



JOHANNES GUTENBERG
UNIVERSITÄT MAINZ

**Entwicklung einer Kryokonservierungsmethode für
Spermien der Honigbiene, *Apis mellifera*.**

Dissertation

Zur Erlangung des Grades

Doktor der Naturwissenschaften

Am Fachbereich Biologie

Der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Tanja Ricarda May

Mainz, Juni 2015

Dekan: Aus Gründen des Datenschutzes gelöscht.

1. Berichterstatter: Aus Gründen des Datenschutzes gelöscht.

2. Berichterstatter: Aus Gründen des Datenschutzes gelöscht.

Tag der mündlichen Prüfung:16.10.2015

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	IX
Abbildungsverzeichnis	XV
Tabellenverzeichnis	XXI
1. Einleitung	1
1.1. Die Honigbiene	1
1.1.1. Das Honigbienenvolk.....	2
1.1.2. Embryogenese.....	5
1.1.3. Morphologie.....	5
1.1.3.1 Geschlechtsorgane.....	8
1.1.4. Spermienmorphologie	9
1.1.5. Spermatogenese in Drohnen von Apis mellifera	12
1.2. Bedeutung der Honigbiene	17
1.2.1. Krankheiten und Stressfaktoren	20
1.2.2. Ansätze zur Sicherung des Bienenbestandes.....	24
1.3. Kryokonservierung	26
1.3.1. Allgemeines zur Kryokonservierung.....	26
1.3.2. Kryoschäden.....	29
1.3.3. Methoden der Kryokonservierung.....	32
1.3.3.1 Slow Freezing	33
1.3.3.2 Vitrifikation	36
1.3.4. Kryoprotektiva- Cryoprotective agents (CPAs)	39
1.3.4.1 Nicht permeierende CPAs.....	39
1.3.4.2 Permeierende CPAs	42
1.3.4.2.1 Glycerin	44
1.3.4.2.2 Ethylenglykol (EG)	44
1.3.4.2.3 Dimethylacetamid (DMAA)	45
1.3.4.2.4 Dimethylsulfoxid (DMSO).....	45

1.4. Ziel der Arbeit	47
1.4.1. Meilenstein I: Entwicklung standardmäßig einsetzbarer Vitalitätstests	47
1.4.2. Meilenstein II: Entwicklung einer geeigneten Kryokonservierungsmethode	48
1.4.3. Meilenstein III: Optimierung der erstellten Kryokonservierungsmethode.....	49
2. Material und Methoden	51
2.1. Versuchsmaterial	51
2.1.1. Bienensperma	51
2.1.2. Ebersperma	51
2.2. Chemikalien und Geräte	52
2.2.1. Auflistung verwendeter Chemikalien.....	52
2.2.2. Puffer und Versuchslösungen	57
2.2.2.1 Spermaverdünner.....	57
2.2.2.2 Versuchspuffer/ Lösungen	62
2.2.3. Auflistung verwendeter Gerätschaften	69
2.2.4. Standard- Labormaterial/ Verbrauchsmaterial.....	71
2.3. Methodenentwicklung eines schnellen in vitro Spermivitalitätstests zur Validierung der Spermaqualität	72
2.3.1. Zellkonzentrationsbestimmung	73
2.3.1.1 Manuelle Quantifizierung am Mikroskop	74
2.3.1.2 Fluoreszenzmikroskopische Quantifizierung mittels Software supported Image Quantification (SSIQ)	74
2.3.1.3 Fluorimetrische Zellzahlbestimmung	75
2.3.2. Hypoosmotischer Schwelltest (HOS-Test)	76
2.3.3. Lebend-Tot-Färbung mittels Hoechst 33342 (H342) und Propidiumiodid (PI)	77
2.3.3.1 Bearbeitung erstellter Aufnahmen mittels Photoshop CS4	78
2.3.3.2 SSIQ-Auswertung mittels Image J	79
2.3.4. Vergleichende Aktivitätsmessung der Glukose-Phosphat-Isomerase (GPI)	81
2.3.5. Vergleichende Aktivitätsmessung der Isocitrat-Dehydrogenase (ICDH).	82

2.3.6. Motilitätsanalyse.....	84
2.3.6.1 Manuelle Bewegungsanalyse mittels Phasenkontrastmikroskopie .	85
2.3.6.2 Fluoreszenzmikroskopische Bewegungsanalyse mittels Langzeitbelichtungsbilder.....	85
2.3.6.3 Fluoreszenzmikroskopisches computergestütztes neues Verfahren – CASAnova –.....	86
2.3.7. Korrelationen der bisherigen Ergebnisse	86
2.3.8. DNA-Integritätstests.....	87
2.3.8.1 Acridinorange Test (AOT) und Sperm Chromatin Structure Assay (SCSA).....	88
2.3.8.2 Sperm Chromatin Dispersion Assay (SCD).....	90
2.3.8.3 Terminal deoxynucleotidyl transferase - mediated deoxy-uridine- triphosphate – Nick End Labeling (TUNEL)	91
2.3.9. Akrosomenintegritätstests.....	93
2.3.9.1 Fluoreszenzmarkierung mit an FITC gebundenen Agglutininen.....	93
2.3.9.2 Antikörpervermittelte Fluoreszenzmarkierung von Akrosin	95
2.3.9.3 Antikörpervermittelte Fluoreszenzmarkierung von Hexokinase	97
2.4. Vorversuche zum Einfluss versch. Faktoren auf die Spermivitalität....	101
2.4.1. Eignung versch. Kryogefäße	101
2.4.2. Toxizität von DMSO.....	102
2.4.2.1 Einfluss auf Motilität.....	102
2.4.2.2 Einfluss auf Membranintegrität.....	103
2.4.2.3 Einfluss auf DNA-Integrität	103
2.4.2.4 Einfluss nach Versammlung auf den Füllungsgrad der Sperma- theka.....	103
2.4.2.5 Zugabe von Trehalose zur Abschwächung des negativen Einflusses.....	104
2.4.3. Einfluss unterschiedlicher Probenvolumina.....	104
2.5. Vitrifikationsversuche	104
2.5.1. Versuche zur Abkühlung vor der Vitrifikation.....	104
2.5.2. Einsatz unterschiedlicher Kryoprotektiva	105

2.6.	<i>Entwicklung eines Slow Freezing-Protokolles</i>	106
2.6.1.	Einsatz unterschiedlicher Kryoprotektiva	106
2.6.2.	Ermittlung der optimalen Einfrier- und Auftaurate	108
2.6.3.	Besamungsversuch zur Überprüfung der erstellten Methode	109
2.6.4.	DMSO-Entfernung vor Versamung	110
2.6.4.1	<i>Dialyse zur schonenden DMSO-Entfernung; in vitro- Versuche</i>	110
2.6.4.1.1	Zeitlicher Reinigungsverlauf	112
2.6.4.1.2	Einfluss der Dialyse auf die Spermivitalität	112
2.6.4.2	<i>Zentrifugation zur schonenden DMSO-Entfernung</i>	113
2.6.4.3	<i>Besamungsversuche mit gereinigtem Bienensperma</i>	115
2.7.	<i>Eiskristallbildung während des Slow Freezing</i>	116
2.7.1.	Multiphotonen Laserscanning-Mikroskopie des Gefriervorganges	116
2.7.2.	Erfassung der Nukleationstemperatur und manuelles Seeding	116
2.8.	<i>DMSO-Zusatz mittels Dialyse zur Erhaltung der natürlichen Spermienbündelung und zum Schutz der extrazellulären Spermamatrix</i>	118
2.9.	<i>Abschließende vergleichende Untersuchungen zur Beurteilung des optimierten Kryoprotokolles</i>	120
3.	Ergebnisse	123
3.1.	<i>Entwicklung eines schnellen in vitro Vitalitätstests</i>	123
3.1.1.	Zellkonzentrationsbestimmung	123
3.1.2.	Hypoosmotischer (HOS)-Test	126
3.1.3.	Lebend-tot-Färbung mittels Hoechst 33342 (H342) und Propidiumiodid (PI) ...	127
3.1.4.	Vergleichende Aktivitätsmessung der Glukose-Phosphat-Isomerase (GPI)	133
3.1.5.	Vergleichende Aktivitätsmessung der Isocitrat-Dehydrogenase (ICDH-Test) ...	135
3.1.6.	Motilitätsanalyse	137
3.1.6.1	<i>Manuelle Auszählung z.T. mit Hilfe von Langzeitbelichtungs-</i> <i>aufnahmen</i>	137
3.1.6.2	<i>CASAnova</i>	138
3.1.7.	Vergleich der in vitro-Tests	139

3.1.8. DNA-Integritätstests.....	145
3.1.8.1 <i>Acridin Orange Test (AOT)</i>	145
3.1.8.2 <i>Sperm Chromatin Dispersion Assay (SCD)</i>	146
3.1.8.3 <i>Terminal deoxynucleotidyl transferase mediated deoxyUridine- triphosphate – Nick End Labeling (TUNEL)</i>	148
3.1.9. Akrosomenintegritätstests.....	150
3.1.9.1 <i>Fluoreszenzmarkierung mit PSA und PNA</i>	150
3.1.9.2 <i>Antikörpervermittelte Fluoreszenzmarkierung gegen Akrosin</i>	154
3.1.9.3 <i>Antikörpervermittelte Fluoreszenzmarkierung gegen Hexokinase</i>	155
3.2. Vorversuche zur Kryokonservierung - Einfluss verschiedener Faktoren auf die Spermiovitalität	165
3.2.1. Eignung verschiedener Kryogefäße.....	165
3.2.2. Toxizität von DMSO.....	168
3.2.2.1 <i>Einfluss von DMSO auf die Motilität</i>	169
3.2.2.2 <i>Einfluss von DMSO auf die Membranintegrität</i>	170
3.2.2.3 <i>Einfluss von 10% DMSO auf die DNA</i>	171
3.2.2.4 <i>Einfluss von DMSO auf den Füllungsgrad der Spermatheka</i>	172
3.2.3. Trehalose als zusätzliches Protektivum.....	173
3.2.4. Einfluss unterschiedlicher Probenvolumen.....	174
3.2.5. Einfluss der Osmolalität	175
3.3. Vitrifikationsversuche	176
3.3.1. Einsatz unterschiedlicher Kryoprotektiva	177
3.4. Entwicklung eines Slow Freezing-Protokolles	180
3.4.1. Einsatz unterschiedlicher Kryoprotektiva	180
3.4.2. Ermittlung der optimalen Einfrier- und Auftaurate (Koop. LIB).....	184
3.4.3. Besamungsversuch zur Überprüfung der erstellten Methode	185
3.4.4. DMSO-Entfernung vor Versamung.....	187
3.4.4.1 <i>Dialyse zur schonenden DMSO-Entfernung; in vitro- Versuche</i>	187
3.4.4.2 <i>Zentrifugation zur schonenden DMSO-Entfernung (LIB)</i>	192

3.4.4.3	<i>Besamungsversuche mit gereinigtem Bienensperma</i>	193
3.5.	<i>Eiskristallbildung während des Slow Freezing</i>	195
3.5.1.	Multiphotonen Laserscanning-Mikroskopie des Gefriervorganges.....	195
3.5.2.	Nukleationstemperatur und manuelles Seeding.	197
3.6.	<i>DMSO-Zusatz mittels Dialyse zur Erhaltung der natürlichen Spermienbündel</i>	198
3.7.	<i>Abschließende vergleichende Untersuchungen zur Beurteilung der erstellten Kryoprotokolle (z.T.LIB)</i>	202
4.	Diskussion	207
4.1.	<i>Entwicklung und Validierung aussagekräftiger in vitro-Qualitätstests</i>	208
4.2.	<i>Vorversuche zur Kryokonservierung - Einfluss verschiedener Faktoren auf die Spermiovitalität</i>	218
4.3.	<i>Entwicklung eines geeigneten Kryokonservierungsprotokolls</i>	222
4.4.	<i>Prüfung auf DNA-Schäden an Bienenspermien nach Kryokonservierung</i>	233
	Zusammenfassung	235
	Summary	237
	Literaturverzeichnis	239
	Publikationen und Patente	271
	Danksagung	273
	Curriculum Vitae	275

Abkürzungsverzeichnis

%	-	Prozent
Abb.	-	Abbildung
ABPV	-	Akute Bienen Paralyse Virus
AF	-	Alexa Fluor
AI	-	Artificial Insemination
ALARM	-	Assessing Large scale Risks for biodiversity with tested Methods
äM	-	äußerer Mikrotubulus
AOT	-	Acridin-Orange-test
BeeDoc	-	Bees in Europe and the Decline of Honey Bee Colonies
BMEL	-	Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft
BMELV -	-	Bundesministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz
BSA	-	Bovine Serum Albumin
Bsp.	-	Beispiel
BSS	-	Bee Semen Solution
BTS	-	Beltsville Thawing Solution
bzw.	-	beziehungsweise
°C	-	Grad Celsius
ca.	-	zirka
CASA	-	Computer Assisted Sperm Analysis
CCD	-	Colony Collapse Disorder
cm	-	Zentimeter
CPA	-	Cryoprotective Agent
Da	-	Dyneinarm
DAPI	-	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DCI	-	Direct Chilling Injury
dd	-	doppelt destilliert
dest.	-	destilliert
d.h.	-	das heisst

DMAA	-	Dimethylacetamid
DMSO	-	Dimethylsulfoxid
DNA _{ss/ds}	-	Desoxyribonukleinsäure (Einzelsträngig/Doppelstrang)
DTT	-	Dithiothreitol
DWV	-	Deformed Wing Virus
EDTA	-	Ethylendiamintetracetat
EFSA	-	European Food Safety Authority
EG	-	Ethylenglykol
em.	-	Emission
Eppi	-	Eppendorf- Reaktionsgefäß
et al.	-	et alii/aliae (lateinisch für: und andere)
EU	-	Europäische Union
exc.	-	Excitation
FABRE-TP	-	Farm Animal Breeding and Reproduction Technology Platform
FITC	-	Fluoresceinisothiocyanat
FLI	-	Friedrich-Löffler-Institut
Fz	-	Follikelzelle
g	-	Gramm
xg	-	Beschleunigung beim Zentrifugieren angegeben als Vielfaches der Erdbeschleunigung
G6PDH	-	Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase
ggf.	-	gegebenenfalls
GPI	-	Glucosephosphat-Isomerase
h	-	Stunde
H ₂ O	-	Wasser
H342	-	Hoechst 33342
HCl	-	Salzsäure
HEPES	-	4-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-1-ethansulfonsäure
HK	-	Hexokinase
IAPV	-	israelischer akuter Paralysevirus

X

ICDH	-	Isocitrat-Dehydrogenase
IgG	-	Immunglobulin G
itm	-	intertubuläres Material
IVF	-	<i>in vitro</i> Fertilisation
KBV	-	Kashmir Bienen Virus
KCl	-	Kaliumchlorid
Kg	-	Kilogramm
KHCO ₃	-	Kaliumhydrogencarbonat
KH ₂ PO ₄	-	Kaliumdihydrogenphosphat
KOH	-	Kaliumhydroxid
Konz.	-	Konzentration
l	-	Liter
LDL	-	Low-Density-Lipoproteine
LIB	-	Länderinstitut für Bienenkunde
μ	-	mikro
m	-	Meter
m	-	milli
M	-	molar (Mol/l)
max.	-	maximal
Md	-	Mikrotubuliduplett
min	-	Minute
min.	-	mindestens
Mio	-	Million
ms	-	Millisekunden
MW	-	Molecular Weight
MWCO	-	Molecular Weight Cut-Off
n	-	nano
n	-	Datenumfang
N _{2L}	-	flüssiger Stickstoff
NaCl	-	Natriumchlorid

NADP ⁺	-	Nicotinamid Adenin-Dinukleotidphosphat
NADPH+H ⁺	-	oxidierte Form des Nicotinamid Adenin-Dinukleotidphosphats
NaHCO ₃	-	Natriumhydrogencarbonat
NaH ₂ PO ₄	-	Natriumdihydrogenphosphat
NaOH	-	Natriumhydroxid
NDB	-	Neue Deutsche Biographie
p	-	Signifikanz
PBS	-	Phosphate Buffered Saline
PD	-	1,3-Propandiol
PE	-	Polyethylen
PEG	-	Polyethylenglycol
PFA	-	Paraformaldehyd
PI	-	Propidiumiodid
PNA	-	Lectin von Arachis hypogaea
PSA	-	Lectin von Pisum sativum
PSD	-	Photoshop-Datei
PVP	-	Polyvinylpyrrolidon
r	-	Korrelationskoeffizient
R ²	-	Bestimmtheitsmaß
ROS	-	Reactive Oxygen Species
rS	-	radiale Speicher
S.	-	Seite
SCD	-	Sperm Chromatin Dispersion Assay
SCSA	-	Sperm Chromatin Structure assay
sek.	-	Sekunde
SBV	-	Sackbrut Virus
SDS	-	Natriumdodecylsulfat
sog.	-	sogenannte/sogennanter
Spg1	-	Kegelförmige Spermatogonien
Spg2	-	mitotisch aktive Spermatogonien

SSIQ	-	Software Supported Image Quantification
Step	-	Status and Trends of European Pollinators
Tab.	-	Tabelle
tDT	-	Terminale Deoxynucleotidyl-Transferase
TRA	-	Triethanolamin
TRIS	-	(2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propanediol)
TUNEL	-	Terminal Deoxynucleotidyltransferase - mediated Deoxyuridine-triphosphate – Nick End Labeling
U	-	Unit
UNEP	-	United Nations Environment Programme
USA	-	United States of America
UTP	-	Uridintriphosphat
UV	-	Ultraviolett
Verd.	-	Verdünnung
VF	-	Verdünnungsfaktor
vgl.	-	vergleiche
WHO	-	World Health Organisation
z.B.	-	zum Beispiel
z.T.	-	zum Teil

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Verbreitung der bisher bekannten Bienenarten der Gattung Apis.	1
Abb.2: Die drei Bienenwespen.	4
Abb.3: Kopfform der drei Bienenwespen.	6
Abb.4: Akrosomaler Kopfbereich (A) und Übergang von Akrosom und Nukleus (B) eines Bienenspermiums.	10
Abb.5: Schematische Darstellung eines Axonemquerschnittes.	11
Abb.6: Hodenschlauch einer Drohnenlarve im Querschnitt.	14
Abb.7: Ertragssteigerung verschiedener Obst- und Getreidearten durch Bienenbestä- bung.	18
Abb.8: Schematische Darstellung der Vorgänge, die abhängig von der Abkühlrate während des Einfrierens mit einer Zelle geschehen können.	35
Abb.9: Graphische Darstellung des Zusammenhangs zwischen Abkühlgeschwindigkeit und Stärke der Zellschäden durch Lösungseffekte und Eisbildung.	35
Abb.10: Strukturformeln von Propidiumiodid (PI) und Hoechst 33342 (H342).	77
Abb.11: Automatisierte Quantifizierung von Spermien mittels Image J.	80
Abb.12: Schematische Darstellung der während des GPI-Tests stattfindenden Reaktionen.	81
Abb.13: Schematische Darstellung der während des ICDH-Tests stattfindenden Reaktionen.	83
Abb.14: Bewegungsanalyse mittels CASA.	84
Abb.15: Parameter der CASA-Analyse.	84
Abb.16: Formel zur Berechnung des Korrelationskoeffizienten r , der das Maß der linearen Abhängigkeit zweier Merkmale angibt.	87
Abb.17: Strukturformel des Farbstoffes Acridinorange.	88
Abb.18: Durch Methylenblau angefärbte Humanspermien, an denen ein SCD-Test durchgeführt wurde.	90
Abb.19: Versuchsanlage, bestehend aus Kleinstvölkern mit ca. 100 Arbeiterinnen pro Volk.	103
Abb.20: Temperaturverlauf während der Slow Freezing - Versuche.	107

