylcholine on the acrosome reaction and subsequent penetration of bull spermatozoa into zona-free hamster eggs.
Biol Reprod **35**, 413-24
- Grippo, A. A., Anderson, S. H., Chapman, D. A., Henault, M. A., and Killian, G. J. (1994)**
Cholesterol, phospholipid and phospholipase activity of ampullary and isthmic fluid from the bovine oviduct.
J Reprod Fertil **102**, 87-93
- Grippo, A. A., Henault, M. A., Anderson, S. H., and Killian, G. J. (1992)**
Cation concentrations in fluid from the oviduct ampulla and isthmus of cows during the estrous cycle.
J Dairy Sci **75**, 58-65
- Grippo, A. A., Way, A. L., and Killian, G. J. (1995)**
Effect of bovine ampullary and isthmic oviductal fluid on motility, acrosome reaction and fertility of bull spermatozoa.
J Reprod Fertil **105**, 57-64
- Gruppen, C. G., Nagashima, H., and Nottle, M. B. (1997)**
Asynchronous meiotic progression in porcine oocytes matured in vitro: a cause of polyspermic fertilization?
Reprod Fertil Dev **9**, 187-91
- Guyader, C., and Chupin, D. (1991)**
Capacitation of fresh bovine spermatozoa on bovine epithelial oviduct cell monolayers.
Theriogenology **36**, 505-12
- Haake, S. (2001)**
Computergestützte Untersuchung von Spermienkopfanomalien nach einer induzierten Spermatogenesestörung beim Bullen
Diss vet med, München, 36-39
- Hammerstedt, R. H., Volonte, C., and Racker, E. (1988)**
Motility, heat, and lactate production in ejaculated bovine sperm.
Arch Biochem Biophys **266**, 111-23
- Handrow, R. R., First, N. L., and Parrish, J. J. (1989)**
Calcium requirement and increased association with bovine sperm during capacitation by heparin.
J Exp Zool **252**, 174-82
- Handrow, R. R., Lenz, R. W., and Ax, R. L. (1982)**
Structural comparisons among glycosaminoglycans to promote an acrosome reaction in bovine spermatozoa.
Biochem Biophys Res Commun **107**, 1326-32

Harkema, W., Harrison, R. A., Miller, N. G., Topper, E. K., and Woelders, H. (1998)

Enhanced binding of zona pellucida proteins to the acrosomal region of the intact boar spermatozoa in response to fertilizing conditions: a flow cytometric study.

Biol Reprod **58**, 421-30

Henault, M. A., and Killian, G. J. (1995)

Effects of sperm preparation and bull fertility on in vitro penetration of zona-free bovine oocytes.

Theriogenology **43**, 739-49

Henley, N., Baron, C., and Roberts, K. D. (1994)

Flow cytometric evaluation of the acrosome reaction of human spermatozoa: a new method using a photoactivated supravital stain.

Int J Androl **17**, 78-84

Henault, M. A., Way, A. L., and Killian, G. J. (1992)

A sperm penetration assay utilizing zona-free bovine oocytes.

J Anim Sci **70** (Suppl. 1), 257

Hillery, F. L., Parrish, J. J., and First, N. L. (1990)

Bull specific effect on fertilization and embryo development in vitro.

Theriogenology **33**, 249

Hinsch, K. D., and Hinsch, E. (1999)

The zona pellucida 'receptors' ZP1, ZP2 and ZP3.

Andrologia **31**, 320-2

Holzmann, A. (1987)

Die objektive Beurteilung der Spermatozoenmotilität - Entwicklung eines neuen Untersuchungsverfahrens.

Wien Tierärztl Mschr **74**, 193-202, 243-250, 282-288

Hunter, R. H., Flechon, B., and Flechon, J. E. (1991)

Distribution, morphology and epithelial interactions of bovine spermatozoa in the oviduct before and after ovulation: a scanning electron microscope study.

Tissue Cell **23**, 641-56

Hunter, R. H., and Wilmut, I. (1984)

Sperm transport in the cow: peri-ovulatory redistribution of viable cells within the oviduct.

Reprod Nutr Dev **24**, 597-608

Hunter, R. H. F. (1987)

The timing of capacitation in mammalian spermatozoa - a reinterpretation.

Res Reprod **19**, 3-4

Ijaz, A., and Hunter, A. G. (1989a)

Effect of washing and capacitating media pH on bull sperm motility, acrosome integrity, and ability to penetrate zona-free hamster oocytes.

J Dairy Sci **72**, 2691-9

Ijaz, A., and Hunter, A. G. (1989b)

Evaluation of calcium-free Tyrode' s sperm capacitation medium for use in bovine in vitro fertilization.

J Dairy Sci **72**, 3280-5

Ijaz, A., and Hunter, A. G. (1989c)

Induction of bovine sperm capacitation by TEST-yolk semen extender.

J Dairy Sci **72**, 2683-90

Ijaz, A., and Hunter, A. G. (1992)

Evaluation of a TEST-yolk sperm capacitation system for use in bovine in vitro fertilization.

J Dairy Sci **75**, 394-8

Ijaz, A., Lambert, R. D., and Sirard, M. A. (1994)

In vitro-cultured bovine granulosa and oviductal cells secrete sperm motility-maintaining factor(s).

Mol Reprod Dev **37**, 54-60

Iqbal, N., and Hunter, A. G. (1995a)

Comparison of bovine sperm capacitation systems for ability of sperm to penetrate zona-free hamster oocytes and bovine oocytes matured in vitro.