Abb.21: Schema zur theoretischen Probenbehandlung nach Auftauen zur DMSO-Entfernung mittels Dialyse.....	111
Abb.22: Mikrodialysierkammer	111
Abb.23: Zentrifugation von Bienenspermaproben in zugeschweißten Pipettenspitzen (A) und anschließende Öffnung dieser Kunststoffspitzen (B).....	114
Abb.24: Temperaturmessung innerhalb eines Probenschlauches während des Abkühl- und Gefriervorganges.	117
Abb.25: Phasenkontrast- und Fluoreszenzaufnahmen von Bienenspermien in einer Neubauer-Zählkammer.....	123
Abb. 26: Fluoreszenzwerte H342-markierter unbehandelter (A) und zuvor gefrorener (B) Bienenspermasuspensionen mit verschiedenen Spermienkonzentrationen, dargestellt in Streudiagrammen mit entsprechender Trendlinie.	125
Abb. 27: Kalibriergeraden zu den Fluoreszenzen H342-markierter Bienenspermaproben..	125
Abb. 28: Phasenkontrastaufnahmen von Bienenspermien verdünnt in BSS (A) und in H ₂ O _{dest.} (B-D).	127
Abb. 29A: Durch H342 und PI markierte Bienenspermien.	128
Abb. 29B: Einfluss der PI-Konzentration auf die H342-Markierung.	128
Abb. 30: Durch H342 und PI markierte Bienenspermien.	129
Abb. 31: PI Markierung von Bienenspermien mit verschiedenen Zellformen.	129
Abb. 32: Durch H342 und PI markierte Bienenspermien in hypoosmotischem Medium. ..	130
Abb. 33: Prozentuale Anteile PI-markierter Bienenspermien in unterschiedlich alten (A) bzw. eingefrorenen (B) Spermaproben.....	131
Abb. 34: Prozentuale Anteile PI-markierter Bienenspermien in eingefrorenen und wieder aufgetauten Spermaproben mit unterschiedlichen DMSO-Konzentrationen.....	133
Abb. 35: Glucose-Phosphat-Isomerase-Aktivitäten (GPI) einer Bienenspermienprobe vor und nach Ultraschallbehandlung.	134
Abb. 36: Relative Glucose-Phosphat-Isomerase-Aktivitäten (GPI) von eingefrorenen und wieder aufgetauten Bienenspermienproben mit unterschiedlichen DMSO-Konzentrationen.	134
Abb. 37: Isocitrat-Dehydrogenase-Aktivitäten (ICDH) einer Bienenspermienprobe vor und nach Ultraschallbehandlung.	135

Abb.38: Relative Isocitrat-Dehydrogenase-Aktivitäten (ICDH) von eingefrorenen und wieder aufgetauten Bienenspermienproben mit unterschiedlichen DMSO-Konzentrationen.....	136
Abb. 39: Fluoreszenzaufnahmen, aufgenommen mit langer Integrationszeit, von H342-markierten Eberspermien (A) und Bienenspermien (B).	137
Abb.40: Bewegungsanalyse einer Bienenspermienprobe mittels CASAnova.	139
Abb. 41: Vergleich der in vitro Tests	140
Abb. 42: Ergebnisse verschiedener Vitalitätsanalysen des Hauptversuches.....	141
Abb. 43: Ergebnisse der PI/H342-Markierungen, aufgetragen gegen Daten der GPI-Messungen (A), Bewegungsanalysen (B) und ICDH-Messungen (C).....	142
Abb. 44: Ergebnisse aller PI/H342-Markierungen (A), GPI-Messungen (B), ICDH-Messungen (C) und Bewegungsanalysen (D) des Hauptversuches, aufgetragen gegen die DMSO-Konzentration der jeweiligen Probe.	144
Abb. 45: Mit Acridinorange gefärbte humane Spermien.	145
Abb. 46: SCD-Test an Eberspermien, durch H342 angefärbt.....	146
Abb.47: SCD-Test an Bienenspermien, durch H342 angefärbt.....	147
Abb. 48: TUNEL-Test an Bienenspermien, zusätzlich mit H342 markiert.	148
Abb. 49: Markierung von unbehandelten Eber- und Bienenspermien durch die FITC-gekoppelten Lektine PNA und PSA in Suspension.	150
Abb. 50: Markierung von permeabilisierten Eber- und Bienenspermien durch PNA-FITC, PI und z. T. H342 in Suspension.	152
Abb. 51: Markierung von gefrorenen Eber- und Bienenspermien durch PNA-FITC oder PSA-FITC, PI und z. T. H342 in Suspension.	153
Abb. 52: Anfärbung von Eber- und Bienenspermienausstrichen durch PNA-FITC.	153
Abb. 53: Indirekte antikörpervermittelte Fluoreszenzmarkierung von Akrosin an Eber- und Bienenspermienausstrichen.	154
Abb. 54: Antikörpervermittelte Fluoreszenzmarkierung (Anti-HK/AF488) von Hexokinase an Bienenspermienausstrichen.	156
Abb. 55: Antikörpervermittelte Fluoreszenzmarkierung (Anti-HK/AF488) von Hexokinase in Bienenspermien suspensionen.	157
Abb. 56: Fluoreszenzmarkierung (Anti-HK/AF546) in Bienenspermien suspensionen.	159

Abb.57: Fluoreszenzmarkierung (Anti-HK/AF546) an Bienenspermiensuspensionen.	160
Abb. 58: Fluoreszenzmarkierung mit anti-HK/AF546 an Eberspermiensuspension.....	161
Abb. 59: Muster der Fluoreszenzmarkierungen an Eberspermien mit Anti-HK/AF546	162
Abb. 60: Quantitative Auswertung verschiedener durch Anti-HK/AF546 hervorgerufene Markierungsmuster in 1 Tag bei 17°C gelagerten Eberspermiensuspensionen.....	163
Abb. 61: Quantitative Auswertung verschiedener durch Anti-HK/AF546 hervorgerufene Markierungsmuster in 3 Tage bei 17°C gelagerten Eberspermiensuspensionen...	163
Abb. 62: Quantitative Auswertung verschiedener durch Anti-HK/AF546 hervorgerufene Markierungsmuster in 5 Tage bei 17°C gelagerten Eberspermiensuspensionen...	164
Abb. 63: Membranintegrität (GPI-Test) von Bienenspermien nach schrittweiser Abkühlung und Einfrierung in verschiedenen Kapillaren.....	166
Abb. 64: Membranintegrität (GPI-Test) von Bienenspermien nach schrittweiser Abkühl- ung und Einfrierung in Kapillaren und Teflonschläuchen.....	167
Abb. 65: Mit langer Integrationszeit aufgenommene Fluoreszenzaufnahmen von H342- markierten Bienenspermien mit einer DMSO-Konzentration von 0% (A), 10% (B). und 30% (v/v).	169
Abb. 66: Membranintegrität (GPI-Test) von Bienenspermien nach 5, bzw. 30 minütiger Inkubation mit unterschiedlichen DMSO-Gehalten.....	171
Abb. 67: DNA-Integrität in DMSO-freien und –haltigen Bienenspermienproben.....	172
Abb. 68: Effekt der Beimischung DMSO auf den Füllungsgrad der Spermatheka zur Beurteilung der Toxizität.....	172
Abb. 69: Membranintegrität (GPI-Test) von Bienenspermien nach langsamer Abkühl- ung auf 5°C mit verschiedenen Trehalose- und DMSO-Zusätzen.....	173
Abb. 70: Membranintegrität (GPI-Test) von Bienenspermien nach langsamer Abkühl- ung auf 5°C in verschiedenen Probenvolumina und mit unterschiedlichen Trehalosekonzentrationen.....	174
Abb. 71: Membranintegrität (GPI-Test) von Bienenspermien vor und nach langsamer Abkühlung sowie nach 3h Inkubation bei konstant 5°C.	175
Abb. 72: Änderung der Membranintegrität (GPI-Test) von Bienenspermien während langsamer Abkühlung und anschließender Inkubation mit 30% (v/v) DMSO.	176
Abb. 73: Effekt der Beimischung von Ethylenglykol und/oder DMSO auf den Füllungs- grad der Spermatheka zur Beurteilung der Giftigkeit des wichtigsten Kryopro- tektivums DMSO.	178

Abb. 74: Motilität von in BSS+ oder Harbo-Puffer verdünnten Bienenspermien nach unterschiedlich schneller Abkühlung auf -30°C und anschließendem Auftauen....	184
Abb. 75: Motilität von Bienenspermien nach Abkühlung auf -30°C und anschließendem Auftauen mit unterschiedlichen Verfahren.	185
Abb. 76: Spermienanzahl in den Spermatheken mit kryokonserviertem Sperma besamter Königinnen.	186
Abb. 77: Anteil motiler Spermien in den Spermatheken bzw. weiblicher Brut nach Versamung kryokonservierter und unbehandelter Bienenspermien.	187
Abb. 78: Kalibriergeraden zur Ermittlung von DMSO-Konzentrationen.....	188
Abb. 79: DMSO-Entfernung mittels Dialyse in Mikrokammern.....	189
Abb. 80: Membranintegrität von Bienenspermienproben vor und nach 30 minütiger Dialyse.	190
Abb. 81: Einfluss der Dialysedauer auf den Spermienzustand.	191
Abb. 82: Membranintegrität von Bienenspermien nach Dialyse mit verschiedenen Zusätzen	191
Abb. 83: Membranintegrität und Motilität von Bienenspermien nach Zentrifugation mit unterschiedlicher Geschwindigkeit.....	192
Abb. 84: Spermienanzahl in den Spermatheken von Königinnen, die mit unbehandeltem und zentrifugiertem Sperma besamt wurden.	193
Abb. 85: Anteil weiblicher Brut nach Besamung mit unterschiedlich behandelten Spermproben.	194
Abb. 86: Mit einem Multiphotonen Laserscanning-Mikroskop erstellte Fluoreszenzaufnahmen einer Bienenspermprobe während des Einfrierprozesses.	196
Abb. 87: Mit einem Multiphotonen Laserscanning-Mikroskop erstellte Fluoreszenzaufnahmen einer Bienenspermprobe bei -9°C.	196
Abb. 88: Ermittlung der Nukleationstemperatur mittels kontinuierlicher Temperaturerfassung innerhalb der Suspension.....	198
Abb. 89: Randbereich eines Bienenspermienbündels.....	199
Abb. 90: Anzahl (A) und Motilität (B) von kryokonservierten Spermien in Spermatheken von künstlich besamten Königinnen sowie der resultierende Anteil weiblicher Brut (C)	201

Abb. 91: Anzahl (A), Motilität und Membranintegrität (B) von frischen und kryokonservierten Spermien in Spermatheken von künstlich besamten Königinnen sowie der resultierende Anteil weiblicher Brut (C).....	203
Abb. 92: Prozentualer Anteil DNA-geschädigter Spermien nach Kryokonservierung.....	204
Abb. 93: Excitations- und Emissionsspektren der Farbstoffe H342 und PI.....	212

Tabellenverzeichnis

Tab.1: Auflistung verwendeter Chemikalien, mit Bezugsfirma und Katalognr.....	52
Tab.2: Zusammensetzung des BSS.....	57
Tab.3: Zusammensetzung des BSS 450mOsmol/Kg T60.....	58
Tab.4: Zusammensetzung des BSS+.....	58
Tab.5: Zusammensetzung des BSS oT.....	58
Tab.6: Zusammensetzung des BSS oT mit 20% DMSO.....	59
Tab.7: Zusammensetzung des Kiev-Puffers (320mOsmol/kg; pH 8,3).	59
Tab.8: Zusammensetzung des Harbo Puffers.	60
Tab.9: Zusammensetzung der künstlichen Hämolymphe.....	60
Tab.10: Zusammensetzung der künstlichen Spermatheka-Flüssigkeit.....	61
Tab.11: Zusammensetzung des K+ Puffers.	61
Tab.12: Zusammensetzung der Lösungen und Puffer für den GPI-Test.	63
Tab.13: Zusammensetzung der Lösungen und Puffer für den ICDH-Test.....	63
Tab.14: Zusammensetzung benötigter Lösungen und Puffer für den TUNEL-Test.	64
Tab.15: Zusammensetzung benötigter Lösungen und Puffer für den SCD-Test.....	65
Tab.16: Zusammensetzung benötigter Lösungen und Puffer für den AOT.	66
Tab.17: Zusammensetzung benötigter Lösungen und Puffer für eine antikörper- vermittelte Fluoreszenzmarkierung.....	67
Tab.18: Zusammensetzung benötigter Puffer für die durchgeführten Zentri- fugations-Experimente.....	68
Tab.19: Auflistung verwendeter Geräte, mit Bezugsfirma und Bezeichnung.....	69
Tab.20: Auflistung verwendeter Materialien, mit Bezugsfirma und Bezeichnung.	71

Tab.21: Zusammensetzung und Durchführung des GPI-Tests.....	82
Tab.22: Zusammensetzung des ICDH-Tests.....	83
Tab.23 : Beschreibung der verschiedenen Behandlungsverfahren.....	119
Tab. 24: Beschreibung der verschiedenen Kryokonservierungsmethoden.....	120
Tab. 25: Ergebnisse der vergleichenden Spermienquantifizierung mittels manueller und PC-gestützter Verfahren.	124
Tab. 26: Rangkorrelationskoeffizienten (Spearman) und Signifikanzwerte der <i>in vitro</i> - Tests mit dem Füllungsgrad der Spermatheka (Wegener et al., 2012).	144
Tab. 27: Ergebnisse der TUNEL-Tests 15 verschiedener Bienenspermien-Proben	149
Tab. 28: Zählung der durch Anti-HK/AF488, H342 und PI markierten Spermien in Suspension.	158
Tab. 29: Anteil motiler und immotiler Bienenspermien in Proben mit unterschiedlichen DMSO-Konzentrationen.....	170
Tab. 30: Zusammenfassung umfangreicher Abkühlungs- und Vitrifikationsversuche mit unterschiedlichen Kryoprotektiva.	179
Tab. 31: Prozentualer Anteil der Membranintegrität von Bienenspermien in verschie- denen Kryolösungen vor und nach Slow Freezing	180
Tab. 32: Membranintegrität von Bienenspermien vor und nach Slow Freezing in verschiedenen Kryolösungen und 7-tägiger Lagerung bei -20°C.....	182
Tab. 33: Membranintegrität von Bienenspermien vor und nach Slow Freezing in verschiedenen Kryolösungen.....	183

1. Einleitung

1.1. Die Honigbiene

Die westliche Honigbiene *Apis mellifera* umfasst 25 Unterarten oder Rassen und zählt zur Ordnung der *Hymenoptera*, der Hautflügler. Sie wird in die Gattung der Honigbienen (*Apis*) eingeordnet, welche bislang aus 10 (Le Conte und Najavas, 2008) bekannten Arten, von denen 9 nur in Asien beheimatet sind, besteht (siehe Abbildung Abb. 1). Die westliche oder europäische Honigbiene *Apis mellifera* war ursprünglich in Afrika, Europa bis in den Ural und Vorderasien bis Persien heimisch (Pechhacker; 2003), ist nun aber aufgrund der Verbreitung durch den Menschen fast auf der ganzen Welt zu finden (van Engelsdorp und Meixner, 2010). Da Honig früher die einzige süßende Substanz war und die europäische Honigbiene im Vergleich zu den asiatischen Arten viel Honig produziert, wurden vor allem Bienenstöcke mit *Apis mellifera* von den Menschen gehalten und bei Kolonialisierungsreisen mitgenommen. So fand eine starke Verbreitung der europäischen Honigbiene und ihrer Unterarten in unterschiedlichste Lebensräume statt (LeConte und Najavas, 2008).

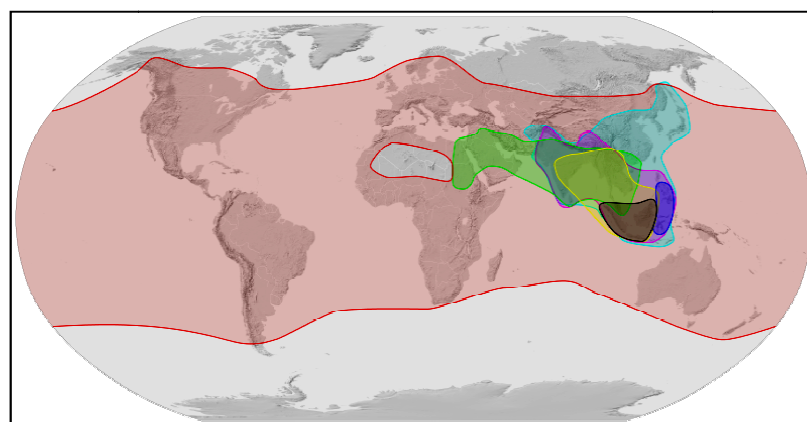


Abb. 1: Verbreitung der bisher bekannten Bienenarten der Gattung Apis. Gezeigt werden die Verbreitungsgebiete der verschiedenen *Apis*-Arten. Die farbliche Unterscheidung dient einer besseren Differenzierung der Verteilungsmuster.

Bezeichnung der Spezies	Farbe in Abb.	Bezeichnung der Spezies	Farbe in Abb.
<i>Apis mellifera</i>	Red	<i>Apis florea</i>	Green
<i>Apis cerana</i>	Cyan	<i>Apis dorsata</i>	Magenta
<i>Apis andreniformis</i>	Yellow	<i>Apis nigrocincta</i>	Blue
<i>Apis koschevnikovi</i>	Black		

Quelle: http://de.wikipedia.org/wiki/Honigbienen#mediaviewer/File:Apis_distribution_map.svg

Die Verbreitung der verschiedenen *Apis mellifera* Rassen wird von De La Rúa et al. (2009) detaillierter betrachtet, soll an dieser Stelle allerdings nicht weiter ausgeführt werden. Die Honigbiene ist ein staatenbildendes Insekt, das alle Bedingungen der Eusozialität erfüllt. So leben im Bienenstaat fruchtbare und unfruchtbare Tiere verschiedener Generationen zusammen, außerdem findet eine gemeinschaftliche Brutpflege, gemeinsame Nahrungssuche und –aufteilung statt. Das harmonische stark strukturierte Zusammenleben im Bienenstaat wird durch die ständige Pheromonabgabe der Königin gewährleistet (Skript Uni Hohenheim). Diese chemischen Botenstoffe werden im ganzen Stock verteilt und stärken so den Zusammenhalt des Volkes. Das organisierte Zusammenleben der Honigbiene ist so stark ausgeprägt, dass schon im 19. Jahrhundert das Bienenvolk mit einem einzigen Lebewesen bzw. Wirbeltier verglichen wurde. Der Imker und Schreinermeister Johannes Mehring (1815-1878) bezeichnete in seinem Buch *„Das neue Einwesensystem als Grundlage zur Bienenzucht oder Wie der rationelle Imker den höchsten Ertrag von seinen Bienen erzielt. Auf Selbsterfahrungen gegründet“* von 1869 das Bienenvolk als Einzelwesen oder Bien (Kaiser, 1990). Jürgen Tautz geht in seinem Werk *„Phänomen Honigbiene“* sogar einen Schritt weiter und vergleicht die Eigenschaften des Honigbienenvolkes mit denen eines Säugetieres (Tautz, 2007), wobei erstaunliche Ähnlichkeiten hervortreten.

1.1.1. Das Honigbienenvolk

Ein Honigbienenvolk besteht aus einer fruchtbaren Königin, bis zu 50.000 sterilen Arbeiterinnen und von Mai-Juli aus weiteren 500-1000 haploiden männlichen Tieren, den sogenannten Drohnen (siehe Abb. 2) (Wright, 1913; Skript Uni Hohenheim; <https://www2.hu-berlin.de/bienenkunde/index.php?id=110>). Die drei verschiedenen Bienenwesen unterscheiden sich in ihrer Morphologie, wie schon aus Abb. 2 hervorgeht, und besitzen im Bienenstaat verschiedene Aufgaben (Harrison, 1903; Hrassnigg und Crailsheim, 2005;). Die Königin, auch Weisel genannt, besitzt einen schlanken Körperbau, sie ist etwas größer als die Arbeiterinnen und ihr Abdomen überragt die Flügel deutlich. Sie paart sich ca. eine Woche nach Schlupf während mehrerer sogenannter Hochzeitsflüge mit 10-20 Drohnen (Tautz, 2007). Die Paarung geschieht dabei während des Fluges in der Luft. Sie paart sich danach nie mehr, sondern greift bis zum Ende ihres Lebens (2-5 Jahre) zur Befruchtung ihrer Eier auf gespeichertes Drohnensperma zurück, welches sie in ihrer ca. 1,5mm großen Samenblase (Spermatheka) aufbewahrt. Im Sommer legt die Weisel 1000-2000 Eier pro Tag, wobei aus befruchteten Eiern Arbeiterinnen und wenige Jungköniginnen und aus unbefruchteten Eiern haploide Drohnen entstehen. Eine weitere Aufgabe der

Königin ist es das Bienenvolk zusammenzuhalten. Zu diesem Zweck produziert die Königin spezielle Pheromone, insbesondere 9-Oxo-trans-Decensäure, die auch als Königinnensubstanz bezeichnet wird. Die aus den Mandibeldrüsen abgesonderten Substanzen verhindern die Fruchtbarkeit der Arbeiterinnen und steigern gleichzeitig deren Arbeitsbereitschaft (Wright, 2009), außerdem wirken sie auch als Sexuallockstoffe auf die Drohnen beim Hochzeitstanz (Keeling et al., 2003). Bei der Pflege der Königin werden die Pheromone auf die Arbeiterinnen übertragen, die sie dann anschließend im ganzen Volk verteilen.

Alle übrigen Arbeiten, wie Nahrungsbeschaffung, Nestbau und -erhaltung, Brutpflege, Verteidigung und die Pflege der Königin werden von den Arbeiterinnen verrichtet. Sie sind deutlich kleiner als die Weisel und besitzen zurückgebildete Geschlechtsorgane, weshalb sie steril sind. Die unterschiedlichen Aufgaben im Bienenstock werden altersabhängig von verschiedenen Arbeiterinnen erledigt. Diese Arbeitsteilung geht mit der zeitlich unterschiedlichen Entwicklung der Bienendrüsen einher. Zuerst hilft eine Jungbiene beim Säubern des Nestes, dann füttert sie als sogenannte Ammenbiene aus fertig entwickelten Futtersaftdrüsen die Brut. Mit Aktivierung der Wachsdrüsen widmet sich die Biene zunehmend dem Bau und der Reparatur der Waben und kann infolgedessen als Bauarbeiterin bezeichnet werden. Nach der dritten Lebenswoche bilden sich für gewöhnlich die Wachsdrüsen zurück und die Futtersaftdrüsen beginnen Enzyme zur Honigproduktion zu bilden. Die Biene überwacht zu Beginn dieses Lebensabschnittes das Einflugloch und unternimmt zunehmend Orientierungsflüge, dann fliegt sie bis zum Ende ihres Lebens aus dem Stock und sammelt Pollen und Nektar für ihr Volk. Mit Hilfe von Rund- und Schwänzeltänzen (Tautz, 2007) kann sie ihren Artgenossinnen von gefundenen Nahrungsquellen berichten und ihnen Richtung, Entfernung und Qualität der Nahrung übermitteln. Obwohl die Abfolge der Tätigkeiten bei allen Bienen ähnlich ist, variiert die Dauer der verschiedenen Arbeiten für einzelne Bienen erheblich. Diese Varianz ermöglicht es einem Bienenvolk auf bestimmte Einflüsse zu reagieren und sich anzupassen (Robinson, 1992; Huang und Robinson, 1996; Seeley, 1997; Robinson und Huang, 1998).

Eine Anpassung an die jahreszeitlich erzeugten wechselnden Lebensbedingungen ist die Ausbildung von Sommer- und Winterbienen. Sommerbienen leben zwischen 15 und 48 Tage, werden zur warmen Jahreszeit produziert und verrichten die oben beschriebenen Arbeiten. Im Frühjahr und Sommer erreicht ein Bienenvolk zahlenmäßig mit bis zu 50.000 Tieren sein Maximum, zu dieser Zeit werden auch Jungköniginnen und die Drohnen gebildet, und das Volk sammelt die Nahrungsvorräte für den folgenden Winter. Im

Spätsommer und Herbst verringert sich die Volksgröße und es werden zunehmend Winterbienen erzeugt. Diese können 170-243 Tage alt werden (Fluri, 1994; Imdorf et al, 2009; Fluri, 2012) und sorgen für die Königin und die erste Brut während des Winters bzw. Frühjahrs. Vor dem Winter schonen sie sich, fliegen nicht raus oder kümmern sich um die Brut. Während des Winters sorgen sie vor allem für die äußerst wichtige Temperaturregulation im Bienenstock. Durch Bildung der sogenannten Wintertraube halten die Arbeiterinnen sich und die Königin während der kalten Jahreszeit warm. Zu dieser Zeit erreicht das Bienenvolk mit max. 20.000 Tieren seine minimale Größe. Erhöht sich die Außentemperatur und werden die Tage länger, so beginnt die Königin mit der Eiablage, und die Winterbienen verrichten alle notwendigen Arbeiten unabhängig vom Alter.

Obwohl Sommer- und Winterbienen äußerlich gleich aussehen, gibt es doch einige gravierende Unterschiede, die die jeweilige Gruppe für ihre Aufgaben optimiert. So besitzen Winterbienen einen stark ausgeprägten Fettkörper und eine hohe Konzentration des Speicherproteins Vitellogenin in ihrer Hämolymphe (Amdam und Omholt, 2002). Manche Forscher gehen davon aus, dass die extreme Langlebigkeit der Winterbienen in der erhöhten Vitellogeninkonzentration begründet liegt (Amdam und Omholt, 2002; Münch und Amdam, 2010).

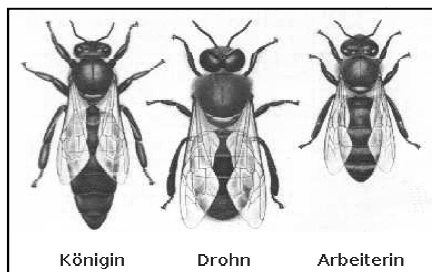


Abb.2: Die drei Bienenwesensarten.

Graphische Darstellung der drei Bienenwesensarten, Königin, Drohn und Arbeiterin.

Quelle: <http://www.imkerverein-reutlingen.de/index.php/bienen>

Zur Hochsaison des Bienenvolkes legt die Königin auch unbefruchtete Eier, die sich zu Drohnen entwickeln. Diese haploiden Bienenwesensarten unterscheiden sich morphologisch stark von allen anderen. Sie sind größer als Arbeiterinnen und nicht so schlank, außerdem besitzen sie besonders große Augen (Skript Uni Hohenheim). Ihre einzige Lebensaufgabe besteht im Transport des männlichen Erbgutes zu Jungköniginnen und deren Befruchtung (Harrison, 1903; Tautz, 2007). Deshalb fliegen sie auch während der gesamten Zeitspanne, in der Jungköniginnen ihre Hochzeitsflüge machen, tagtäglich von Vormittag bis Nachmittag aus. Die Drohnen werden vom Bienenvolk nur während der Paarungszeit mit Nahrung versorgt, danach kommt es zur sogenannten Drohnenschlacht, in der erfolglose, übriggebliebene Drohnen vom Volk verstoßen werden, erfolgreiche Drohnen sterben direkt während der Paarung (Tautz, 2007).

1.1.2. Embryogenese

Bienen, und zwar alle drei Wesensarten, entwickeln sich aus einem Ei über Larven und Puppenstadien zu adulten Tieren, dabei durchschreiten sie eine komplette Metamorphose. Allerdings sind deutliche Unterschiede in der Entwicklungsdauer der drei Bienenkasten erkennbar. Während sich die Königinnen nach 16 Tagen zum Imago entwickelt haben, benötigen Arbeiterinnen mit 21 Tagen 5 Tage mehr Zeit. Am längsten dauert die Entwicklung der Drohnen, sie schlüpfen als adulte Tiere erst nach 24 Tagen.

Die Embryonalentwicklung ereignet sich während der ersten drei Tage im Ei. In diesem Abschnitt entwickelt sich das Ei durch mehrfache Zellteilungen zu einer Rundmade, die dann die Eihaut durchdringt. Diese Rundmade wird die darauffolgenden 3 Tage von dem Hypopharynxdrüsensekret der Ammenbienen, dem sogenannten Gelee Royale, ernährt. Danach findet eine differenziertere Ernährung statt, die zu Unterschieden in der weiteren Entwicklung führen. Larven, die weiterhin ausschließlich mit dem Gelee Royale gefüttert werden, entwickeln sich zu Königinnen, während Arbeiterinnen- und Drohenlarven mit einer Mischung aus Gelee Royale, Honig und Pollen versorgt werden. Die Rundmade wächst stark an und häutet sich innerhalb der nächsten 5-6 Tage 4-mal, danach wird die Wabenzelle von Arbeiterinnen mit einem luftdurchlässigen Deckel verschlossen und die Rundmade streckt sich zur sogenannten Streckmade, die sich anschließend in einen Kokon einspinnt. In der ca. 4 Tage langen Ruhephase werden alle Madenorgane eingeschmolzen und die Organe des zukünftigen adulten Tieres gebildet. Die Gestalt der aus der anschließenden Häutung hervorgehenden Puppe ähnelt schon der einer adulten Biene. Nach weiteren Veränderungen und einer letzten Häutung nagt sich das adulte Tier durch den Wabendeckel und schlüpft.

1.1.3. Morphologie

Der Körper einer erwachsenen Honigbiene weist die für Insekten charakteristischen Eigenschaften auf, so kann er grundsätzlich in Kopf, Thorax und Abdomen eingeteilt werden. Außerdem besitzt die Biene ein Chitin-Außenskelett, gegliederte Beine und Mundwerkzeuge, ein Strickleiternnervensystem, ein offenes Blutgefäßsystem und Facettenaugen, all diese Merkmale sind typisch für die Gruppe der Insekten. Im Folgenden wird der Körperbau der Honigbiene näher betrachtet.

Der Kopf unterscheidet sich bei den drei Bienenwesen deutlich voneinander (siehe Abb. 3). Die Königin besitzt einen größeren und rundlicheren Kopf als eine Arbeiterin. Der Kopf

eines Drohn sieht mit extrem großen Facettenaugen, die aus ca. 19.000 Einzelaugen bestehen, bienenuntypisch aus (<https://www2.hu-berlin.de/bienenkunde/index.php?id=111>). Die Komplexaugen der weiblichen Tiere setzen sich nur aus der halben Anzahl von Einzelaugen zusammen. Zusätzlich können alle Bienenwespen über drei Stirn- (Ocellen), die zwischen den Komplexaugen liegen, Hell und Dunkel unterscheiden.

Im Kopf befindet sich das Oberschlundganglion, das häufig auch als Gehirn bezeichnet wird. Es ist vor allem bei den Arbeiterinnen stark ausgebildet, was die relativ hohen kognitiven Fähigkeiten und das gute Gedächtnis dieser Tiere widerspiegelt (Skript Uni Hohenheim; <http://www.bienenschade.de/Honigbienen/Sprache/Sinnesorgane%20Bienen.htm>).

Im Kopf sind auch wichtige Drüsen zu finden. Die Hypopharynxdrüse, auch Futtersaftdrüse genannt, ist besonders stark bei den Ammenbienen ausgebildet und dient der Herstellung des Gelees Royals, mit dem die Larven gefüttert werden. Diese Drüse liefert außerdem Enzyme zur Honigproduktion. Eine sehr wichtige Rolle für das Zusammenleben der Bienen im Stock spielt die Oberkieferdrüse (Mandibulardrüse) der Königin, sie produziert das Königinnenpheromon, welches starken Einfluss auf das Verhalten des Volkes ausübt. Am Kopf sitzen zudem zwei Antennen, die aus 10 (bei weiblichen Bienen) bzw. 11 (bei Drohnen) Gliedern bestehen und viele Sinneszellen zur Geruchs- und Tastwahrnehmung besitzen. Desweiteren befinden sich am Kopf die Mundwerkzeuge. Der mehrgliedrige Rüssel dient der Nahrungsaufnahme und Larvensaft-Ausgabe, während die Mandibeln eine universelle Verwendung finden, sie werden z.B. fürs Putzen, Kämpfen, Öffnen von Wabendeckeln, Füttern von Larven und Kneten von Wachs und Pollen eingesetzt.

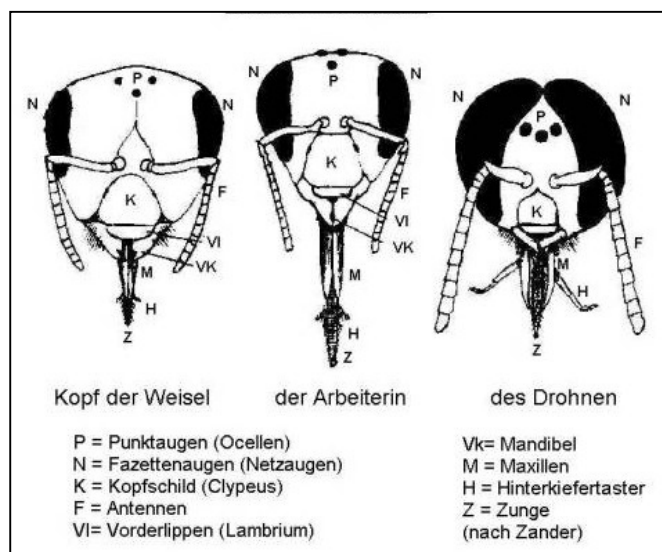


Abb.3: Kopfform der drei Bienenwespen. Graphische Darstellung des Kopfes der drei Bienenwespen, Königin, Arbeiterin und Drohn im Vergleich.

Quelle: <http://www.bienenschade.de/Honigbienen/Sprache/Sinnesorgane%20Bienen.htm>

Der dem Kopf anschließende Thorax besteht aus drei Segmenten, von denen jedes ein Beinpaar trägt. Die Beine bestehen, wie bei Insekten üblich, aus mehreren Gliedern und sind an die jeweilige Funktion angepasst. Besonders auffällig ist die Ausbildung des sogenannten Pollensammelapparates an den Hinterbeinen der Arbeiterinnen. Diese auf das Sammeln von Pollen spezialisierte Struktur besteht aus mehreren Teilen, der Bürste, dem Kamm und dem Körbchen und ist die Grundlage für die sogenannten Pollenhöschen, die man bei Sammelbienen häufig sieht. Die Vorderbeine aller drei Bienenwespen besitzen eine Einkerbung, die man als Putzscharte bezeichnet, mit ihr können die Tiere ihre Antennen reinigen und damit ihre Sinneszellen säubern. Das mittlere und hintere Thoraxsegment trägt jeweils ein Flügelpaar. Diese über Häkchen miteinander koppelbaren Flügelpaare ermöglichen den Bienen das Fliegen. Im anschließenden Abdomen einer Biene befinden sich der Fettkörper, wichtige Teile des Verdauungssystems, die Geschlechtsorgane, einige Drüsen und ggf. der Stachelapparat. Auch für die Atmung ist das Abdomen wichtig. Diese geschieht über sogenannte Stigmen, Atemöffnungen, über die der Gasaustausch stattfindet. Eine Biene besitzt 10 solcher Stigmenpaare, die über Thorax und Abdomen verteilt sind und in die die Luftröhren (Tracheen) münden. Die Tracheen verzweigen sich im Körper der Biene zunehmend und versorgen in Form feinsten Ästchen direkt alle Zielorgane/-zellen. An den Tracheen sind Ausweitungen, auch Luftsäcke genannt, zu finden. Bewegungen des Abdomens bewirken das abwechselnde Füllen und Entleeren dieser Luftsäcke und sorgen so für den Gasaustausch. Das offene Blutgefäßsystem spielt für die Atmung somit nur eine geringfügige Rolle, vielmehr dient es dem Transport von Nähr- und Abfallstoffen. Das Bienenherz, bzw. der Herzschlauch liegt dorsal im Abdomen, von ihm gehen seitlich Herzklappen ab. Durch diese strömt die nährstoffreiche Hämolymphe vom Verdauungssystem in den Herzschlauch und wird nach vorne in Thorax und Kopf zu den Bewegungs- und Sinnesorganen gepumpt. Das nährstoffarme Blut fließt dann ventral nach hinten, wo es erneut mit Nährstoffen beladen werden kann. Das Verdauungssystem kann in Speiseröhre, Honigblase, Mittel-, Dünn- und Enddarm und die Afteröffnung eingeteilt werden. Die Speiseröhre beginnt bei der Mundöffnung, durchzieht den gesamten Kopf und Thorax und mündet im Abdomen in der erweiterten Honigblase, die der Nahrungsspeicherung dient und bis zur Hälfte des Körpergewichtes an Nektar aufnehmen kann. Am caudalen Ende der Honigblase befindet sich der Ventiltrichter, der die Nahrungszufuhr in den anschließenden Mitteldarm kontrolliert. Der Mitteldarm ist das eigentliche Verdauungsorgan, im vorderen Abschnitt wird die Nahrung aufgespaltet und die gelösten Nährstoffe werden dann im hinteren Abschnitt des Mitteldarms über die peritrophische Membran an die Hämolymphe abgegeben. Der Mitteldarm geht

anschließend in den relativ kurzen Dünndarm über. Am Übergang zwischen diesen Darmabschnitten münden ca. 100 malphigische Gefäße, die Nierenfunktion ausüben. Sie filtern Abfallprodukte aus der Hämolymphe und geben diese in den Darm ab, damit sie mit dem Kot ausgeschieden werden. Der dem Dünndarm folgende Enddarm beinhaltet die Kotblase, sie ist extrem dehnungsfähig und dient der Kotspeicherung bis zur möglichen Kotentleerung. Indem die Bienen nur außerhalb des Nestes ihren Kot absetzen, halten sie den Bienenstock sauber und reduzieren die Verbreitung von Krankheitskeimen.