J Dairy Sci **78**, 77-83

Iqbal, N., and Hunter, A. G. (1995b)

Comparison of various bovine sperm capacitation systems for their ability to alter the net negative surface charge of spermatozoa.

J Dairy Sci **78**, 84-90

Iqbal, N., and Hunter, A. G. (1995c)

Effect of various capacitation systems on bovine sperm motion characteristics, acrosome integrity, and induction of hyperactivation.

J Dairy Sci **78**, 91-102

Iritani, A., Kasai, M., Niwa, K., and Song, H. B. (1984)

Fertilization in vitro of cattle follicular oocytes with ejaculated spermatozoa capacitated in a chemically defined medium.

J Reprod Fertil **70**, 487-92

Jansen, R. P. S. (1984)

Endocrine response in the fallopian tube.

Endocrine Reviews **5**, 525-51

Januskauskas, A., Gil, J., Söderquist, L., and Rodriguez-Martinez, H. (2000a)

Relationship between sperm response to glycosaminoglycans in vitro and non-return rates of swedish dairy AI bulls.

Reprod Domest Anim **35**, 207- 12

- Januskauskas, A., Johannisson, A., and Rodriguez-Martinez, H. (2001)**
Assessment of sperm quality through fluorometry and sperm chromatin structure assay in relation to field fertility of frozen-thawed semen from Swedish AI bulls.
Theriogenology **55**, 947-61
- Januskauskas, A., Johannisson, A., and Rodriguez-Martinez, H. (2003)**
Subtle membrane changes in cryopreserved bull semen in relation with sperm viability, chromatin structure, and field fertility.
Theriogenology **60**, 743-58
- Januskauskas, A., Johannisson, A., Soderquist, L., and Rodriguez-Martinez, H. (2000b)**
Assessment of sperm characteristics post-thaw and response to calcium ionophore in relation to fertility in Swedish dairy AI bulls.
Theriogenology **53**, 859-75
- Jensen, C. P., and Muirhead, A. K. (1988)**
A novel method for live/dead discrimination in fixed samples.
Cytometry **2**, 77
- Jha, K. N., Kameshwari, D. B., and Shivaji, S. (2003)**
Role of signaling pathways in regulating the capacitation of mammalian spermatozoa.
Cell Mol Biol **49**, 329-40.
- Jiang, S., Yang, X., Chang, S., Heuwieser, W., and H., F. R. (1991)**
Effect of sperm capacitation and oocyte maturation procedures on fertilization and development of bovine oocytes in vitro.
Theriogenology **35**, 218
- Kandell, R. L., Bellin, M. E., Hajokins, H. E., and Ax, R. L. (1992)**
Bull fertility was related to distribution of heparin binding proteins in sperm membrane and seminal plasma.
J Androl **13** (Suppl. 1), 30
- Kaul, G., Sharma, G. S., Singh, B., and Gandhi, K. K. (2001)**
Capacitation and acrosome reaction in buffalo bull spermatozoa assessed by chlortetracycline and Pisum sativum agglutinin fluorescence assay.
Theriogenology **55**, 1457-68
- Keefer, C. L., and Paprocki, A. M. (1995)**
Effect of Percoll following sperm separation on in vitro fertilization of bovine oocytes.
Theriogenology **43**, 244
- Kerr, C. L., Hanna, W. F., Shaper, J. H., and Wright, W. W. (2002)**
Characterization of zona pellucida glycoprotein 3 (ZP3) and ZP2 binding sites on acrosome-intact mouse sperm.
Biol Reprod **66**, 1585-95

Keskintepe, L., and Brackett, B. G. (1996)

In vitro developmental competence of in vitro-matured bovine oocytes fertilized and cultured in completely defined media.

Biol Reprod **55**, 333-39

Keskintepe, L., Burnley, C. A., and Brackett, B. G. (1995)

Production of viable bovine blastocysts in defined in vitro conditions.

Biol Reprod **52**, 1410-7

Killian, G. J., Chapman, D. A., Kavanaugh, J. F., Deaver, D. R., and Wiggin, H. B. (1989)

Changes in phospholipids, cholesterol and protein content of oviduct fluid of cows during the oestrous cycle.

J Reprod Fertil **86**, 419-26

Killian, G. J., Chapman, D. A., and Rogowski, L. A. (1993)

Fertility-associated proteins in Holstein bull seminal plasma.

Biol Reprod **49**, 1202-7

King, R. S., Anderson, S. H., and Killian, G. J. (1994)

Effect of bovine oviductal estrus-associated protein on the ability of sperm to capacitate and fertilize oocytes.

J Androl **15**, 468-78

King, W. A., Xu, K. P., Sirard, M. A., Greve, T., Leclerc, P., Lambert, R. D., and Jacques, P. (1988)

Cytogenetic study of parthenogenetically activated bovine oocytes matured in vivo and in vitro.

Gamete Res **20**, 265-74.

Kjaestad, H., Ropstad, E., and Berg, K. A. (1993)

Evaluation of spermatological parameters used to predict the fertility of frozen bull semen.

Acta Vet Scand **34**, 299-303

Kopf, G. S., and Gerton, G. L. (1991)

The mammalian sperm acrosome and the acrosome reaction.

In P. M. Wassarman (Hrsg.): *Elements of Mammalian Fertilization*

CRC Press, Boca Raton, Florida, 153-203.

Kreysing, U., Nagai, T., and Niemann, H. (1997)

Male-dependent variability of fertilization and embryo development in two bovine in vitro fertilization systems and the effects of casein phosphopeptides (CPPs).

Reprod Fertil Dev **9**, 465-74

Kroetsch, T. G., and Stubbings, R. B. (1992)

Sire and insemination dose does effect in vitro fertilization of bovine oocytes.

Theriogenology **37**, 240

Kurtu, J. M., Ambrose, J. D., and Rajamahendran, R. (1996)

Cleavage rate of bovine oocytes in-vitro is affected by bulls but not by sperm concentrations.

Theriogenology **45**, 257

Landim-Alvarenga, F. C., Alvarenga, M. A., Seidel, G. E., Jr., Squires, E. L., and Graham, J. K. (2001)

Penetration of zona-free hamster, bovine and equine oocytes by stallion and bull spermatozoa pretreated with equine follicular fluid, dilauroylphosphatidylcholine or calcium ionophore A23187.

Theriogenology **56**, 937-53

Langlais, J., and Roberts, K. D. (1985)

A molecular membrane model of sperm capacitation and the acrosome reaction of mammalian spermatozoa.

Gamete Res **12**, 183-224

Lapointe, S., Chian, R.-C., and Sirard, M.-A. (1995)

Effects of estrous cycle, steroids and localization of oviductal cells on in vitro secretion of sperm motility factor(s).

Theriogenology **44**, 119-28

Larsson, B., and Rodriguez-Martinez, H. (2000)

Can we use in vitro fertilization tests to predict semen fertility?

Anim Reprod Sci **60-61**, 327-36

Lechniak, D., Cieslak, D., and Sosnowski, J. (1998)

Cytogenetic analysis of bovine parthenotes after spontaneous activation in vitro.

Theriogenology **49**, 779-85

Leese, H. J. (1988)

The formation and function of oviduct fluid.

J Reprod Fertil **82**, 843-56

Leibfried, L., and First, N. L. (1979)

Characterization of bovine follicular oocytes and their ability to mature in vitro.

J Anim Sci **48**, 76-86.

Leibfried-Rutledge, M. L., Critser, E. S., and First, N. L. (1986)

Effects of fetal calf serum and bovine serum albumin on in vitro maturation and fertilization of bovine and hamster cumulus-oocyte complexes.

Biol Reprod **35**, 850-7

Lenz, R. W., Martin, J. L., Bellin, M. E., and Ax, R. L. (1988)

Predicting fertility of dairy bulls by inducing acrosome reactions in sperm with chondroitin sulfates.

J Dairy Sci **71**, 1073-7

Linford, E., Glover, F. A., Bishop, C., and Stewart, D. L. (1976)

The relationship between semen evaluation methods and fertility in the bull.

J Reprod Fertil **47**, 283-91

Liu, D. Y., and Baker, H. W. (1996)

Relationship between the zona pellucida (ZP) and ionophore A23187-induced acrosome reaction and the ability of sperm to penetrate the ZP in men with normal sperm-ZP binding.

Fertil Steril **66**, 312-5

Lonergan, P. (1994)

The application of in vitro fertilization techniques to the prediction of bull fertility.

Reprod Dom Anim **29**, 12-21

Long, C. R., Damiani, P., Pinto-Correia, C., MacLean, R. A., DUBY, R. T., and Robl, J. M. (1994)

Morphology and subsequent development in culture of bovine oocytes matured in vitro under various conditions of fertilization.

J Reprod Fertil **102**, 361-9

Lopata, A., Patullo, M. J., Chang, A., and James, B. (1976)

A method for collecting motile spermatozoa from human semen.

Fertil Steril **27**, 677-84

Madison, V., Greve, T., Avery, B., and Wamberg, T. (1991)

The effect of endotoxin-contaminated medium on in vitro fertilization and development of bovine oocytes matured in vitro.

Reprod Nutr Dev **31**, 159-65

Malayer, J. R., Hansen, P. J., and Buhi, W. C. (1988)

Secretion of proteins by cultured bovine oviducts collected from estrus through early diestrus.

J Exp Zool **248**, 345-53

Markert, C. L., and Seidel, G. E. (1981)

Parthenogenesis, identical twins and cloning in mammals.

Brackett B. G., Seidel, G. E., Seidel, S.M. (Hrsg.)

Academic Press, New York, 81-200

Marks, J. L., and Ax, R. L. (1985)

Relationship of nonreturn rates of dairy bulls to binding affinity of heparin to sperm.

J Dairy Sci **68**, 2078-82

Marquant-Le Guienne, B., Humblot, P., Thibier, M., and Thibault, C. (1990)

Evaluation of bull semen fertility by homologous in vitro fertilization tests.

Reprod Nutr Dev **30**, 259-66

McNutt, T., Rogowski, L., Vasilatos-Younken, R., and Killian, G. (1992)

Adsorption of oviductal fluid proteins by the bovine sperm membrane during in vitro capacitation.

Mol Reprod Dev **33**, 313-23

McNutt, T. L., and Killian, G. J. (1991)

Influence of bovine follicular and oviduct fluids on sperm capacitation in vitro.

J Androl **12**, 244-52

Mendoza, C., Carreras, A., Moos, J., and Tesarik, J. (1992)

Distinction between true acrosome reaction and degenerative acrosome loss by a one-step staining method using *Pisum sativum* agglutinin.

J Reprod Fertil **95**, 755-63

Merkies, K., Larsson, B., Kjellén, L., Zhang, B. R., Buhr, M. M., and Rodriguez-Martinez, H. (2000)

Relationship between heparin binding to spermatozoa and the fertility of dairy bulls.