Ein wichtiges für Insekten typisches Stoffwechselorgan ist der Fettkörper, in ihm finden umfangreiche metabolische Prozesse statt. In den Fettkörperzellen werden die im Darm gewonnenen Nährstoffe zu Energiespeicherstoffen, wie Glycogen und Fette umgewandelt und anschließend gespeichert und/oder an die Hämolymphe abgegeben. Außerdem werden im Fettkörper Lipophorine, die zum Lipidtransport notwendig sind, Proteine zur Larvenfütterung, Reserveproteine zur Überwinterung und das Haupt-Hämolympheprotein Vitellogenin gebildet. Dieses spielt eine wichtige Rolle in der Eireifung und wird, wie schon erwähnt, für die Langlebigkeit der Winterbienen verantwortlich gemacht.

An der Unterseite des Abdomen sind die 4 Paar Wachsdrüsen lokalisiert, die der Wachsproduktion dienen. Flüssiges Wachs tritt aus den Drüsenöffnungen und erstarrt dort. Die Grundstoffe des Wachses werden auch im Fettkörper produziert, weshalb dieser auch mit den Wachsdrüsen in engem Kontakt steht.

Eine weitere Drüse ist die Giftdrüse am Stachelapparat, sie stammt phylogenetisch vom weiblichen Genitaltrakt, weshalb auch nur weibliche Bienenwespen über eine solche Struktur verfügen. Der Stachel einer Biene besitzt kleine Widerhäkchen, weshalb er auch in der Haut von Menschen und anderen Warmblütern stecken bleibt, wodurch sich die Biene den Stachel samt Giftblase und einem Nervenknäuel aus dem Körper reißen und anschließend verendet.

1.1.3.1 *Geschlechtsorgane*

Der Genitaltrakt der Königin umfasst Eierstöcke (Ovarien) und Eileiter (Ovidukte), Vagina, Spermatheka und Samenblasengang. Die zwei Eierstöcke bestehen jeweils aus ca. 160-180 Eischläuchen, die alle in einen der Eileiter münden. In diesen Eischläuchen werden pro Tag bis zu 2000 Eier gebildet und gereift, wobei die Entwicklung von der Spitze bis zum Übergang in den Eileiter erfolgt. Es sind ständig Eier in unterschiedlichen Entwicklungsstadien enthalten. Für die Befruchtung werden in der Spermatheka gelagerte

Spermien über den Samengang in den mittleren Eileiter geleitet und so mit den reifen Eiern zusammengeführt. Die reifen befruchteten und unbefruchteten Eier gelangen durch den Eileiter in die Vagina und werden anschließend von der Königin einzeln in die jeweiligen Waben gesetzt. Der Geschlechtsapparat der Drohnen besteht einerseits aus den samenbildenden und leitenden Elementen, wie den Hoden und den Samenleitern und andererseits aus dem relativ großen ausstülpbaren Begattungsorgan. Dieser Endophallus besteht aus der mit Spermien und Samenschleim gefüllten Samenblase und mehreren Strukturen, wie z.B. den Hörnchen, die das Einhaken in der Königin ermöglichen.

Die Spermien werden während der Entwicklung des Tieres schon vor dem Schlüpfen des Imagos in den Hoden gebildet, die ca. 8 Tage vor Schlupf am stärksten entwickelt sind (vgl. Kapitel 1.1.5.). Danach findet eine Rückbildung der Hoden statt. Die Spermien werden zunächst noch gereift und dann über die Samenleiter (*Vas deferens*) in die Samenblase, Zwiebel oder auch Bulbus genannt, gefüllt. Außer den Samen enthält diese Struktur noch den Mucus, den weißlich gelben Samenschleim aus der Schleimdrüse (*Mucous gland*). Zu Beginn des Begattungsaktes wird der Endophallus zum Teil ausgestülpt, die komplette Ausstülpung des Begattungsorgans geschieht dann passiv während Königin und Drohn verbunden sind. Bei Trennung der Bienenwesen verbleibt ein Teil des männlichen Genitaltraktes als sogenanntes Begattungszeichen in der weiblichen Geschlechtsöffnung. Der Drohn stirbt durch diese Verletzung sofort.

1.1.4. Spermienmorphologie

Insektenspermien können in Aufbau und Aussehen stark variieren, dennoch existieren es einige Grundeigenschaften, die für die Spermien fast aller Insektenpezies gelten. Sie sind im Allgemeinen langgezogene motile Zellen, die sich in Kopf, Flagellum und einem Verbindungsstück unterteilen lassen (Werner und Simmons, 2008). Ein Honigbienspermium entspricht mit einer Länge von ca. 250-270 μm (Lino-Neto et al., 2000) und einem Durchmesser von nur 0,7 μm diesem Grundbauplan. Der Kopf besteht, wie bei Spermien anderer Spezies, aus dem DNA-tragenden Nukleus, der ca. 5 μm lang, 0,5 μm breit und 0,3 μm dick ist (Lensky et al., 1979) und einem akrosomalen Komplex, der sich dem Nukleus apikal anschließt. Er hat seinerseits eine Länge von 5 μm und geht in den Kernbereich über. Der akrosomale Komplex besitzt eine röhrenförmige Spitze, die in einen ballonartig ausgeweiteten Bereich übergeht, dieser verjüngt sich etwas und geht als langgestreckter Bereich in die Kernzone über (siehe Abb. 4). Das Akrosom besteht aus dem

akrosomalen Vesikel und der innenliegenden subakrosomalen Substanz. Diese wird auch als akrosomaler Stab oder Perforatorium bezeichnet (Rothschild, 1955; Lino-Neto et al., 2000; Werner und Simmons, 2008; Afzelius, 2006), um die Funktion dieser Struktur in den Spermien mancher Spezies zu beschreiben. Afzelius (2006) spricht auch von einem sog. akrosomalen Filament, da die subakrosomale Substanz Actin enthält und sie in manchen Spermien speziez filamentartige Strukturen ausbildet, die bei der Akrosomenreaktion nadelähnlich das akrosomale Vesikel und die Eihülle durchdringt, was zur Ausschüttung der akrosomalen Enzyme und erleichterten Penetration der Eihülle beiträgt (Afzelius, 2006). In den Spermien der Honigbiene liegt die subakrosomale Substanz im Inneren des Akrosoms und bildet eine Art intranuklearen Stab aus, der einer Grube am vorderen Ende des Nukleus entspringt.

Obwohl Werner und Simmons (2008) sowie Peng et al. (1993) für Insektenspermien von einer zusätzlichen äußeren Schicht berichten, einer zytoplasmatischen Schicht zwischen akrosomalem Vesikel und Plasmamembran, beschreiben Lino-Neto et al. (2000) nur das Perforatorium und den akrosomalen Vesikel in Bienenspermien. Nach Afzelius (2006) variiert der Akrosomenaufbau bei Insekten sehr stark, so sind in dieser Klasse sowohl akrosomenlose Spermien als auch welche mit einschichtigen, zweischichtigen und dreischichtigen Akrosomen zu finden.

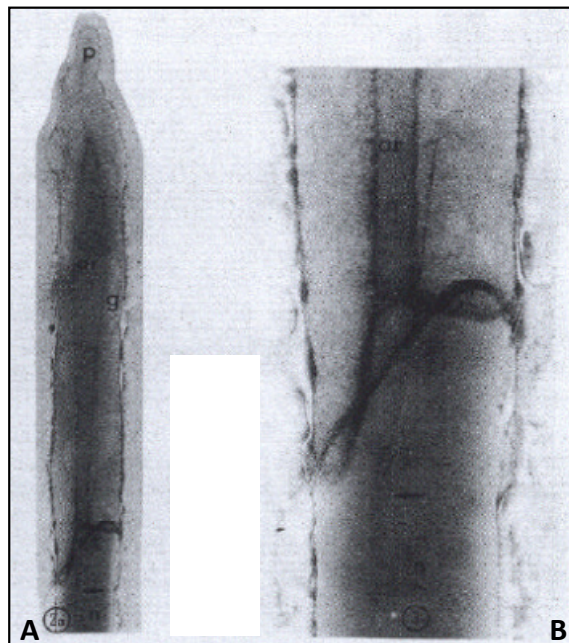


Abb.4: Akrosomaler Kopfbereich (A) und Übergang von Akrosom und Nukleus (B) eines Bienenspermiums. Mikroskopische Aufnahmen des akrosomalen Kopfbereiches (Vergrößerung: 7.000-fach) und des Übergangs von Akrosom und Nukleus (Vergrößerung: 13.500-fach).

Quelle :Dissertation Keiner-Stoehr, 2004; nach Lensky, 1979

Dem Nukleus schließt sich das Flagellum an, das den Bienenspermien die Motilität ermöglicht. Es besteht aus zwei Mitochondrienderivaten, zwei akzessorischen Körpern und einem Axialfilament. Die auch als Axonem bezeichnete Struktur weist eine typische 2 + 9 x 2 Anordnung von Mikrotubuli auf. Wie bei allen eukaryotischen Cilien und Geißeln sind dabei zwei einzelne zentral liegende Mikrotubuli von 9 peripher liegenden Mikrotubulipaaren umgeben. Eine Besonderheit, die nur bei Insektenspermien zu finden ist, sind die zusätzlichen 9 Einzel-Mikrotubuli, die wiederum peripher um den Ring aus Mikrotubulipaaren liegen (Werner und Simmons, 2008; Rothschild, 1955; Phillips, 1970). Diese äußeren Zusatzmikrotubuli setzen weiter vorne an und enden früher, als die gewöhnlichen/normalen Mikrotubuli des Axonems (Phillips, 1970).

Die 9 Doppelmikrotubuli sind mit den zentral liegenden über radiale Speichen und der zentralen Scheide verbunden und besitzen Dyneinarme, über die sie mit benachbarten Mikrotubulipaaren in Kontakt treten können. Die Verbindung zu den außen liegenden 9 Einzeltubuli geschieht über intertubuläres Material (siehe Abb. 5). Die erwähnten Dyneinarme besitzen ATPase-Funktion, d.h. sie hydrolysieren ATP zu ADP und anorganischem Phosphat und liefern so die Energie für die Bewegung des Spermiums. Durch die ATP-Hydrolyse gleiten die äußeren Mikrotubuli-Dubletts aneinander vorbei und bewirken eine lokale Biegung des Flagellums. Dieser Vorgang wird, wie auch bei der Muskelkontraktion als Gleitfilament-Mechanismus bezeichnet.

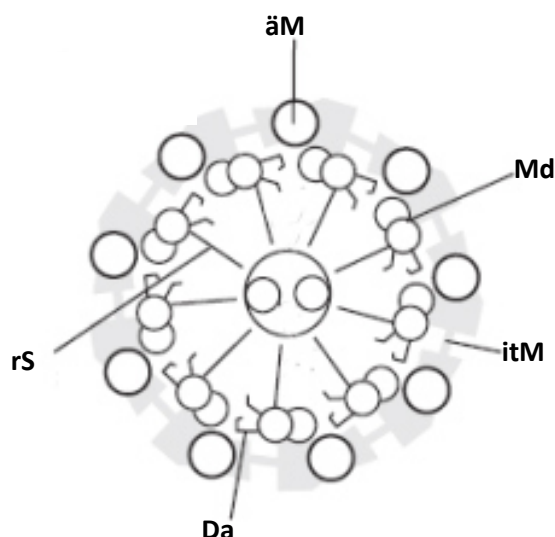


Abb.5: Schematische Darstellung eines Axonemquerschnittes.

Die dargestellten Strukturen sind wie folgt benannt: äM – äußerer Mikrotubulus; Da – Dyneinarm; itm – intertubuläres Material; Md – Mikrotubulidublett; rS – radiale Speiche.

Quelle: Modifizierte Darstellung nach Werner und Simmons, 2008

Parallel zum Axonem verlaufen zwei große Mitochondrienderivate, die sich in Durchmesser, Form und Länge unterscheiden (Lino-Neto et al., 2000; Rothschild, 1955). Sie entstehen durch komplexe Fusions- und Separationsvorgänge früherer Spermamid-Mitochondrien während der Spermiogenese (Werner und Simmons, 2008; Phillips, 1970). Das größere

Mitochondrienderivat besitzt eine ovale Form, beginnt früher und ist länger als das kleinere runde Mitochondrienderivat. Der Ansatzpunkt des kleineren Mitochondrienstrang befindet sich nicht wie beim größeren direkt am Nukleus-Flagellum-Übergang, sondern am Ende einer sehr elektronendichten Struktur, die von Lino-Neto et al. (2000) als Centriolenzusatz bezeichnet wird. Die Untersuchungen von Lino-Neto et al. (2000) zeigen, dass das größere Derivat aus vier verschiedenen Abschnitten besteht, während das kleinere nur drei dieser Zonen aufweist, ihm fehlt ein Bereich aus parakristallinem Material. Beide besitzen jedoch einen Bereich mit mitochondrialen Cristae. Dennoch ist noch nicht geklärt, inwieweit die Mitochondrienstränge der Energieversorgung für die Motilität dienen. Laut Werner und Simmons (2008) besitzen Insektenspermien in Abhängigkeit ihrer Spezies sowohl die Möglichkeit zur anaeroben ATP-Produktion mittels Glykolyse als auch die Fähigkeit zur Durchführung des Citratzyklus und der oxidativen Phosphorylierung. Das Verhältnis, in welchem Maße welcher Stoffwechselweg stattfindet, ist jedoch stark speziesspezifisch, so existieren Insektenspezies, die ihre Energie für die Motilität ausschließlich anaerob produzieren (Baccetti et al., 1973; Werner et al., 1999). Die Spermien anderer Insektenarten gewinnen die für die Bewegung notwendige Energie rein aerob oder durch eine Kombination von beidem (Rao und Davis, 1969; Ruknudin und Raghavan, 1988). Auch in Bienenspermien sind beide Stoffwechselwege möglich, das implizieren zumindest die Resultate von Al-Lawati et al. (2009). Sie konnten die Aktivität mehrerer glykolytischer als auch mit dem Citratzyklus verbundener Dehydrogenasen in Bienenspermien nachweisen. Kraft et al. (1978), hingegen behaupten, dass die Energieversorgung in Bienenspermien ausschließlich glykolytisch erfolgt.

Außer dem Axonem und den Mitochondrienderivaten verlaufen im Flagellum noch zwei dreieckförmige Strukturen, die als akzessorische Körper bezeichnet werden. Sie liegen zwischen dem Axonem und den Mitochondriensträngen. Innerhalb der Insekten differiert die Ausprägung dieser akzessorischen Körper extrem stark.

1.1.5. Spermatogenese in Drohnen von *Apis mellifera*

Die Spermatogenese bei *Apis mellifera* lässt sich, wie bei anderen Spezies auch, in drei Abschnitte einteilen: mitotische Zellvermehrung, meiotische Zellteilung und Reifung der Spermatiden zu fertigen Spermien (Spermiogenese). Allerdings sind in der Bienenspermatogenese, wie für Insekten typisch, die Spermiovorläuferzellen (Spermatogonien, Spermatozyten, Spermatiden) in Zysten organisiert und durchlaufen somit alle Entwicklungen synchron (Dumser, 1980; Cruz-Landim, 2001). Eine weitere

Besonderheit, die man bei der Spermatogenese von haploiden Tieren vorfindet, ist eine veränderte Meiose, in der eine Reduktion der Chromosomen wegfällt. Dieser Umstand wird später näher erläutert.

Interessant ist auch, dass bei Honigbienen die Spermatogenese nach der Embryogenese der Drohnen beginnt und während der larvalen und pupalen Entwicklung stattfindet. Die verschiedenen Spermatogenesestadien sind dabei nicht alle gleichzeitig zu finden, vielmehr sind bestimmte Stadien für einzelne Entwicklungszustände charakteristisch (Fyg, 1973). Noch vor Schlupf des Imagos ist die gesamte Spermatogenese, mit Ausnahme einer späteren Nachreifung, abgeschlossen.

Die Entwicklung der Spermien beginnt in den paarigen oval geformten Testes, die im vorderen Abdomen liegen (Ruttner und Tryasko, 1976; Hoage and Kessel, 1968) und schon während der Embryogenese angelegt werden. Auch die Einwanderung der Urkeimzellen in die Hodenanlagen findet sehr früh während der Embryogenese statt und ist, wie Fyg (1973) bemerkt, fast noch unerforscht. Jeder Hoden besteht aus ca. 200 Hodenschläuchen, den sogenannten Testiolen. Sie sind von einem Einzellschicht-Epithel umgeben und mit Gewebe ausgefüllt. Dadurch handelt es sich nicht wirklich um schlauchartige Gebilde, sondern, wie Meves (1907) beschreibt, eher um lange zylindrischen Fäden ohne Lumen. Die Testiolen enden auf der dem Hodenstiel abgewandten Seite blind, während sie auf der gegenüberliegenden Seite in den Samenleiter (*Vas deferens*) münden. Am verschlossenen apikalen Ende der Testiolen findet man germinales Gewebe, aus dem die anfänglich kleinen Follikelzellen und die Spermatogonien, also die Vorläufer der Spermatozyten, hervorgehen. In der Rundmade, d.h. 4-10 Tage nach Eiablage, finden in den Hodenschläuchen viele mitotische Zellteilungen primärer Spermatogonien statt. Zunächst liegen die Spermatogonien dicht gedrängt und ungeordnet in den Testiolen, nur von einigen Follikelzellen durchbrochen. Durch weitere mitotische Vermehrung gehen aus den primären Spermatogonien die sekundären hervor, die sich zu sogenannten Spermatozysten zusammenlagern (Fyg, 1973; Meves, 1907). Zwischen diese Zellverbände drängen sich die nun stark herangewachsenen und mitochondrienreichen Follikelzellen, die sich mitotisch weiter vermehren und die Wände der Zysten ausbilden. Meves, (1907) konnte in den mitotisch aktiven Follikelzellen ca. 60 Chromosomen zählen und vermutet, dass die Chromosomenanzahl in Follikelzellen 64 beträgt. Dabei bezieht er sich auf die Ergebnisse von Petrunkewitsch (1901/03), der Blastodermzellen des sich furchenden Bieneneies untersuchte. In den Spermatozysten bilden die Spermatogonien rosettenartige Gebilde, die durch ihre kegelartige Form zustande kommt (Cruz-Landim, 2001). Die spitzen Enden sind

dabei in der Zystenmitte durch einen homogenen Spindelrestkörper miteinander verbunden.

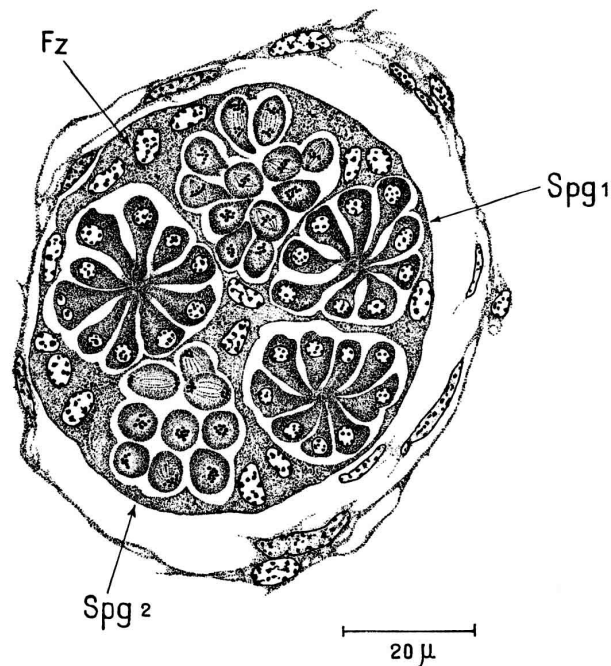


Abb.6: Hodenschlauch einer Drohnenlarve im Querschnitt. Fz: Follikelzelle; Spg1: Kegelförmige Spermatozyten, die rosettenähnliche Zysten ausbilden; Spg2: mitotisch aktive Spermatozyten. Quelle: W. Fyg, 1973.