Theriogenology **54**, 1249-58

Miller, D. J., Behnke, E. J., and Hunter, A. G. (1985)

In vitro fertilization of bovine oocytes to predict bull non-return rates.

J Dairy Sci **68** (Suppl. 1), 173-4

Mizushima, S., and Fukui, Y. (2001)

Fertilizability and developmental capacity of bovine oocytes cultured individually in a chemically defined maturation medium.

Theriogenology **55**, 1431-45

Morales, P., Vantman, D., Barros, C., and Vigil, P. (1991)

Human spermatozoa selected by Percoll gradient or swim-up are equally capable of binding to the human zona pellucida and undergoing the acrosome reaction.

Hum Reprod **6**, 401-4

Mortimer, D. (2000)

Sperm preparation methods.

J Androl **21**, 357-66

Mortimer, D., Mortimer, S. T., Shu, M. A., and Swart, R. (1990)

A simplified approach to sperm-cervical mucus interaction testing using a hyaluronate migration test.

Hum Reprod **5**, 835-41

Mortimer, S. T., Swan, M. A., and Mortimer, D. (1998)

Effect of seminal plasma on capacitation and hyperactivation in human spermatozoa.

Hum Reprod **13**, 2139-46

Nagai, T. (1987)

Parthenogenetic activation of cattle follicular oocytes in vitro with ethanol.

Gamete Res **16**, 243-9

Nagano, M., Takahashi, Y., and Katagiri, S. (1999)

In vitro fertilization and cortical granule distribution of bovine oocytes having heterogeneous ooplasm with dark clusters.

J Vet Med Sci **61**, 531-5

Naz, R. K., and Ahmad, K. (1994)

Molecular identities of human sperm proteins that bind human zona pellucida: nature of sperm-zona interaction, tyrosine kinase activity, and involvement of FA-1.

Mol Reprod Dev **39**, 397-408

Niwa, K., Park, C. K., and Okuda, K. (1991)

Penetration in vitro of bovine oocytes during maturation by frozen-thawed spermatozoa.
J Reprod Fertil **91**, 329-36

Niwa, K., and Oghoda, O. (1988)

Synergistic effect of caffeine und heparin on in-vitro fertilization of cattle oocytes matured in culture.

Theriogenology **30**, 733-41

Nolan, J. P., Graham, J. K., and Hammerstedt, R. H. (1992)

Artificial induction of exocytosis in bull sperm.

Arch Biochem Biophys **292**, 311-22

Oghoda, O., Niwa, K., Yuhara, M., Takahashi, S., and Kanoya, K. (1988)

Variations in penetration rates in vitro of bovine follicular oocytes do not reflect conception rates after artificial insemination using frozen semen from different bulls.

Theriogenology **29**, 1375-81

Palma, G., Braun, J., Stolla, R., and Brem, G. (1996)

The ability to produce embryos in vitro using semen from bulls with a low non-return rate.

Theriogenology **45**, 308

Park, C.-K., Oghoda, O., and Niwa, K. (1989)

Penetration of bovine follicular oocytes by frozen-thawed spermatozoa in the presence of caffeine and heparin.

J Reprod Fertil **86**, 577-82

Parrish, J. J., and Foote, R. H. (1987)

Quantification of bovine sperm separation by a swim-up method. Relationship to sperm motility, integrity of acrosomes, sperm migration in polyacrylamide gel and fertility.

J Androl **8**, 259-66

Parrish, J. J., Krogenaes, A., and Susko-Parrish, J. L. (1995)

Effect of bovine sperm separation by either swim up or Percoll method on success of in vitro fertilization and early embryonic development.

Theriogenology **44**, 859-69

Parrish, J. J., Susko-Parrish, J. L., and First, N. L. (1985)

Effect of heparin and chondroitin sulfate on the acrosome reaction and fertility of bovine sperm in vitro.

Theriogenology **24**, 537-49

Parrish, J. J., Susko-Parrish, J. L., and First, N. L. (1988a)

Capacitation of bovine sperm by heparin is correlated with ³H-heparin binding and is blocked by protamine sulfate.

Biol Reprod **38** (Suppl. 1), 59

Parrish, J. J., Susko-Parrish, J. L., Winer, M. A., and First, N. L. (1988b)

Capacitation of bovine sperm by heparin.

Biol Reprod **38**, 1171-80

Parrish, J. J., Susko-Parrish, J. L., and First, N. L. (1989a)

Capacitation of bovine sperm by heparin: inhibitory effect of glucose and role of intracellular pH.

Biol Reprod **41**, 683-99

Parrish, J. J., Susko-Parrish, J. L., Handrow, R. R., Sims, M. M., and First, N. L. (1989b)

Capacitation of bovine spermatozoa by oviduct fluid.

Biol Reprod **40**, 1020-5

Parrish, J. J., Susko-Parrish, J. L., Leibfried-Rutledge, M. L., Critser, E. S., Eyestone, W. H., and First, N. L. (1986)

Bovine in vitro fertilization with frozen-thawed semen.

Theriogenology **25**, 591-600

Parrish, J. J., Susko-Parrish, J. L., Uguz, C., and First, N. L. (1994)

Differences in the role of cyclic adenosine 3' ,5monophosphate during capacitation of bovine sperm by heparin or oviduct fluid.

Biol Reprod **51**, 1099-108

Parrish, J. J., Vredenburgh, W. L., and Lavin, C. A. (1993)

Increases in bovine sperm intracellular calcium (Ca_i) and pH (pH_i) during capacitation.

Biol Reprod **48** (Suppl. 1), 106

Pavlok, A. (2000)

D-penicillamine and granulosa cells can effectively extend the fertile life span of bovine frozen-thawed spermatozoa in vitro: effect on fertilization and polyspermy.

Theriogenology **53**, 1135-46

Pavlok, A., Kalab, P., and Bobak, P. (1997)

Fertilisation competence of bovine normally matured or aged oocytes derived from different antral follicles: morphology, protein synthesis, H1 and MBP kinase activity.

Zygote **5**, 235-46

Pavlok, A., Kubelka, M., and Peknicova, J. (2001)

The effect of various capacitation active compounds and capacitation time on the in vitro fertility and protein tyrosine phosphorylation profiles of bovine sperm.

Zygote **9**, 25-38

Pavlok, A., Lucas-Hahn, A., and Niemann, H. (1992)

Fertilization and developmental competence of bovine oocytes derived from different categories of antral follicles.

Mol Reprod Dev **31**, 63-7

Pereira, R. J., Tuli, R. K., Wallenhorst, S., and Holtz, W. (2000)

The effect of heparin, caffeine and calcium ionophore A23187 on in vitro induction of the acrosome reaction in frozen-thawed bovine and caprine spermatozoa.

Theriogenology **54**, 185-92

Pérez, L. J., Valcárel, A., de las Heras, M. A., Moses, D. F., and Baldassarre, H. (1995)

In vitro capacitation and induction of acrosomal exocytosis in ram spermatozoa as assessed by the chlortetracycline assay.

Theriogenology **45**, 1037-46

Pertoft, H., Laurent, T. C., Laas, T., and Kagedal, L. (1978)

Density gradients prepared from colloidal silica particles coated by polyvinylpyrrolidone (Percoll).

Anal Biochem **88**, 271-82

Peterson, R. N., Russell, L. D., and Hunt, W. P. (1984)

Evidence for specific binding of uncapacitated boar spermatozoa to porcine zonae pellucidae in vitro.

J Exp Zool **231**, 137-47

Plante, L., and King, W. A. (1996)

In vitro development of spontaneously activated bovine oocytes.

J Assist Reprod Genet **13**, 435-46

Pocar, P., Brevini, T. A., Perazzoli, F., Cillo, F., Modina, S., and Gandolfi, F. (2001a)

Cellular and molecular mechanisms mediating the effects of polychlorinated biphenyls on oocyte developmental competence in cattle.

Mol Reprod Dev **60**, 535-41

Pocar, P., Perazzoli, F., Luciano, A. M., and Gandolfi, F. (2001b)

In vitro reproductive toxicity of polychlorinated biphenyls: effects on oocyte maturation and developmental competence in cattle.

Mol Reprod Dev **58**, 411-6

Pollard, J. W., Plante, C., King, W. A., Hansen, P. J., Betteridge, K. J., and Suarez, S. S. (1991)

Fertilizing capacity of bovine sperm may be maintained by binding of oviductal epithelial cells.

Biol Reprod **44**, 102-7

Presicce, G. A., and Yang, X. (1994)

Nuclear dynamics of parthenogenesis of bovine oocytes matured in vitro for 20 and 40 hours and activated with combined ethanol and cycloheximide treatment.

Mol Reprod Dev **37**, 61-8

Pressman, B. C. (1976)

Biological applications of ionophores.

Annu Rev Biochem **45**, 501-30

Ranganathan, S., Ganguly, A. K., and Datta, K. (1994)

Evidence for presence of hyaluronan binding protein on spermatozoa and its possible involvement in sperm function.

Mol Reprod Dev **38**, 69-76

Rodriguez-Martinez, H., Larsson, B., and Pertoft, H. (1997)

Evaluation of sperm damage and techniques for sperm clean-up.
Reprod Fertil Dev **9**, 297-308

Roh, S., Hwang, W., Lee, B., Lim, J., and Lee, E. (2002)

Improved monospermic fertilization and subsequent blastocyst formation of bovine oocytes fertilized in vitro in a medium containing NaCl of decreased concentration.
J Vet Med Sci **64**, 667-71

Rosenkranz, C., und Holzmann, A. (1995)

Der Einfluß von Samenaufbereitung und Kulturmedium auf den IVF-Erfolg beim Rind.
J Vet Med A **42**, 139-43

Rosenkranz, C., and Holzmann, A. (1997)

The effect of sperm preparation on the timing of penetration in bovine in vitro fertilization.
Anim Reprod Sci **46**, 47-53

Rosenkranz, C., Holzmann, A., Auer, W., and Dickie, M. B. (1992)

Successful in vitro fertilization without the supplements heparin, hypotaurine and epinephrine by using transmigrated semen.
J Reprod Fertil Abstract Series **9**, 55

Rosenkranz, C., Holzmann, A., und Dickie, M. B. (1994)

In vitro Fertilisation mit transmigriertem (TM) Rindersamen.
Reprod Domest Anim **29**, 326-32

Ruiz-Romero, J., Antich, M., and Bassas, L. (1995)

Choosing among different technical variations of Percoll centrifugation for sperm selection.
Andrologia **27**, 149-53

Saacke, R. G., Dalton, J. C., Nadir, S., Nebel, R. L., and Bame, J. H. (2000)

Relationship of seminal traits and insemination time to fertilization rate and embryo quality.
Anim Reprod Sci **60-61**, 663-77

Saacke, R. G., Nadir, S., and Nebel, R. L. (1994)