Meves, (1907) schließt daraus, dass alle Spermatozyten einer Zyste von einer gemeinsamen Ahnenzelle abstammen. Die Kerne dieser kegelförmigen Zellen liegen im basalen, der Zystenmitte abgewandten Zellteil (siehe Abb. 6). Auch in dieser Entwicklungsphase vermehren sich die Spermatozyten weiter, wobei alle Mitosen innerhalb einer Zyste nahezu synchron ablaufen, was vermutlich an den Zytoplasmabrücken liegt. In den ausgewachsenen Rundmaden wachsen die Spermatozyten anschließend stark heran, von 3-4 µm auf 14 µm Durchmesser (Hoage und Kessel, 1968), werden wieder kugelig und entwickeln sich so zu Spermatozyten. Fyg, (1973) beschreibt dieses Stadium der Spermienentwicklung als typisch für die Streckmade und die jüngsten Puppen, direkt nach der Metamorphose. In dieser Phase sind alle Testiolen mit Paketen aus Spermatozyten prall gefüllt. Zwar haben die Zellen nun eine kugelige Form und sind stark vergrößert, doch die Verbindung untereinander ist immer noch gegeben, nur nicht wie zuvor in der Zystenmitte, sondern an verschiedenen Stellen der Zellen. Jede der Zysten besteht laut Hoage und Kessel (1968), durchschnittlich aus 16 Zellen, deren Zytoplasma durch unvollständige Trennung bei der Mitose der Spermatozyten verbunden ist. Mit der Wachstumsphase gehen weitere Veränderungen einher, so werden zwei Zentriolen sichtbar, die Mitochondrien ordnen sich zu sogenannten Chondromiten

zusammen, und in den Kernen wird ein Gerüstwerk erkennbar. Nur im äußersten apikalen Ende der Testiolen sind noch einige Spermatogonien zu finden, die allerdings mitotisch inaktiv sind und somit keine jüngeren Spermatogenesestadien mehr erzeugen. Kurz nach der Metamorphose beginnen in den Puppen die Reifeteilungen der Spermatozyten. Dafür werden zunächst die Chromatiden im Laufe der S-Phase verdoppelt. Bezüglich der ersten meiotischen Teilung, der Reduktionsteilung, herrscht in der Fachwelt Uneinigkeit. Klar bewiesen werden konnte, dass aus den haploiden Spermatozyten auch haploide Spermien hervorgehen und deshalb keine wirkliche Reduktion der Chromosomen stattfindet. Einerseits wird von einer abortiven ersten Meiose ausgegangen (Tarelho, 1981; Hoage und Kessel, 1968; Meves, 1907), wie sie für die Reifeteilungen bei Hymenopteren charakteristisch ist (Monica et al., 2005). Dieser Ansicht nach beginnt die erste meiotische Teilung völlig normal, allerdings unterbleibt dann in der Metaphase die Chromosomenaufteilung. Alle Chromosomen verbleiben in der Zelle und umgeben von einer intakten Kernhülle (Meves, 1907; Woyke und Skowronek, 1974; Monica et al., 2005). Die Bildung zweier Tochterzellen fällt weg und nur eine kernlose Zytoplasmaknospe entsteht, die zunächst mit der Mutterzelle verbunden bleibt, bis sie schließlich abgeschnürt wird. Die Teilung der Chromosomen entfällt, weil diese in endoplasmatische Retikulum-Cysternen eingewickelt sind und so in ihrer Bewegung stark eingeschränkt werden. Während der beschriebenen abortiven Meiose findet eine mehrfache Zentriolen-Replikation statt. Bis zu 8 Zentriolenpaare werden gebildet, von denen die 6 überschüssigen Paare anschließend über die Entwicklung von Zytoplasmablasen eliminiert werden. Hoage and Kessel, (1968) haben sich mit diesem Phänomen eingehend befasst und eine detaillierte elektronenmikroskopische Untersuchung durchgeführt.

Betreffend der ersten meiotischen Teilung existiert noch eine weitere Ansicht, nach der nur die Äquationsteilung stattfindet und eine Reduktionsteilung vollständig oder abortiv ausfällt (Fahrenhorst, 1977), was den Vorgang vereinfacht darstellen lässt. Fyg (1973) schreibt dementsprechend: „...Reifeteilungen, welche nach den eingehenden Untersuchungen von Wolf (1960) offenbar weniger kompliziert verlaufen, als bislang angenommen und in der Fachliteratur gemeinhin dargestellt wurde.“ Er stützt sich bei seiner Aussage, dass keine abortive Meiose 1 stattfindet vor allem auf die Ergebnisse von Wolf (1960) und Doncaster (1906), der bei seinen histologischen Untersuchungen zur ersten Reifeteilung nicht immer die Ausbildung einer Zytoplasmaknospe vorfand. Auch Sanderson und Hall, 1948 konnten bei ihren Untersuchungen keine Knospenbildung nachweisen, die auf eine abortive erste meiotische Teilung hinweisen würde. Allerdings

schließen sie die Existenz einer solchen unvollständigen Reduktionsteilung genauso wie Doncaster nicht aus.

Man ist sich jedoch einig, dass die anschließende zweite Reifeteilung normal verläuft. In dieser Äquationsteilung werden die Chromatiden jedes Chromosoms voneinander getrennt und auf zwei Tochterzellen aufgeteilt. Die entstehenden Spermatiden enthalten zwar die gleichen genetischen Informationen, unterscheiden sich aber stark in ihrer Größe und in ihrem Zytoplasmagehalt (Hoage und Kessler, 1968; Meves, 1907; Fyg, 1973). Von manchen Wissenschaftlern wird aus diesem Grund die Meinung vertreten, dass aus jeder Spermatozyte nur ein Spermatid und damit auch nur ein funktionsfähiges Spermium hervorgeht (Meves, 1907; Woyke und Skowronek, 1974; Monica et al., 2005). Demnach geht die zweite, kleinere Zelle, von Fyg (1973) auch Polkörperchen genannt, nach kurzer Wachstumsphase zugrunde. Konform dieser Annahme beschreibt Meves (1907): „Jedenfalls habe ich in Ausstrichpräparaten, die ich von dem Hodeninhalte geschlechtsreifer Drohnen angefertigt habe, bisher nur eine Art von Spermien, die aus den großen Zellen hervorgegangen sind, auffinden können.“ Zu einem anderen Ergebnis kommen Hoage und Kessel (1968). Sie belegen rechnerisch, dass aus jeder Spermatozyte zwei Spermatiden und damit zwei Spermien hervorgehen. Dafür nehmen sie die Testiolenzahl und -länge sowie die Größe der primären Spermatozyten und die Anzahl resultierender Spermien zu Hilfe. Auch die Resultate ihrer elektronenmikroskopischen Untersuchungen zur Spermiogenese deuten auf die Entwicklung zweier Spermien pro Spermatozyte hin, denn sie konnten Spermatiden mit zwei unterschiedlichen Durchmessern und Volumen identifizieren. Dieser Unterschied geht dann im Zuge der Spermiogenese verloren. Die Kontroverse konnte noch nicht komplett beigelegt werden. Allerdings ist es wahrscheinlicher, dass nur ein Spermium pro Spermatozyte entsteht, weil der kleineren Zelle für die Spermiogenese wichtige Zellorganellen, wie Golgi-Apparat und Mitochondrien, fehlen (Monica et al., 2005). Zudem konnten Monica, Lino-Neto und Dolder (2005) erste Anzeichen für die Zelldegeneration der kleineren Zellen finden.

Die Spermiogenese beginnt in den ca. 3-3 ½ Tage alten Puppen, während der es zu gravierenden Form- und Strukturänderungen kommt. Diese Vorgänge benötigen ungefähr 2-3 Tage und werden so noch in der Puppenphase abgeschlossen. Die Spermiogenese bei *Apis mellifera* läuft wie bei anderen Insekten ab (Hoage und Kessel, 1968). Das Akrosom entsteht aus kleinen Vesikeln, die vom Golgi-Apparat stammen und solange miteinander fusionieren, bis sie ein einziges großes Vesikel bilden. Dieses positioniert sich anschließend langsam in den anterioren Bereich und findet seine endgültige Position vor dem Kern. In

dieser Reifungsphase trennen sich die bislang noch untereinander verbundenen Spermatiden laut Hoage und Kessel (1968) komplett voneinander. Neuere Untersuchungen deuten aber darauf hin, dass die Spermatiden noch bis zum Verlassen der Hoden als reife Spermienbündel in Zysten verbunden bleiben (Cruz-Landim, 2001). Anschließend findet die Elongation des akrosomalen Vesikels und des Nukleus statt, bei dem das Akrosom fünffach länger und dementsprechend auch fünffach dünner wird. Während dieser Streckung kondensiert das Chromatin und bildet eine dichte homogene Struktur. Der ausgereifte Zellkern wird vorne kappenartig vom Akrosom umgeben, besitzt eine langgezogene zylindrische Form und enthält dicht kondensiertes Chromatin. Am Übergang vom Nukleus zum Flagellum sitzen das Zentriol und der Zentriolenzusatz, der später dem kleineren Mitochondrienstrang als Ansatzpunkt dient. Während der Flagellumbildung verlängert sich im Mittelstück der sogenannte Nebenkern, eine aus zwei Mitochondriensträngen bestehende Struktur, die zuvor in der sekundären Spermatozyte aus fusionierten Mitochondrien nahe dem Nukleus entstanden ist. Die Mitochondrienstränge durchziehen im gereiften Spermium fast das gesamte Flagellum, nur in den letzten 7-8µm fehlen sie. In den 5-6 Tage alten Puppen ist die Spermiogenese meist abgeschlossen, und alle Testiolen sind prall gefüllt mit Spermienbündeln. Die Spermien sind dann bereit für die Wanderung durch die Samenleiter in die Samenblasen (Vesiculae seminales), wo sie bis zur Ejakulation verbleiben. Diese Wanderung der Spermien aus den Hoden findet 2-3 Tage nach Schlupf des Imagos statt (Ruttner und Tryasko, 1976; Fyg, 1973). Drohnen sind dann allerdings noch nicht geschlechtsreif, denn die Mucus-Herstellung beginnt erst nach Schlupf, außerdem müssen die Spermien erst in der Samenblase nachreifen. Während dieser Nachreifung binden die Spermien mit ihren Köpfen an die Drüsenzellen der Samenblase. Dort verweilen sie einige Tage ruhend, bis die Drüsenzellen ihren Inhalt ausschütten, was die Spermien motiler werden lässt. Nach dieser Reifung ist die zuvor dickwandige Samenblase zu einem dünnwandigen Sack voller reifer Spermienbündel geworden (Ruttner und Tryasko, 1976).

1.2. Bedeutung der Honigbiene

Weltweit sind ca. 20.000 Bienenarten bekannt, davon sind ungefähr 560 Arten in Deutschland heimisch. In Europa und in den USA werden größtenteils die Unterarten der europäischen Honigbiene (*Apis mellifera*) gezüchtet und gehalten. Diese auf der ganzen Welt verbreitete Art besitzt sowohl für die Ökologie als auch für die Ökonomie einen hohen Stellenwert. Der hohe ökonomische Wert von *Apis mellifera* liegt nicht etwa in den direkten Produkten aus der Bienenhaltung wie Honig, Bienenwachs, Propolis und Gelee Royal

begründet, obwohl durch diese Produkte allein in Deutschland 100-125 Mio. Euro jährlich erwirtschaftet werden, sondern stammt von der Bestäubungsarbeit, den diese Tiere leisten (min. 2 Milliarden Euro in Deutschland, Angabe siehe BMELV). Die Bestäubung durch Insekten hat großen Einfluss, sowohl auf die Quantität als auch auf die Qualität vieler Obst- und Gemüsearten. So werde laut Katja Burmeister vom NABU der Ertrag bei Himbeeren und Erdbeeren um 50%, bei Birnen um 7%, bei Pflaumen um 75% und Sauerkirschen um 78% und bei Äpfeln sogar um 86% durch Bienenbestäubung gesteigert (siehe: <http://mecklenburgvorpommern.nabu.de/projekteundaktionen/bienenschutz/15771.html>). Zur Verdeutlichung ist die Ertragssteigerung durch Bestäubung für verschiedene Nutzpflanzen in Abb. 7 dargestellt.

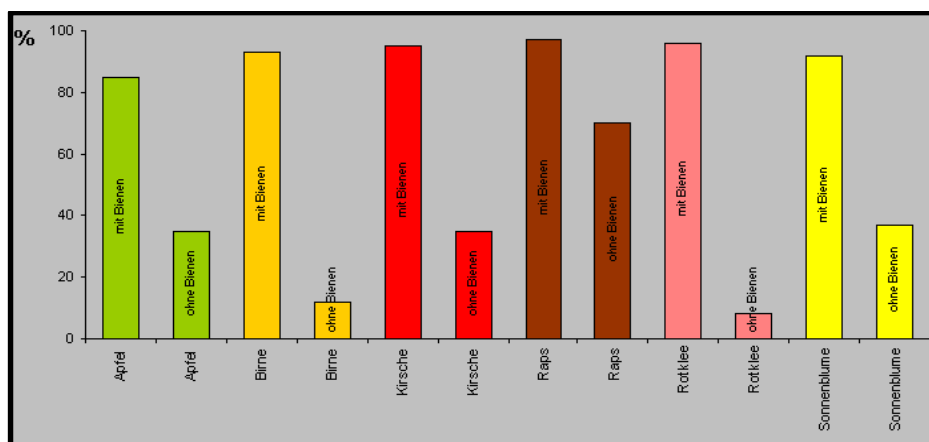


Abb.7: Ertragssteigerung verschiedener Obst- und Getreidearten durch Bienenbestäubung. Vergleichende Darstellung der Erträge verschiedener Obst- und Getreidesorten mit und ohne Bestäubung durch Bienen.

Quelle: <http://www.bienenschade.de/Bestaeubung/bestaebungsleistung.html>

Bei umfangreicher Recherche erhält man zwar unterschiedliche Angaben zur Ertragssteigerung der verschiedenen Obst- und Gemüsearten, dennoch wird klar, dass der Einfluss der Bestäubung sehr stark ist. Wie schon erwähnt, beeinflusst die tierische Bestäubung neben der Quantität auch die Qualität (Garratt et al., 2014) und sogar Haltbarkeit vieler Obst- und Gemüsefrüchte. Eine aktuelle Untersuchung der Universität Göttingen (Klatt et al., 2014) belegt und beschreibt am Beispiel der Erdbeere den umfassenden Einfluss der Bienenbestäubung auf deren Ertrag und Qualität. Diese Arbeit belegt, dass die Bestäubung durch Bienen das Fruchtgewicht, sowie die Gestalt der Früchte verbessert und weniger Missbildungen mit sich bringt. Auch das Zucker-Säure-Verhältnis in den Früchten werde durch Art der Bestäubung beeinflusst. Zusätzlich werde laut Klatt et al. (2014) die Haltbarkeit der Früchte durch Bienenbestäubung verlängert, was bei einer 4 tägigen Lagerung zu einer 11% niedrigeren Verlustrate führe.

Honigbienen sind die wichtigsten Bestäuberinsekten. Die Produktion von 84% aller in Europa kultivierten Nutzpflanzen ist direkt auf die Bestäubung durch Insekten, besonders durch Honigbienen, angewiesen (Gallai et al., 2009). Zwar stammen ca. 65% der weltweiten Nahrungsproduktion von selbst- und windbestäubten Nutzpflanzen, die keine Fremdbestäubung erfordern, dennoch bleiben ca. 35% auf Tierbestäubung angewiesen (Klein et al., 2007), darunter vor allem Gemüse- und Obstpflanzen. Gallai et al. (2009) schätzte für das Jahr 2005 den weltweiten ökonomischen Wert der tierischen Bestäubungsleistung auf 153 Milliarden Euro und damit auf ca. 9,5% der weltweiten landwirtschaftlichen Nahrungsproduktion. Natürlich sind Honigbienen nicht die einzigen Lebewesen, die Pflanzen bestäuben können, viele andere Insekten, darunter Käfer, Fliegen, Hummeln, Schmetterlinge, aber auch manche Vögel, Fledermäuse und andere Säugetiere sind dazu fähig. Allerdings ist die Bestäuberleistung dieser Tiere im Vergleich zur Honigbiene eher gering und spielt wirtschaftlich nur eine untergeordnete Rolle. Die Bestäubungsarbeit der Honigbienen besitzt mittlerweile einen so hohen Stellenwert, dass die Honigbiene als dritt-wichtigstes Nutztier anerkannt wird. Und da der Anteil bestäubungsabhängiger Kulturpflanzen stark zunimmt, wird die Bedeutung der Bestäubung voraussichtlich noch weiter steigen. Doch während bestäubungsabhängige Kulturpflanzen vermehrt angebaut werden, sinken die Bienenvölkerzahlen in manchen Regionen der Erde, vor allem in den USA und manchen Teilen Europas, und stehen daher im starken Kontrast zueinander.

Neben der großen ökonomischen Bedeutung spielen Wild- und Honigbienen auch eine unverzichtbare Rolle im ökologischen Gleichgewicht. Zum einen tragen sie über die Bestäubung vieler Wildpflanzen direkt zur Erhaltung der Artenvielfalt bei, zum anderen sichern sie die Biodiversität zusätzlich indirekt, da sie das Nahrungsangebot vergrößern. Zwischen Bestäubern und den Bestäuber-abhängigen Pflanzen existiert ein kompliziertes Netzwerk, dessen funktionale Vielfalt für den Fortbestand der Ökosysteme unerlässlich ist. Denn eine Reduzierung der Bestäubervielfalt kann großen Einfluss auf die Pflanzendiversität ausüben und diese ebenfalls reduzieren (Biesmeijer et al., 2006; Potts et al., 2010a). Man unterscheidet bei Bestäubern zwischen Generalisten und Spezialisten. Während Spezialisten, wie der Name schon impliziert, auf die Bestäubung einer oder weniger Pflanzen spezialisiert sind, können Generalisten, zu denen auch die Honigbiene zählt viele verschiedene Pflanzenarten bestäuben (De La Rúa et al., 2009). Diese Einteilung ist genauso bei den Bestäuber-abhängigen Pflanzen zu finden, auch hier gibt es Spezialisten und Generalisten. Meist interagieren Generalisten mit Spezialisten und umgekehrt (Fontaine et

al., 2005). Das macht den Generalisten *Apis mellifera* noch bedeutsamer, denn dieser kann häufig bei Verlust eines spezialisierten Bestäubers dessen Funktion übernehmen.