Relationship of semen quality to sperm transport, fertilization, and embryo quality in ruminants.
Theriogenology **41**, 45-50

Saacke, R. G., Vinson, W. E., O'Connor, M. L., Chandler, J. E., Mullins, J., Amann, R. P., Marshall, C. E., Wallace, R. A., Vincel, W. N., and Kellgren, H. C. (1980)

The relationship of semen quality and fertility: a heterospermic study.
Proc 8th Tech Conf Artif Insem Reprod, NAAB, 71-8

Saacke, R. G., and White, J. M. (1972)

Semen quality tests and their relationship to fertility.
Proc 4th Tech Conf Artif Insem Reprod, NAAB, 22-7

Sailer, B. L., Jost, L. K., and Evenson, D. P. (1996)

Bull sperm head morphometry related to abnormal chromatin structure and fertility.
Cytometry **24**, 167-73

Salisbury, G. W., and VanDemark, N. L. (1961)

Physiology of reproduction and artificial insemination in cattle.
1st ed. Freeman, San Francisco

Sarkadi, B., Szasz, I., and Gardos, G. (1976)

The use of ionophores of rapid loading of human red cells with radioactive cations for cation-pump studies.
J Membr Biol **26**, 357-70

Schleuning, W. D., and Fritz, H. (1976)

Sperm acrosin.
Methods Enzymol **45**, 330-42

Schneeweiss, E. (1994)

Evaluierung unterschiedlicher Inseminationsdosen in der bovinen IVF im Vergleich zwischen Swimup und Transmigration.
Wien Tierärztl Mschr **81**, 48-9

Schneider, C. S., Ellington, J. E., and Wright, R. W., Jr. (1999)

Relationship between bull field fertility and in vitro embryo production using sperm preparation methods with and without somatic cell co-culture.
Theriogenology **51**, 1085-98

Shamsuddin, M., and Larsson, B. (1993)

In vitro development of bovine embryos after fertilization using semen from different donors.
Reprod Domest Anim **28**, 77-84

Shamsuddin, M., and Rodriguez-Martinez, H. (1994)

A simple, non-traumatic swim up method for the selection of spermatozoa for in vitro fertilization in the bovine.
Anim Reprod Sci **36**, 61-75

Shamsuddin, M., Rodriguez-Martinez, H., and Larsson, B. (1993)

Fertilizing capacity of bovine spermatozoa selected after swim-up in hyaluronic acid-containing medium.
Reprod Fertil Dev **5**, 307-15

Shannon, P., and Vishwanath, R. (1995)

The effect of optimal and suboptimal concentrations of sperm on the fertility of fresh and frozen bovine semen and a theoretical model to explain the fertility differences.
Anim Reprod Sci **39**, 1-10

Söderquist, L., Rodriguez-Martinez, H., and Janson, L. (1991)

Post-thaw motility, ATP content and cytochrome C oxidase activity of A.I. bull spermatozoa in relation to fertility.
Zentralbl Veterinarmed A **38**, 165-74

- Soloy, E., Srsen, V., Pavlok, A., Hyttel, P., Thomsen, P. D., Smith, S. D., Prochazka, R., Kubelka, M., Hoier, R., Booth, P., Motlik, J., and Greve, T. (1997)**
Establishment of the block against sperm penetration in parthenogenetically activated bovine oocytes matured in vitro.
J Reprod Fertil **111**, 151-7
- Somfai, T., Bodo, S., Nagy, S., Papp, A. B., Ivancsics, J., Baranyai, B., Gocza, E., and Kovacs, A. (2002)**
Effect of swim up and Percoll treatment on viability and acrosome integrity of frozen-thawed bull spermatozoa.
Reprod Domest Anim **37**, 285-90
- Steinkamp, J. A., Stewart, C. C., and Crissman, H. A. (1982)**
Three-color fluorescence measurements on single cells excited at three laser wavelengths.
Cytometry **2**, 226-31
- Stubbings, R. B., and Wosik, C. P. (1991)**
Glass wool versus swim-up separation of bovine spermatozoa for in vitro fertilization.
Theriogenology **35**, 276
- Suarez, S. S., Vincenti, L., and Ceglia, M. W. (1987)**
Hyperactivated motility induced in mouse sperm by calcium ionophore A23187 is reversible.
J Exp Zool **244**, 331-6
- Suzuki, H., Liu, L., and Yang, X. (1999)**
Age-dependent development and surface ultrastructural changes following electrical activation of bovine oocytes.
Reprod Fertil Dev **11**, 159-65
- Tajik, P., Niwa, K., and Murase, T. (1993)**
Effects of different protein supplements in fertilization medium on in vitro penetration of cumulus-intact and cumulus-free bovine oocytes matured in culture.
Theriogenology **40**, 949-58
- Tajik, P., Wang, W. H., Okuda, K., and Niwa, K. (1994)**
In vitro fertilization of bovine oocytes in a chemically defined, protein-free medium varying the bicarbonate concentration.
Biol Reprod **50**, 1231-7
- Talbot, P., Summers, R. G., Hylander, B. L., Keough, E. M., and Franklin, L. E. (1976)**
The role of calcium in the acrosome reaction; an analysis using ionophore A23187.
J Exp Zool **198**, 383-92
- Tatemoto, H., Horiuchi, T., Maeda, T., Terada, T., and Tsutsumi, Y. (1994)**
Penetration by bull spermatozoa into the zona pellucida of dead bovine oocytes recovered from frozen-thawed ovaries.
Theriogenology **42**, 465-74

Terstappen, L. W., Shah, V. O., Conrad, M. P., Recktenwald, D., and Loken, M. R. (1988)

Discriminating between damaged and intact cells in fixed flow cytometric samples.
Cytometry **9**, 477-84

Tesarik, J., Mendoza, C., and Carreras, A. (1993)

Fast acrosome reaction measure: a highly sensitive method for evaluating stimulus-induced acrosome reaction.