1.2.1. Krankheiten und Stressfaktoren

Von 1961 bis 2007 stieg die Anzahl der Honigbienenvölker weltweit deutlich an (64% Zuwachs; Meixner, 2010; FAO:<http://faostat3.fao.org/home/E>). Dennoch wird aufgrund der extremen Zunahme einer bestäuberabhängigen Landwirtschaft und der beängstigenden regionalen Verluste über eine globale Bestäuberkrise diskutiert (Ghazoul, 2005; Steffan-Dewenter et al., 2005; Aizen und Harder, 2009). Klar ist, dass sowohl die Artenvielfalt der Bienenfamilie (*Apidae*), so zum Beispiel bei den Hummeln (*Bombus*), als auch die Völkeranzahl der Honigbienen regional, insbesondere in Europa und den USA, in den letzten Jahren stark abgenommen haben (Kosior et al., 2007; Potts et al., 2010a). Für den Winter 2007/2008 wurde beispielsweise in den US. ein immenser Völkerverlust von 35,8% registriert, 11,4% mehr als im Jahr davor (Hayes et al., 2008). Für Europa der Jahre 1965 bis 2005 sammelten Potts et al., (2010b) Daten zu Bienenvölker- und Imkerzahlen und konnten sowohl einen Imker- als auch Bienenrückgang aufzeigen (UNEP: Kluser et al., 2010). Später wurde zudem eine Zunahme der Winterverluste 2009/2010 zum Vorjahr registriert, wobei die Werte von Land zu Land stark variierten (vgl. Van der Zee et al., 2012).

Die deutsche Imkerei hatte im Winter 2002/2003 besonders schwerwiegende Verluste zu verzeichnen, in dem fast 30% aller Honigbienenvölker eingingen (Genersch et al., 2010). Auch in den USA sind die Honigbienen-Völkerzahlen rückläufig, so hat die Bienenvölkerzahl seit 2006 um 30-40% abgenommen (UNEP: Kluser et al., 2010). Man unterscheidet die sog. Winterverluste, zu denen es kommt, wenn ein Bienenvolk nicht stark genug ist, den Winter zu überstehen, und das sog. Colony Collapse Disorder (CCD) -Phänomen. Dieses tritt seit dem 21. Jahrhundert auf und bezeichnet ein Bienenvölker-Sterben, bei dem alle adulten Bienen aus dem Stock fehlen, jedoch keine toten Bienen zu finden sind und nur die Königin mit Jungtieren und der Brut im Stock verbleiben (EFSA: <http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/pub/154r.htm>; UNEP: Kluser et al., 2010).

Sowohl die Wildbiene als auch die gezüchtete Honigbiene werden durch eine große Anzahl verschiedener Stressfaktoren gefährdet, die auch als Grund für das fortschreitende Bienensterben diskutiert werden (Genersch, 2010b).

Der Mangel an Lebensraum durch intensivierte und verbreitete Landwirtschaft und Landnutzung spielt eine große Rolle (Brown und Paxton, 2009; Potts et al., 2010a; De la

Rua et al., 2009). So ist eine ganzjährige Standortimkerei häufig nicht möglich, weil entweder der Nahrungsraum für die Bienen zu gering ist, und/oder dieser durch monokulturelle Landwirtschaft nicht ganzjährig die Versorgung gewährleistet (Naug, 2009; Brodschneider und Crailsheim, 2011). Zufütterung oder ein Standortwechsel könnte diese Problematik für die Imkerei zwar verringern, aber auch zu weiterem Stress für die Bienenvölker führen, wenn diese über lange Transportwege umgesiedelt werden. Seit 2004 wird in den USA der Transport von Honigbienenstöcken regelmäßig durchgeführt um die Bestäubung der monokulturell angebauten Mandelbäume Kaliforniens zu gewährleisten. Dabei werden Tausende Bienenvölker dicht gepackt auf Lastwagen zum Teil mehrere hundert Kilometer bis nach Kalifornien transportiert, was mit Sicherheit einen immensen Stress und eine hohe Ansteckungsgefahr für die Tiere bedeutet. Wildbienen sind von der intensiven, ausgedehnten und zum Teil monokulturellen Landwirtschaft noch stärker betroffen, denn zusätzlich zu den Ernährungsproblemen, fehlen auch zunehmend Nistmöglichkeiten (BMEL-Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft). Außerdem werden Wildbienenarten häufig durch intensiv betriebene Imkerei von der kommerziell gehaltenen Honigbiene *Apis mellifera* verdrängt.

Ein weiteres Problem, das die intensiv betriebene Landwirtschaft mit sich bringt, ist der weitverbreitete Einsatz von Insektiziden, Herbiziden und Fungiziden. Wie hoch der Einfluss solcher Chemikalien sein kann, zeigte sich 1970 in Ostkanda, als die dort ansässige Blaubeerenproduktion nach Insektizideinsatz komplett ausfiel, weil keine Bestäubung stattfinden konnte (Desneux et al., 2007). Doch Chemikalien können auch in subletalen Konzentrationen verheerende physiologische und verhaltensbiologische Auswirkungen auf Bestäuberinsekten ausüben (Rortais et al., 2005; Desneux et al., 2007; Greenpeace Report; Vanbergen et al., 2013). So wurde von verändertem Flug- und Lernverhalten, Orientierungsproblemen und verändertem Sozialverhalten berichtet, außerdem konnten Veränderungen im Stoffwechsel, im Immunsystem und in der Entwicklung festgestellt werden. Allerdings gibt es nur wenige aussagekräftige Lang-Zeit-Studien über Effekte subletaler Konzentrationen, die meisten Studien laufen nur über einen kurzen Zeitraum und geben nur Informationen für relativ hohe, meist letale Wirkstoffkonzentrationen. Um negative Auswirkungen der Pestizide auf Bestäuberinsekten insbesondere auf die Honigbiene zu verringern, wird jedes Pestizid zunächst auf diese Wirkungen hin getestet und darf nur mit behördlicher Erlaubnis in festgelegten Konzentrationen eingesetzt werden (BMEL). Auch der Einsatz der sehr umstrittenen systemisch wirkenden Neonicotinoiden ist seit Mai 2013 EU-weit beschränkt worden, da eine schädliche Wirkung auf Honigbienen nicht auszuschließen ist (EFSA (European Food Safety Authority)). Herbizide bringen ein

weiteres Problem mit sich, sie verringern das Nahrungsangebot der bestäubenden Insekten indem sie landwirtschaftlich unerwünschte aber für das natürliche Ökosystem wichtige Wildpflanzen bekämpfen (Potts et al., 2010a).

Bienen können zudem von einer Vielzahl von Krankheitserregern und Parasiten betroffen sein. Nur eine geringe Auswahl soll hier kurz vorgestellt werden. Sehr bekannt und von Imkern gefürchtet ist die, von dem sporenbildendem Bakterium *Paenibacillus larvae* hervorgerufene, Amerikanische Faulbrut, bei der betroffene Larven und Puppen zersetzt werden und absterben. Doch diese Erkrankung tötet nicht nur Einzeltiere, sondern kann zum Zusammenbruch des ganzen Bienenvolkes führen, weshalb die Amerikanische Faulbrut immer wieder großen wirtschaftlichen Schaden anrichtet und als eine schwerwiegende Bedrohung der Bienengesundheit angesehen wird (Ashiralieva und Genersch, 2006; Genersch, 2010a). Aufgrund ihrer hohen Ansteckungsgefahr besteht eine Anzeigepflicht. Bekämpft wird die Amerikanische Faulbrut mit umgehender Abtötung betroffener Völker und extrem umfangreichen Säuberungs- und Hygienemaßnahmen, da die Sporen des Bakteriums eine sehr hohe Widerstandsfähigkeit aufweisen (vgl. Skript Universität Hohenheim; Ashiralieva und Genersch, 2006; Genersch, 2010a). Eine Behandlung mit Antibiotika ist aufgrund der Sporenresistenz und einer möglichen Verunreinigung von Bienenprodukten durch Antibiotikarückständen fragwürdig und in Deutschland und Österreich zudem verboten (siehe BMEL- Leitlinie zur Bekämpfung der Amerikanischen Faulbrut der Bienen in Deutschland, 2013). Weltweit wird die Amerikanische Faulbrut jedoch meist mit dem Einsatz von Antibiotika bekämpft, obwohl dieser wie schon erwähnt mehr als fragwürdig ist.

Auch die Europäische Faulbrut ist eine schwerwiegende bakterielle Erkrankung, bei der die Bienenlarven absterben, allerdings bilden die verantwortlichen Bakterien (*Melissococcus pluton*) keine Sporen wodurch sie weniger gefährlich und besser einzudämmen sind. Deshalb wird die Europäische Faulbrut auch als „gutartige“ Faulbrut bezeichnet und der „böartigen“ Amerikanischen Faulbrut gegenübergestellt (vgl. Skript Universität Hohenheim; Friedrich-Löffler-Institut (FLI): Amtliche Methodensammlung für anzeigepflichtige Tierseuchen, 2009).

Auch Pilzinfektionen bei Bienen sind bekannt, weit verbreitet und durchaus gefährlich ist die Nosemose, die durch die Microsporidien *Nosema apis* oder *Nosema ceranae* hervorgerufen wird. Es handelt sich um eine hochansteckende Durchfallerkrankung adulter Bienen, dessen Symptome und Schweregrad zum Teil abhängig von der geographischen Region sowohl auf dem Individual- als auch auf dem Völkerlevel unterschiedlich ausfallen können und die im schlimmsten Fall zum Zusammenbruch eines Volkes führt (Fries, 2010;

Higes et al., 2008). Im Gegensatz zu *Nosema apis*, dem ursprünglich bei *Apis mellifera* auftretenden Nosema-Parasiten, stammt *Nosema ceranae* eigentlich von der asiatischen Honigbienen *Apis cerana*. Wann und wo die erste Infektion einer europäischen Honigbiene mit *Nosema ceranae* stattfand, ist unbekannt. Doch das erste Mal wurde 2005 von einer Erkrankung durch *Nosema ceranae* in Europa durch Higes et al. und in Taiwan durch Huang et al. berichtet (Higes et al., 2006; Huang et al., 2007; Antunez et al., 2009). Mittlerweile scheint der für *Apis mellifera* neue Parasit den ursprünglichen Nosema-Parasiten *Nosema apis* zu verdrängen (Fries, 2010), was seine fast weltweite Ausbreitung beweist (Higes et al., 2010). Eine durch *Nosema ceranae* hervorgerufene Nosemose könnte für die europäische Honigbiene zudem gefährlicher sein als eine ursprüngliche, weil dadurch, wie Antunez et al. (2009) belegen, das Immunsystem der Bienen geschwächt und für weitere Krankheitserreger zugänglicher wird (Higes et al., 2010). Allgemein konnte in mehreren Untersuchungen gezeigt werden, dass eine Nosemose verstärkt bei pestizidbelasteten Bienenvölkern auftritt (Alaux et al., 2010; Vidau et al., 2011; Pettis et al., 2012). Als Behandlung käme zwar generell das Antibiotikum Fumagillin in Frage, da es gegen beide Nosema-Arten wirkt, doch die EU verbietet dessen Einsatz aus den schon zuvor angesprochenen Gründen (Higes et al., 2010).

Eine besonders bedeutende Bienenkrankheit, da schwerwiegend und schlecht eindämmbar, ist der Befall von *Varroa destructor*, die sog. Varroose. Diese ectoparasitisch lebende Milbe befällt sowohl adulte Bienen als auch deren Larvenstadien. Der ursprüngliche Wirt der *Varroa destructor* ist die asiatische Honigbiene *Apis cerana*. Wirt als auch Parasit haben sich gekoppelt aneinander evolutiv weiterentwickelt, so dass Befall und Abwehr im Gleichgewicht stehen. Durch die menschlich herbeigeführte Verbreitung der europäischen Honigbiene (*Apis mellifera*), auch in Gebieten, in denen *Apis cerana* beheimatet ist, konnte *Varroa destructor* auch *Apis mellifera* befallen. Die europäische Honigbiene ist allerdings evolutiv nicht an die Varroamilbe angepasst, was die Varroose für *Apis mellifera* besonders gefährlich macht (Rosenkranz et al., 2010).

Die Varroose bringt direkte und indirekte Schädigungen mit sich, die einzelne Bienen sowie das ganze Bienenvolk gefährden. Da die Milben von der Hämolymphe der Wirtstiere leben, werden diese direkt geschwächt, was sich in einem geringeren Körpergewicht, erniedrigter Lebenserwartung und verringerter Lernleistung widerspiegelt (Genersch, 2010b). Die verringerte Lebensspanne der Bienen kann, insbesondere wenn eigentlich langlebige Winterbienen betroffen sind, zum Zusammenbruch der Kolonie im Winter führen (Van Dooremalen et al., 2012). Außerdem wurde festgestellt, dass befallene Bienen ein

geschädigtes Immunsystem besitzen, weshalb sie anfälliger für weitere Erkrankungen sind (Yang und Cox-Foster, 2005; Genersch, 2010b).

Aber nicht nur diese direkten Schädigungen machen die Varroose zu einer so schwerwiegenden Erkrankung, vielmehr sind Varroamilben Überträger sehr gefährlicher bienenschädlicher Viren, wie z.B. das Kashmir Bienen Virus (KBV), das Sackbrut Virus (SBV), das Akute Bienen Paralyse Virus (ABPV), das Israelische Akute Paralyse Virus (IAPV) und das Deformed Wing Virus (DWV) (siehe Rosenkranz et al., 2010, Neumann et al., 2012; Francis et al., 2013). Diese Faktoren und die mittlerweile mit Ausnahme von Australien weltweite Ausbreitung machen die Varroose zu einer der schwerwiegendsten Erkrankungen der Honigbiene (Genersch, 2010b; Rosenkranz et al., 2010; Meixner, 2010). Sie wird teilweise auch als Hauptursache für die rückläufigen Bienenvölkerzahlen in Teilen Europas und den USA gesehen (Dainat et al., 2012). Es ist jedoch davon auszugehen, dass nicht eine einzelne Krankheit für das Bienensterben verantwortlich ist, sondern dass es sich um eine multifaktorielle Belastung handelt (vgl. Potts et al., 2010a; Le Conte et al., 2010; Vanbergen et al., 2013), die durch *Varroa destructor* allerdings stark begünstigt wird.

Zur Bekämpfung und Prävention einer Varroose werden verschiedene chemische, biotechnologische und biologische Methoden eingesetzt, wobei bislang keine dieser Behandlungen wirklich effektiv, bienenschonend und anwenderfreundlich ist (Rosenkranz et al., 2010). Auch in der Bienenzucht wird neben der Friedfertigkeit und der Produktionsleistung die Varroseresistenz, zum Beispiel durch angezüchtetes verstärktes Putzverhalten, als Zuchtziel verfolgt. Jedoch ist, trotz existierender Zuchtprogramme laut Rosenkranz (Skript Universität Hohenheim) kein Erfolg in kurzer Zeit zu erwarten. In diesem Zusammenhang untersuchten Guzman-Novoa und seine Kollegen (2012) die Ausprägung des Putzverhaltens, die Schwere der Milbeninfektion und deren Abwehr in Bienenvölkern verschiedener Genotypen. Sie konnten zeigen, dass milbenresistente Völker ein verstärktes Putzen aufwiesen und ein ausgeprägtes und intensiv durchgeführtes Putzverhalten ein wichtiger Bestandteil der Milbenresistenz mancher Genotypen darstellt.

1.2.2. Ansätze zur Sicherung des Bienenbestandes

Die hohen Verluste an Honigbienenvölkern und die Abnahme mancher Wildbienenarten in einigen Ländern haben zu einem wachsenden Interesse in Regierungen und Bevölkerung gesorgt. Es wurden Netzwerke geschlossen und Projekte ins Leben gerufen um erstens den Rückgang der Honigbienenvölkerzahlen (deutsches Bienenmonitoring; sowie der qualitativen und quantitativen Wildbienenverbreitung (Bsp. ALARM (Assessing LARGE scale

Risks for biodiversity with tested Methods)-Projekt; EPILOBEE) in verschiedenen Ländern bzw. Regionen zu untersuchen. Ein anderes Projekt, das sogenannte STEP (Status and Trends of European Pollinators) -Projekt der EU beschäftigt sich mit den Auswirkungen des Wildbienenrückgangs auf die Landwirtschaft, die Biodiversität und die Gesellschaft, um die Konsequenzen der Bienenverluste besser einschätzen zu können. Neben dieser Erfassung und Beobachtung gibt es verschiedene Ansätze, sowohl zur Artensicherung von Wildbienen als auch zur Stabilisierung der Honigbienen-Völkerzahlen. Auf nationaler, so zum Beispiel in der sogenannten Bienenschutzverordnung (siehe: http://www.gesetze-im-internet.de/cgi-bin/htsearch?config=Gesamt_bmjhome2005&method=and&words=bienenschutzverordnung&susuc=Suchen), als auch internationaler Ebene wurden Gesetze zum Schutz von Bienen verabschiedet, in denen z.B. der Gebrauch von bienenschädlichen Pestiziden eingeschränkt bzw. verboten wird (vgl. http://ec.europa.eu/food/animals/live_animals/bees/pesticides/index_en.html). Außerdem soll durch Bepflanzungen an Straßen- und Ackerrändern das Nahrungsangebot für Bestäuberinsekten vergrößert werden. Auch die Bevölkerung wird vermehrt für den Bienenschutz sensibilisiert und soll durch den Anbau Bienen- bzw. Bestäuberinsektenfreundlicher Pflanzen im Garten auf dem Balkon oder der Terrasse für ein besseres Nahrungsangebot der Tiere sorgen (z.B. Bienen-App und Initiative „Bienen füttern“ des BMEL; Netzwerk Blühende Landschaft; uvm.). Das öffentliche Interesse ist so weit gestiegen, dass sogar bekannte Discounterketten „Nistkästen“ für Wildbienen zum Verkauf anbieten.

In der Bienenzucht wird durch Kreuzungen versucht, vitalere Bienenvölker zu entwickeln, wobei eine erhöhte Varroaresistenz besonders verfolgt wird. Jedoch sind Zuchterfolge nur langsam erreichbar, da die Prüfung der Eigenschaften eines Bienenstocks erst nach voller Entwicklung des Volkes geschehen kann und meist über ein Jahr lang verfolgt werden muss, um aussagekräftige Resultate zu erhalten. Ein weiteres Problem ist, dass Spermata aus leistungsgeprüften Völkern nicht für längere Zeit gelagert werden kann. Eine Methode zur Langzeitlagerung von Bienensperma würde deshalb einen enormen wirtschaftlichen und züchterischen Fortschritt bedeuten.

Auch in der Forschung beschäftigt man sich seit einigen Jahren mit den Problemen des Bienensterbens. Mehrere Instituts-Zusammenschlüsse und Projekte untersuchen verschiedene Aspekte einzelner Bienenkrankheiten und Umwelteinflüsse, sowie Zusammenhänge und mögliche Gegenmaßnahmen (Bsp. BeeDoc (Bees in Europe and the Decline of Honey Bee Colonies); COLOSS (Honey Bee research Association)).