Fertil Steril **59**, 424-30

Therien, I., Bleau, G., and Manjunath, P. (1995)

Phosphatidylcholine-binding proteins of bovine seminal plasma modulate capacitation of spermatozoa by heparin.

Biol Reprod **52**, 1372-9

Therien, I., Bousquet, D., and Manjunath, P. (2001)

Effect of seminal phospholipid-binding proteins and follicular fluid on bovine sperm capacitation.

Biol Reprod **65**, 41-51

Thundathil, J., Gil, J., Januskauskas, A., Larsson, B., Soderquist, L., Mapletoft, R., and Rodriguez-Martinez, H. (1999)

Relationship between the proportion of capacitated spermatozoa present in frozen-thawed bull semen and fertility with artificial insemination.

Int J Androl **22**, 366-73

Tibary, A., Graham, E. F., and Deyo, R. C. M. (1992)

Sperm motion characteristics and acrosome integrity before and after Sephadex filtration.

Proc 12th Int Congr Anim Reprod, 541-3

Topper, E. K., Killian, G. J., Way, A., Engel, B., and Woelders, H. (1999)

Influence of capacitation and fluids from the male and female genital tract on the zona binding ability of bull spermatozoa.

J Reprod Fertil **115**, 175-83

Toyoda, Y., and Chang, M. C. (1974)

Fertilization of rat eggs in vitro by epididymal spermatozoa and the development of eggs following transfer.

J Reprod Fertil **36**, 9-22

Trowbridge, I. S. (1974)

Isolation and chemical characterization of a mitogenic lectin from *Pisum sativum*.

J Biol Chem **249**, 6004-12

Tulsiani, D. R., Abou-Haila, A., Loeser, C. R., and Pereira, B. M. (1998)

The biological and functional significance of the sperm acrosome and acrosomal enzymes in mammalian fertilization.

Exp Cell Res **240**, 151-64

Urch, U. A., and Patel, H. (1991)

The interaction of boar sperm proacrosin with its natural substrate, the zona pellucida, and with polysulfated polysaccharides.

Development **111**, 1165-72

Visconti, P. E., Galantino-Homer, H., Moore, G. D., Bailey, J. L., Ning, X., Fornes, M., and Kopf, G. S. (1998)

The molecular basis of sperm capacitation.

J Androl **19**, 242-8

Visconti, P. E., Westbrook, V. A., Chertihin, O., Demarco, I., Sleight, S., and Diekman, A. B. (2002)

Novel signaling pathways involved in sperm acquisition of fertilizing capacity.

J Reprod Immunol **53**, 133-50

Waberski, D., Petrounkina, A., Weitze, K. F., und Töpfer-Petersen, E. (1999)

In-vitro-Beurteilung von Sperma zur Vorhersage der Fertilität.

Tierarztl Prax Ausg G Grosstiere Nutztiere **27**, 1-7

Wang, W., Hosoe, M., Li, R., and Shioya, Y. (1997)

Development of the competence of bovine oocytes to release cortical granules and block polyspermy after meiotic maturation.

Dev Growth Differ **39**, 607-15

Ward, C. R., and Storey, B. T. (1984)

Determination of the time course of capacitation in mouse spermatozoa using a chlortetracycline fluorescence assay.

Dev Biol **104**, 287-96

Ward, F., Enright, B., Rizos, D., Boland, M., and Lonergan, P. (2002)

Optimization of in vitro bovine embryo production: effect of duration of maturation, length of gamete co-incubation, sperm concentration and sire.

Theriogenology **57**, 2105-17

Ward, F., Rizos, D., Boland, M. P., and Lonergan, P. (2003)

Effect of reducing sperm concentration during IVF on the ability to distinguish between bulls of high and low field fertility: work in progress.

Theriogenology **59**, 1575-84

Ward, F., Rizos, D., Corridan, D., Quinn, K., Boland, M., and 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**, 47-55

Ware, C. B., Barnes, F. L., Maiki-Laurila, M., and First, N. L. (1989)

Age dependence of bovine oocyte activation.

Gamete Res **22**, 265-75

Watson, P. F. (1995)

Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function.

Reprod Fertil Dev **7**, 871-91

Watson, P. F., Plummer, J. M., and Jones, P. S. (1992)

The ionophore-induced acrosome reaction differs structurally from the spontaneous acrosome reaction.

J Exp Zool **264**, 231-5

Way, A. L., Griel, L. C., Jr., and Killian, G. J. (2000)

Effects of accessory sex gland fluid on viability, capacitation, and the acrosome reaction of cauda epididymal bull spermatozoa.

J Androl **21**, 213-9

Wegner, C. C., and Killian, G. J. (1992)

Origin of oestrus-associated glycoproteins in bovine oviductal fluid.

J Reprod Fertil **95**, 841-54

Wheeler, M. B., and Seidel, G. E., Jr. (1987)

Zona pellucida penetration assay for capacitation of bovine sperm.

Gamete Res **18**, 237-50

Wheeler, M. B., and Seidel, G. E., Jr. (1989)

Capacitation of bovine spermatozoa by lysophospholipids and trypsin.

Gamete Res **22**, 193-204

Whitfield, C. H., and Parkinson, T. J. (1992)

Relationship between fertility of bovine semen and in vitro induction of acrosome reactions by heparin.

Theriogenology **38**, 11-20

Whitfield, C. H., and Parkinson, T. J. (1995)

Assessment of the fertilizing potential of frozen bovine spermatozoa by in vitro induction of acrosome reactions with calcium ionophore (A23187).

Theriogenology **44**, 413-22

Wikland, M., Wik, O., Steen, Y., Qvist, K., Soderlund, B., and Janson, P. O. (1987)

A self-migration method for preparation of sperm for in-vitro fertilization.

Hum Reprod **2**, 191-5

Wood, P. D. P., Foulkes, J. A., Shaw, R. C., and Melrose, D. A. (1986)

Semen assessment, fertility and the selection of Hereford bulls for use in AI.

J Reprod Fertil **76**, 783-95

Yanagimachi, R. (1994)

Mammalian fertilization.

In E. Knobil, and J. D. Neill (Hrsg.): *The Physiology of Reproduction*

Raven Press, New York, Vol.1, 189-317

Yanagimachi, R., Lopata, A., Odom, C. B., Bronson, R. A., Mahi, C. A., and Nicolson, G. L. (1979)

Retention of biologic characteristics of zona pellucida in highly concentrated salt solution: the use of salt-stored eggs for assessing the fertilizing capacity of spermatozoa.

Fertil Steril **31**, 562-74

Yanagimachi, R., and Usui, N. (1974)

Calcium dependence of the acrosome reaction and activation of guinea pig spermatozoa.

Exp Cell Res **89**, 161-74

Yanagimachi, R., Yanagimachi, H., and Rogers, B. J. (1976)

The use of zona-free animal ova as a test-system for the assessment of the fertilizing capacity of human spermatozoa.

Biol Reprod **15**, 471-6

Yoshida, M., Cran, D. G., and Pursel, V. G. (1993)

Confocal and fluorescence microscopic study using lectins of the distribution of cortical granules during the maturation and fertilization of pig oocytes.

Mol Reprod Dev **36**, 462-8

Zhang, B. R., Larsson, B., Lundeheim, N., Haard, M. G., and Rodriguez-Martinez, H. (1999)

Prediction of bull fertility by combined in vitro assessments of frozen-thawed semen from young dairy bulls entering an AI-programme.

Int J Androl **22**, 253-60

Zhang, B. R., Larsson, B., Lundeheim, N., and Rodriguez-Martinez, H. (1997)

Relationship between embryo development in vitro and 56-day nonreturn rates of cows inseminated with frozen-thawed semen from dairy bulls.

Theriogenology **48**, 221-31

Zhang, B. R., Larsson, B., Lundeheim, N., and Rodriguez-Martinez, H. (1998)

Sperm characteristics and zona pellucida binding in relation to field fertility of frozen-thawed semen from dairy AI bulls.

Int J Androl **21**, 207-16

10 Danksagung

Herrn Prof. Dr. Dr. habil. J. Braun danke ich recht herzlich für die Überlassung des Themas und seine jederzeit gewährte freundliche Betreuung und Unterstützung bei der Durchführung und Korrektur dieser Arbeit.

Einen besonderen Dank an Herrn Prof. Dr. Dr. habil. R. Stolla, dem Vorstand der Klinik, für die Überlassung des Arbeitsplatzes im IVF-Labor.

Der BFZF danke ich für die finanzielle Unterstützung des Forschungsprojektes.

Bei Herrn Prof. Dr. Osterkorn und Herrn Stanglmeier möchte ich mich für die statistische Beratung bedanken.

Danken möchte ich auch Frau Dr. J. Reischl und Frau Dr. A. Haenisch-Woehl, die mich mit fachlichem Rat kompetent betreut haben, und den wechselnden Mitarbeiterinnen im Labor.

Danke auch meinen „Leidensgenossinnen“; die vorgemacht haben, daß es doch zu schaffen ist, Adriane, Annette, Ellen, Karola und Sabine, für ihre Freundschaft und die Aufmunterung in „dunklen Stunden“. Besonders lieben Dank an Julia und Benji, die sich in den letzten Tagen vor Abgabe ganz rührend um mich gekümmert und mir mit Schokolade und Kompetenz ausgeholfen haben.

Mein besonderer Dank gilt meinen Eltern, die mich so lange durchgefüttert haben und nie die Hoffnung aufgegeben haben, daß die Arbeit doch noch mal fertig wird, für ihre Liebe und Unterstützung, und meinen Großeltern für ihre so großzügig gewährten emotionalen und finanziellen Zuwendungen.

Und last but not least meinem Freund Karlheinz, der immer an mich geglaubt hat und jederzeit bereit war, den diversen Computern Benimm beizubringen. Ohne Dich hätte ich es nie geschafft.

11 Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Wera Stranek
Geburtsdatum: 26. Dezember 1974
Geburtsort: München
Familienstand: ledig
Eltern: Manfred Stranek, Technischer Betriebswirt
Christel Stranek, geb. Fichtner, Oberstudienrätin
Staatsangehörigkeit: deutsch

Schulischer Werdegang:

1981 - 1985 Besuch der Grundschule Neubiberg
1985 - 1994 Besuch des Gymnasiums Ottobrunn
1994 - 2000 Studium der Tiermedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität München
2001 - 2003 Anfertigung der Doktorarbeit an der Gynäkologischen und Ambulatorischen Tierklinik der Ludwig-Maximilians-Universität München