Es werden die Auswirkungen subletaler Pestizidkonzentrationen ermittelt (Desneux et al., 2007), der Zusammenhang verschiedener Stressfaktoren aufgespürt und nach möglichen

Gegenmaßnahmen gesucht. Darüber hinaus werden Methoden, die Biodiversität der Bienen durch die Konservierung genetischen Materials insbesondere von Spermatozoen zu sichern, gesucht. Wenn es möglich wird Bienenspermien für längere Zeit zu konservieren, ohne dass ihre Befruchtungsfähigkeit beeinträchtigt ist, dann können verschiedene Bienenarten mitsamt ihrer Eigenschaften und Besonderheiten gesichert werden und in der Zukunft, wenn sie benötigt werden, zum Einsatz kommen. Wir leben in einer Zeit klimatischer Veränderungen, in Zukunft ist es vielleicht nötig, dass wir Bienen mit einer besonderen Hitze- und Trockenresistenz züchten, eine Eigenschaft, die vielleicht eine momentan aussterbende Bienenrasse in sich trägt und nur durch die Konservierung der Spermatozoen für uns zugänglich bleibt. Die von der europäischen Tierzuchtindustrie getragene Initiative FABRE-TP (Farm Animal Breeding and Reproduction Technology Platform) nennt deshalb in einem Expertenbericht die Entwicklung von Methoden zur Lagerung von Bienensperma als einen wünschenswerten Forschungsschwerpunkt für die kommenden fünf Jahre. Da Seuchenhygiene-Bestimmungen den Export von Zuchtköniginnen behindern, um die Ausbreitung von Krankheitserregern zu verhindern, besteht deshalb international sehr großes Interesse an handelbarem Drohnensperma, gerade aus Deutschland. Lagerfähiges Sperma böte eine sicherere Alternative zum Handel mit lebenden Tieren (keine Einschleppung von Milben und Insekten, erleichterter Nachweis mikrobieller Erreger). So könnte das Potenzial der deutschen Bienenzucht auch international valorisiert werden (vgl. 1.4.1).

1.3. Kryokonservierung

1.3.1. Allgemeines zur Kryokonservierung

Die Konservierung biologischen Materials mit Hilfe extrem niedriger Temperaturen, auch Kryokonservierung genannt, findet in der Medizin, den Naturwissenschaften, der Tierzucht und Arterhaltung eine weit verbreitete Anwendung. Sie stellt die einzige Möglichkeit dar, biologisches Material, wie z.B. Spermien, Eizellen, Gewebeproben und sogar ganze Organe, für sehr lange Zeit zu lagern, ohne dass diese ihre Vitalität und Funktionalität einbüßen. Das ist möglich, da bei sehr niedrigen Temperaturen, z.B. in flüssigem Stickstoff (N_2) bei -196°C keine biochemischen Reaktionen stattfinden (Wolfe und Bryant, 2001). Nur ständig vorhandene ionisierende Strahlungen (kosmische Strahlung, UV-Strahlung) können das biologische Material über photophysikalische Vorgänge schädigen. Allerdings würde diese Strahlung nach einer Berechnung Mazurs (1980/1984) erst nach 2000-4000 Jahren letal

wirken. Eine Konservierung biologischen Materials ist also für menschenrelevante Dauer unproblematisch.

Die intensive Erforschung und Nutzung der Kryokonservierung von Sperma begann 1949 durch C. Polge, A.U. Smith, und A.S. Parkes. Polge entdeckte zufällig durch vertauschte Etiketten die kryoprotektive Wirkung von Glycerol auf Geflügelspermien (Johnson, 2008). Nachfolgende umfangreiche Untersuchungen haben viele unterschiedlich erfolgreiche Protokolle zur Kryokonservierung verschiedener Zell- und Gewebstypen hervorgebracht und die Tierzucht mancher Nutztiere revolutioniert. So stützt sich die Rinderzucht großen teils auf die künstliche Besamung mit kryokonserviertem Bullensperma (Leibo und Pool, 2011). Die Vorteile sind weitreichend, die Züchter können aus einem großen Angebot an Zuchtbullen die für ihre Zucht passenden Spermaspender aussuchen und müssen nicht nur auf die eigenen Tiere zurückgreifen. Da die Proben über Jahre gelagert werden können, ist es möglich, bestimmte Eigenschaften über einen längeren Zeitraum und gezielter in die Zucht einzubringen. Genetisches Material von bewährten Zuchttieren, die an besondere Umweltgegebenheiten angepasst sind, kann gelagert werden und zum Einsatz kommen, wenn es benötigt wird. Dadurch kann schnell auf wechselnde Umweltbedingungen reagiert und eine optimale Produktion in der Landwirtschaft erreicht werden.

Auch bei der langfristigen Sicherung genetischen Materials zur Erhaltung bedrohter Pflanzen- und Tierarten bedient man sich der Kryokonservierung, als Beispiel ist hier die sogenannte Cryo-Brehm Kryobank oder das „Frozen Ark“- Projekt zu nennen, in der Stammzellen und Gewebeproben von Wildtieren gelagert werden (siehe <http://cryo-brehm.de/index.php?task=Startseite> und Clarke, 2009). Zwar existieren mehr Kryobanken für die Samenzellen seltener Haus- und Nutzierrassen (Barbas und Mascarenhas, 2009), doch das Interesse genetisches Material vom Aussterben bedrohter Wildtierarten zu konservieren steigt stetig und wird zunehmend diskutiert (Lermen et al., 2009). Es wird darin eine Möglichkeit gesehen die Biodiversität, die laut Wildt et al. (1997) für eine gesunde Erde wichtig und für das gesellschaftliche Leben wertvoll ist, für die Zukunft zu erhalten (Wildt, 2000).

Auch in der Medizin und Forschung spielt die Kryokonservierung eine wichtige Rolle, ermöglicht sie doch die Lagerung und zeitlich fast unbegrenzte Bereitstellung von biologischen Materialien, wie humane Versuchszellen, Gewebeteilen oder Genmaterial transgener Tiere.

Auch in der humanen Reproduktionsmedizin ist die Kryokonservierung nicht mehr wegzudenken. Das erste mit kryokonserviertem Sperma erzeugte Kind kam 1953 in England zur Welt (Jouannet, 2009; Sharma, 2011). Die Verwendung von kryokonservierten humanen

Spermienzellen ist mittlerweile weltweit gebräuchlich, allerdings wird der Einsatz von Kryospermien und Techniken der Reproduktionsmedizin allgemein in verschiedenen Ländern rechtlich unterschiedlich gehandhabt (Blyth und Landau, 2004; Blyth und Farrant, 2005). Seit 1972 existieren viele sogenannte Kryobanken, in denen humane Spermaproben für eine spätere künstliche Besamung oder *in vitro* Fertilisation gelagert werden können (Sharma, 2011).

Trotz großer Fortschritte in der Kryobiologie gelingt es nach wie vor nicht, alle Zell- und Gewebstypen einzufrieren, ohne dass diese ihre Vitalität und Funktion verlieren. Zum Beispiel existieren zwar etablierte Protokolle für eine standardmäßig erfolgreiche Kryokonservierung von humanen Spermienzellen, doch die schadensfreie Überführung und Lagerung von menschlichen Eizellen bei Tiefsttemperaturen stellt sich nach wie vor als schwierig dar und konnte noch nicht zufriedenstellend erarbeitet werden (Borini et al., 2006; Ambrosini et al., 2006). Auch in der Schweinezucht wird meist nur gekühltes statt kryokonserviertes Schweinesperma verwendet, weil eine erfolgreiche Kryokonservierung von Schweinespermien noch nicht in dem für kommerzielle Zwecke erforderlichen Maße gelungen ist (Medeiros et al., 2002; Barbas und Mascarenhas, 2009; Garcia et al., 2010; Rodriguez-Martinez und Wallgren, 2011). Kryoprotokolle lassen sich eben nicht einfach von einem Zelltyp oder bestimmten Zellen einer Spezies auf andere Zelltypen oder andere Spezies übertragen, sondern müssen individuell empirisch erarbeitet werden (Petrunkina, 2007; Barbas und Mascarenhas, 2009).

Also müsste für jede relevante Zellsorte und die Zellsorte jeder zu konservierenden Spezies ein eigenes Kryoprotokoll entwickelt werden, um Kryoschäden zu verhindern oder zu minimieren. Die Kosten für ein solches Vorhaben sind immens. Die Forschung beschäftigt sich aber nicht nur mit der Kryokonservierung verschiedener Zelltypen, sondern hat auch großes Interesse an der langfristigen Organkonservierung. Das Lagern von gespendeten und neu gezüchteten Organen und Geweben, ohne dass diese ihre Funktionalität und/oder Lebensdauer einbüßen, würde einen wichtigen Fortschritt in der Medizin darstellen (Fahy et al., 2009). Durch das Anlegen von Organ- und Gewebebanken könnten Organtransplantationen besser vorbereitet werden und es wären dabei weder zeitliche noch räumliche vorhanden. Organe und Gewebe, für die zunächst kein passender Empfänger gefunden wird, könnten für eine spätere Verwendung gelagert werden, auf diese Weise würde das bestehende Organdefizit langsam abgemildert werden (Leuvenink, 2015). Auch für das in Zukunft immer wichtiger werdende sogenannte Tissue Engineering der Regenerationsmedizin spielt die Möglichkeit der langfristigen Lagerung und des

unproblematischen Transportes von Geweben und Organen ohne zeitliche und räumliche Restriktionen eine Schlüsselrolle (Karlsson und Toner, 1996; Fahy et al., 2006).

Eine weitere mögliche Anwendung der Kryokonservierung ist die Lagerung von Geschlechtszellen bzw. ganzen Geschlechtsorganen, wie z.B. den Eierstöcken, während einer Chemo- und/oder Strahlentherapie, um diese Zellen zu schützen. Nach abgeschlossener und erfolgreicher Therapie könnten die konservierten Zellen oder Organe zurücktransplantiert werden. Die Patienten hätten somit auch nach erfolgter Chemo- und/oder Strahlentherapie die Chance ihren Kinderwunsch zu erfüllen (The Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine, 2004; Donnez et al., 2006; Jeruss und Woodruff, 2009).

Allerdings ist eine Kryokonservierung ganzer Organe kompliziert und war bislang nur sehr selten und bedingt erfolgreich. A.U. Smith gelang es in den 50er Jahren beispielsweise Hamsterherzen auf -20°C abzukühlen und nach Auftauen einen rhythmischen Herzschlag zu erhalten (Smith, 1961). Smith verwendete als Kryoprotektivum, wie zu dieser Zeit üblich, Glycerol. Es gibt viele weitere Versuche verschiedener Forschungsgruppen, doch die Kryokonservierung mit anschließendem Auftauen und Transplantation von ganzen Organen, die unmittelbar von einer funktionierenden vaskulären Versorgung angewiesen sind, ohne Verlust oder Verminderung von Funktion und Vitalität gelingt bislang nur selten (Fahy, 2004a).

Die Grundlagen der Kryokonservierung, die dabei auftretenden Probleme, sowie unterschiedliche Methodenansätze sollen im Folgenden betrachtet werden.

1.3.2. Kryoschäden

Während der Kryokonservierung biologischen Materials kommt es zu komplexen chemischen und physikalischen Veränderungen, die schwerwiegende Zellschäden und den Zelltod nach sich ziehen können. Einfaches Einfrieren oder Überführen in N_2L von ungeschützten Zellen führt fast immer zum Verlust der Funktionsfähigkeit und Vitalität. Dabei ist zu beachten, dass nicht die Lagerung bei extrem niedrigen Temperaturen, wie z.B. -196°C , der kritische Vorgang ist, weil bei diesen Temperaturen praktisch keine thermodynamischen Reaktionen stattfinden und die Probe im zuvor erreichten Zustand (kristallin oder glasartig) verbleibt. Vielmehr kommt es während der Abkühlungsphase im Bereich von 0° bis -40°C (bzw. -60°C bei Mazur 1984) und des Auftauprozesses zu den Schädigungen (Wolfe und Bryant, 2001; Parks und Graham, 1992; Gao und Critser, 2000; Özkavukcu und Erdemli, 2002).

Weitgehend anerkannt und oft beschrieben sind vor allem zwei Arten von Zellschäden, die auch in der allgemein akzeptierten Zwei-Faktoren Hypothese von Mazur, Leibo und Chu (Chu, 1972) beschrieben werden (Morris et al., 2012; Gao und Critser, 2000; Pegg, 2002; Petrunkina, 2007). Diese Schadensarten können in direkte und indirekte Kryoschäden unterteilt werden. Beide Schadenstypen sind auf die Entstehung und Ausbreitung von Eis zurückzuführen. Direkte Schäden entstehen, wenn Eiskristalle direkt physikalischen Schaden hervorrufen. Extrazelluläre Eiskristalle können, wenn nur noch sehr wenig flüssiges Volumen vorhanden ist, die Plasmamembran der Zellen durchstoßen und/oder die Zellen immer weiter einengen. Vor allem ist aber intrazelluläres Eis unbedingt zu verhindern, weil es durch die Zerstörung von Membranen und der intrazellulären Ultrastruktur zwangsläufig zum Tod führt (Medeiros et al., 2002; Gao und Critser, 2000; Pegg, 2002).

Dem gegenüber stehen die indirekten Kryoschäden. Sie werden auch Lösungsschäden genannt und entstehen durch die Konzentrierung gelöster Stoffe bei zunehmender Eisbildung. Da Eis aus reinem Wasser besteht und durch die Eisbildung das Wasser in flüssiger Phase abnimmt, werden darin gelöste Salze und andere Stoffe aufkonzentriert.

Bei niedrigen Abkühlraten bildet sich zunächst im extrazellulären Medium Eis, dadurch entsteht ein osmotischer Gradient zwischen dem extra- und intrazellulären Raum, der von der Zelle durch Wasserabgabe verringert wird. Bei zunehmender Eiskristallbildung nimmt die Konzentration gelöster Stoffe weiter zu und die Zelle dehydriert zunehmend, was auch eine Aufkonzentrierung der gelösten Stoffe im intrazellulären Raum und eine Zellschrumpfung mit sich bringt. Dieser osmotische Stress kann zu verschiedenen reversiblen und irreversiblen Schäden, sowie dem Zelltod führen. Zum Beispiel kann diese starke Dehydrierung einen Phasenübergang der Membranlipide von der flüssigen Phase zur Gelphase bewirken, was die Funktion der Membran einschränkt. Außerdem kann die starke Dehydrierung Protein-Protein Interaktionen begünstigen, die wiederum zur Denaturierung der Proteine führen können (Medeiros et al., 2002; Wolkers et al., 2002).

Es gibt verschiedene Theorien für die genauen Vorgänge der Zellschädigung (Gao und Critser, 2000), so führt Meryman (1974) einen Gradienten des hydrostatischen Drucks über die Plasmamembran der Zelle als Ursache für Zellschäden an. In seiner Theorie führt die Zellschrumpfung zu einer Kompression des verbleibenden Zellinhaltes, dieser Druck verringert zunehmend eine weitere Schrumpfung, die durch weiteren Wasserverlust stattfinden müsste. Steponkus und Wiest (1979) hingegen beschreiben die durch Dehydrierung bedingten irreversiblen Membranverschmelzungen, die einen Verlust der normalen Zelloberfläche und die vorzeitige Zellyse bei Rückführung zu isoosmotischen Bedingungen bewirken.

Alle diese Vorgänge können die Vitalität und Funktion des konservierten biologischen Materials stark verringern und zum Zelltod führen. Doch nicht nur der Einfrierprozess ist kritisch, die Auftauvorgänge sind genauso gefährlich (Leibo und Pool, 2011). Kommt es z.B. während der Erwärmung zur sogenannten Rekristallisation (Meryman, 2007; Pegg, 2007), also zur Eiskristallbildung und -wachstum, so können auch diese direkten Kryoschäden tödlich für die Zelle sein (Holt, 2000a). Außerdem kann auch der Auftau- und Erwärmungsprozesses starken osmotischen Stress auslösen (Petrunkina, 2007). Die Auftau- und Erwärmungsgeschwindigkeit muss für ein optimiertes Kryoprotokoll an die Einfrierprozedur angepasst sein und wird dementsprechend in Kryokonservierungsprotokollen für verschiedene Zellarten und/oder Spezies berücksichtigt (Bsp. Hochi et al., 1996; Purdy, 2006; Eriksson und Rodriguez-Martinez, 2000).

Eine weitere Art von Kryoschäden kann auftreten, wenn der Probe Kryoprotektiva (CPA = Cryoprotective Agent), zugesetzt werden. Diese Schutzstoffe verhindern oder vermindern die oben genannten Zellschäden, besitzen jedoch häufig selbst eine konzentrations – und/oder temperaturabhängige toxische Wirkung (Fahy, 2010). Außerdem kann ihre Zugabe und Entfernung zu starkem osmotischen Stress führen (Meryman, 2007). Ihre Zusammensetzung, Schutzmechanismen und Toxizität von CPAs wird in Kapitel 1.3.4. näher betrachtet.

Neben den schon erwähnten Schadenstypen, kann auch der sogenannte „Kälteschock“, oder DCI (Direct Chilling Injury) bei unphysiologisch niedrigen Temperaturen ein-/auftreten. Dabei handelt es sich um irreversible Schäden, die durch niedrige Temperaturen oberhalb des Gefrierpunktes entstehen (Ghetler et al., 2005). Laut Arav et al., 1996 ist die Plasmamembran besonders durch solche unphysiologischen Bedingungen gefährdet, doch auch die Motilität, der Metabolismus und die Akrosomenmembran sind betroffen (White, 1993; Medeiros et al., 2002). Durch Temperatursenkung nehmen die Lateralebewegung der Membranlipide und damit die Fluidität ab, die Fettsäureketten strecken sich und es kommt zu einem Phasenübergang, von der flüssigen Phase in einen gelartigen Zustand. Da die Transitionstemperatur der verschiedenen Membranlipide unterschiedlich ist, kann es zu einer lateralen Phasenseparation kommen (Arav et al., 1996; Ghetler et al., 2005). Dadurch aggregieren integrale Membranproteine irreversibel zu Clustern (Busch und Waberski, 2007) und es kann zu zirkulären sogenannten II-hexagonal-Strukturen kommen (Quinn, 1985; Parks und Graham, 1992). Diese sonst nur selten und kurzzeitig auftretenden Strukturen führen zu „Ionenlecks“ und können den Zelltod bewirken (Arav and Zvi, 2008; Quinn, 1985).

In diesem Zustand ist die normale Funktion der Plasmamembran nicht mehr gegeben, sie wird permeabel für Substanzen, die sonst nicht oder nur geregelt in die Zelle treten können. Die Schwere der Abkühlungsschäden/DCI ist von der Abkühlrate, Dauer der Temperatureinwirkung und Temperatur selbst abhängig. Auch die Empfindlichkeit verschiedener Zellarten und Spezies, sowie Unterschiede in der Sensibilität zwischen den Individuen einer Spezies gegenüber niedrigeren Temperaturen spielen eine große Rolle (Drobins et al., 1993; Arav et al., 1999). Molekularbiologisch ist die Zusammensetzung der Membran ein wichtiger Faktor, so verringert ein großer Cholesterolanteil und eine hohe Konzentration an mehrfach ungesättigten Fettsäuren die Empfindlichkeit für DCI/ einen Kälteschock (Arav und Zvi, 2008; Ghetler et al., 2005; Drobins et al., 1993). Als besonders empfindlich werden Eberspermien, beschrieben, auch Säugereizellen werden schon bei relativ hohen Temperaturen geschädigt, während Geflügelspermien, Bienenspermien, Kaninchenspermien und humane Spermien recht abkühlungsresistent sind (Parks und Lynch, 1992; Drobins et al., 1993; Arav et al., 2000; Gao und Critser, 2000; Medeiros et al., 2002). Im Falle von Oozyten, vermutet Arav et al., 1996 sogar, dass DCI der limitierende Faktor für eine erfolgreiche Kryokonservierung ist. Schützende Zusätze, wie Eigelb oder manche Zucker können die Kälteschockschäden reduzieren, auch die Erhöhung der Konzentration an ungesättigten Fettsäuren mittels Liposomen kann zu einer verbesserten Kälteresistenz führen (Zeron et al., 2002). Eine weitere Möglichkeit DCIs zu verhindern ist eine extrem hohe Abkühlrate, bei der die kritische Temperatur nur ganz kurz vorliegt. Mazur et al., gelang so die erfolgreiche Kryokonservierung von kryoempfindlichen *Drosophila* Embryonen (Mazur et al., 1992). Diese Strategie konnte auch erfolgreich auf manche Säugereizellen angewendet werden (Martino et al., 1996).

1.3.3. Methoden der Kryokonservierung

Grundsätzlich existieren zwei unterschiedliche Methodenansätze zur Kryokonservierung biologischen Materials. Die zuerst entwickelte und von Pegg (2002) als „klassisch“ bezeichnete Strategie ist das sogenannte „Slow Freezing“ oder nur „Freezing“ (Kuleshova und Lopata, 2002). Es wurden schon für viele Zelltypen, zum Beispiel Spermienzellen verschiedener Nutztierassen, Slow Freezing-Protokolle erstellt, die zum Teil schon Jahre lang standardmäßig eingesetzt werden (Barbas und Mascarenhas, 2009). Im Gegensatz dazu ist die Methode der Vitrifikation noch relativ neu und wird in den letzten Jahren für manche Zelltypen (Oozyten) immer mehr favorisiert (Orief et al., 2005). Gemeinsam haben beide Methoden, dass sie auf den Einsatz von CPAs, jedoch in sehr unterschiedlichen

Konzentrationen, angewiesen sind. Außerdem verfolgen beide Strategien das Ziel einen glasartigen Zustand innerhalb der zu konservierenden Zelle zu erreichen (Kuleshova und Lopata, 2002). Der große Unterschied beider Strategien liegt in der Abkühlrate. Während beim Slow Freezing, wie der Name schon andeutet, relativ langsam abgekühlt wird, um letales intrazelluläres Eis zu verhindern, muss die Abkühlung bei der Vitrifikation extrem schnell geschehen. Im Folgenden werden beide kurz Methoden vorgestellt.

1.3.3.1 *Slow Freezing*

Das Slow Freezing wird auch oft als die klassische oder konventionelle Methode der Kryokonservierung bezeichnet. Bei dieser Methode wird die zu konservierende Probe, z.B. eine Spermiesuspension langsam abgekühlt. Da sowohl im intra- als auch im extrazellulären Medium gelöste Stoffe vorliegen, gefrieren die Flüssigkeiten nicht wie reines Wasser bei 0°C. Bei ca. -5°C hat sich meist noch kein Eis gebildet, die intra- und extrazelluläre Flüssigkeit befinden sich dann in einem unterkühlten Zustand (Gao und Critser, 2000). Als „unterkühlt“ wird eine Flüssigkeit bezeichnet, wenn die Schmelztemperatur bereits unterschritten ist, aber noch keine Nukleation, also Eiskristallbildung, stattgefunden hat. Man unterscheidet spontane und künstliche Nukleation. Die spontane Nukleation wird wiederum in homogene und heterogene Nukleation eingeteilt (Wolfe und Bryant, 2001; Meryman, 2007). Die homogene Nukleation findet statt, wenn durch fallende Temperatur die Bewegung der Wassermoleküle abnimmt und sich diese zu kleinen Eiskristallen zusammenlagern. Diese Kristallisationszentren wachsen langsam an, bis sie eine kritische Größe erreichen, wodurch der feste Aggregatzustand des Wassers begünstigt wird und die Flüssigkeit zunehmend gefriert. Bei der heterogenen Nukleation, die immer vor der homogenen Nukleation eintritt, führen Verunreinigungen in der Lösung, Oberflächenpartikel und/oder exogene Energie zur Bildung von Kristallisationszentren (Morris und Acton, 2013). Will man ein Slow Freezing Protokoll verbessern und/oder standardisieren sollte man dafür sorgen, dass die Nukleation immer bei gleicher, möglichst für die zu konservierende Zellart und Spezies optimierter Temperatur stattfindet (Glasmacher et al., 2011). Es ist sinnvoll den Grad der Unterkühlung gering zu halten, da eine starke Unterkühlung die Bildung intrazellulären Eises wahrscheinlich macht (Petersen et al., 2006). Außerdem, weil durch Minimierung der Unterkühlung die frei werdende Energie, die beim Übergang von flüssigem Wasser in den festen Aggregatzustand in Form von Kristallisationswärme abgegeben wird, verringert wird (Benson, 2008). Findet die Nukleation spontan oder herbeigeführt statt, so wird die Probe

aufgrund der freiwerdenden Kristallisationswärme kurzzeitig auf eine Temperatur um den Gefrierpunkt gebracht (Özkavukcu und Erdemli, 2002). Das hat den gleichen Effekt, wie eine schnelle Abkühlrate und begünstigt somit die Bildung intrazellulären Eises. Außerdem kann der sprunghafte Temperaturanstieg, sowie das plötzliche osmotische Ungleichgewicht die Zellen schädigen (Petersen et al., 2006). Zusätzlich zu diesen Faktoren beeinflusst die Stärke der Unterkühlung auch die Geschwindigkeit des Eiskristallwachstums (Petersen et al., 2006). Das kann man verhindern, wenn man durch künstliche Nukleation, auch Seeding genannt eine künstlich induzierte Kristallisation bei höheren Temperaturen herbeiführt (Morris und Acton, 2013). Man kann z.B. durch Zugabe von sogenannten Nukleatoren die heterogene Nukleation begünstigen und so den Grad der Unterkühlung verringern. Eine weitere und genauere Möglichkeit des Seedings ist die kurze Berührung des äußeren Mediums mit einer stark unterkühlten Pinzettenspitze (Özkavukcu und Erdemli, 2002; Petersen et al., 2006), oder man sorgt für eine kurzzeitige Vibration der Probe. Das Seeding wird bei den konventionellen Slow Freezing Protokollen häufig bei Temperaturen von -6°C / -7°C durchgeführt (Shaw und Jones, 2003).

Da das Zytoplasma einer Zelle sowohl mehr gelöste Stoffe als auch Makromoleküle, wie Proteine oder Reservestoffe aber keine Eisnukleatoren enthält, kommt es im Allgemeinen zuerst im extrazellulären Medium zur Eiskristallbildung (Meryman, 2007). Auch die Plasmamembran spielt eine wichtige Rolle bei der Unterkühlung der Zelle, denn ihre Beschaffenheit wirkt oft inhibierend auf den Nukleationsvorgang. Da Eis aus reinem Wasser besteht, werden die gelösten Stoffe in der restlichen flüssigen Phase aufkonzentriert und das chemische Potenzial des Wassers sinkt. Es entsteht ein osmotischer Gradient, den die Zelle durch Wasserabgabe an den extrazellulären Raum auszugleichen versucht. Durch die Dehydrierung schrumpft die Zelle und alle intrazellulär gelösten Stoffe werden nun aufkonzentriert, wodurch die Gefriertemperatur weiter herabgesenkt und intrazelluläres Eis verhindert wird. Es ist sehr wichtig in dieser Phase der Abkühlung nur langsam die Temperatur zu senken, damit die Dehydrierung von statten gehen kann, und es nicht zur intrazellulären Eisbildung kommt (siehe Abb. 8). Allerdings erfährt die Zelle mit fortschreitender Dehydrierung einen immensen osmotischen Stress, der zu den bereits beschriebenen Lösungseffekten führen und die Zelle damit schädigen kann. Sehr langsame Abkühlung führt über extreme Dehydrierung und Schrumpfung zu irreversiblen Schäden unter anderem an Membranen und Proteinen. Oft tritt der Zelltod ein, wenn nicht sofort bei Abkühlung, dann häufig beim späteren Auftau- und Erwärmungsprozess. Schnellere Abkühlraten mildern die Dehydrierung der Zelle, aber begünstigen gleichzeitig die Bildung intrazellulären Eises. Diese Vorgänge werden in der Kryobiologie weitgehend als die Zwei-

Faktoren Hypothese von Mazur et al. (siehe Chu, 1972) anerkannt und häufig beschrieben (siehe z.B. Mazur, 1980; Özkavukcu und Erdemli, 2002; Pegg, 2007; Benson, 2008; Gao und Critser, 2000).

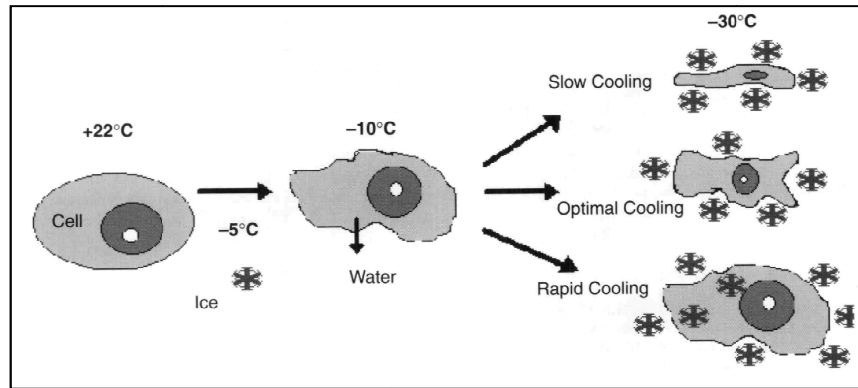


Abb.8: Schematische Darstellung der Vorgänge, die abhängig von der Abkühlrate während des Einfrierens mit einer Zelle geschehen können. Gezeigt wird eine Zelle vor und während des Einfrierens mit verschiedenen Abkühlraten. Bei langsamer Temperaturreduzierung (oben) wird die Zelle sehr stark dehydriert und ist dementsprechend geschrumpft. Intrazelluläres Eis ist nicht zu finden, jedoch wird die Zelle durch Lösungseffekte geschädigt. Mit optimaler Abkühlrate (Mitte) ist die Zelle weniger dehydriert und geschrumpft, trotzdem wird nur extrazelluläres Eis gebildet. Bei schneller Temperaturabnahme (unten) wird die Zelle nur leicht dehydriert und intrazelluläres Eis kann sich bilden.

Nach Gao und Critser, 2000

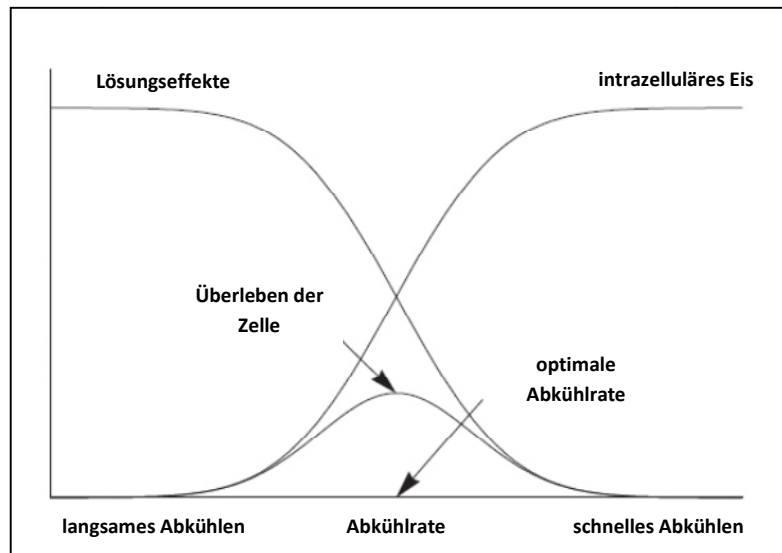


Abb.9: Graphische Darstellung des Zusammenhangs zwischen Abkühlgeschwindigkeit und Stärke der Zellschäden durch Lösungseffekte und Eisbildung. Die Kurve, die die Überlebensrate der einzufrierenden Zelle zeigt und sich aus den anderen Parametern ergibt beschreibt ein langgezogenes und umgedrehtes „U“.

Nach Muldrew et al., 2004

Die Theorie stellt auch eine erfolgreiche Kryokonservierung durch empirische Ermittlung der perfekten Abkühl- und Auftaurate in Aussicht. Stellt man das Verhältnis von Abkühlrate und Überlebensrate graphisch dar (siehe Abb. 9), so beschreibt dieses Verhältnis ein umgekehrtes und langgezogenes U. Sowohl sehr langsame, als auch sehr schnelle Abkühlraten führen über verschiedene Schadenstypen zum Zelltod. Die optimale Abkühlrate ist jedoch nicht für jede Zellsorte oder Zellen jeder Spezies gleich, vielmehr hängt sie von mehreren Faktoren ab. Zum einen spielt das Oberflächen-Volumen-Verhältnis eine große Rolle (Mazur, 1980; Özkavukcu und Erdemli, 2002). Zellen mit großem Volumen und dazu kleiner Oberfläche benötigen mehr Zeit zum Dehydrieren, die Abkühlrate muss dementsprechend niedrig gehalten werden. Kleine Zellen, deren Oberfläche im Verhältnis zum Volumen größer ist, dehydrieren dagegen schneller und können so auch schnellere Abkühlrate akzeptieren. Ein weiterer Faktor, der die optimale Abkühl- und Auftaurate beeinflusst, ist die Beschaffenheit der Plasmamembran der zu konservierenden Zellen. Besonders wichtig ist dabei die temperaturabhängige Permeabilitätskonstante für Wasser (Gao und Critser, 2000), sie gibt an, wie schnell Wasser bei einer bestimmten Temperatur aus der Zelle treten kann. Mazur (1977) konnte durch vergleichende Versuche mit Mäuse- und Hamsterzellen mit ungefähr gleichem Oberflächen-Volumen-Verhältnis zeigen, dass Hamsterzellen, die eine höhere Permeabilitätskonstante für Wasser besitzen, schnelleres Abkühlen überleben als Mäusezellen. Aus den Eigenschaften der Zellen ergeben sich sehr unterschiedliche Abkühlungsoptima mit Werten von unter $-1^{\circ}\text{C}/\text{min}$ für Maus-Eizellen und $-1000^{\circ}\text{C}/\text{min}$ für humane Erythrozyten (Mazur, 1980). Obwohl ein geeignetes Slow Freezing-Protokoll für jede Zellsorte und Spezies durch empirische Versuche neu entwickelt bzw. angepasst werden muss, wird diese Methode vielfältig angewendet und erst langsam durch andere Konservierungsstrategien ersetzt.

1.3.3.2 *Vitrifikation*

Bei der Vitrifikation handelt es sich um eine Alternative zum Slow Freezing, bei der die Bildung von Eis sowohl intrazellulär als auch extrazellulär vollkommen unterdrückt wird. Stattdessen wird das flüssige Volumen in einen amorphen glasartigen Zustand überführt, der keine kristalline Struktur aufweist sondern eine so hohe Viskosität besitzt, dass praktisch keine Diffusion möglich ist (Özkavukcu und Erdemli, 2002). Um diesen Zustand zu erreichen, sind meist sehr hohe CPA-Konzentrationen von min. 30% und eine schnelle Abkühlrate notwendig. Diese beiden Faktoren sind umgekehrt proportional zueinander, so ist eine Vitrifizierung laut Meryman (2007) theoretisch auch ohne CPAs möglich, wenn eine

ultraschnelle Abkühlung vorgenommen werden kann (Isachenko, 2003). Meist wird jedoch eine Kombination aus der ohne zusätzlichen Aufwand schnellstmöglichen Abkühlgeschwindigkeit und einer minimal notwendigen CPA-Konzentration gewählt (Orief et al., 2005). Wie beim Slow Freezing auch spielt die Rate der Temperaturerhöhung beim Auftauen eine ebenso wichtige Rolle wie die Einfrierrate (Benson, 2008). Sie wird bei der Vitrifikation meistens recht hoch gewählt um einen direkten Übergang vom vitrifizierten zum flüssigen Zustand zu gewährleisten und eine Eisbildung zu vermeiden. Manchmal wird sogar eine elektromagnetische oder mikrowellenbasierte Erwärmung eingesetzt, z.B. für das Auftauen von Oozyten, bei denen laut Ambrosini et al. (2006) ein auf Wärmeleitung basiertes Auftauen nicht ausreicht.

Weitere Faktoren, die die Durchführung einer Vitrifikation beeinflussen sind das Volumen der Probe und das verwendete Kryogefäß. Beides hat Einfluss auf die Schnelligkeit der Temperaturübertragung in die zu konservierende Probe. Ein geringes Probenvolumen in einem möglichst temperaturleitfähigen Gefäß ist deshalb zu bevorzugen. Oft werden Oozyten und Embryonen sogar mit direktem Kontakt zum flüssigen Stickstoff vitrifiziert.

Generell hat die Vitrifikation dem Slow Freezing gegenüber einige Vorteile zu bieten. Es sind keine teuren programmierbaren Einfriergeräte notwendig (Orief et al., 2005), da das Einfrieren meist über direkte schnelle Überführung in flüssigen Stickstoff geschieht. Neben teurem Equipment wird dabei auch Zeit gespart, denn gängige Slow Freezing-Protokolle zum Beispiel für humane Embryonen können bis zu 5 Stunden dauern (Orief et al., 2005). Ein weiterer Vorteil der Vitrifikation ist, dass keinerlei Eis gebildet wird und somit alle eisbedingten Zellschäden verhindert werden. Auch der kritische Temperaturbereich zwischen +15°C und -5°C wird so schnell durchschritten, dass Kälteschock und damit verbundene Schäden unwahrscheinlich werden. Gerade für die Konservierung besonders kälteempfindlicher Zelltypen ist das von Vorteil (Orief et al., 2005). Die beim Slow Freezing typische Aufkonzentrierung aller gelösten Stoffe und Dehydrierung der Zellen fallen bei einer Vitrifikation ebenfalls weg, weil kein Eis gebildet wird. Dadurch werden osmotisch bedingte Schäden verhindert.

Trotz dieser großen Vorteile konnte sich die Vitrifikation als Kryokonservierungsmethode zunächst nicht etablieren. Ein Hauptproblem, das von Isachenko (2003) sogar als Schlüsselfaktor bezeichnet wird, stellt die Notwendigkeit einer extrem hohen CPA-Konzentration und der meist damit verbundenen chemischen und/oder osmotischen Toxizität dar (Orief et al., 2005). Für eine Vitrifikation von Embryonen werden beispielsweise Kryoprotektiva-Konzentrationen von ca. 4-8mol/l angegeben (Kasai und

Mukaida, 2004) und generell spricht man von einer benötigten Konzentration an permeierendem Kryoprotektivum von min. 30% (Orief et al., 2005; Barbas und Mascarenhas, 2009). Manche Zelltypen, wie z.B. humane Spermien, reagieren besonders empfindlich auf diese hohen Konzentrationen chemischer Schutzstoffe und können deshalb kaum verlustfrei nach gängigen Methoden vitrifiziert werden.

Ein weiterer Grund für die langsame und relativ späte Etablierung dieser Methode, sind die benötigten hohen Abkühl- und Auftauraten. Um die Abkühlrate möglichst hoch zu bekommen, müssen die schon erwähnten Faktoren, wie Probenvolumen und Kryogefäß optimal gewählt sein, außerdem wird z.T. ein großer Aufwand betrieben, um den sogenannten Leidenfrost-Effekt zu minimieren. Dieses Phänomen beschreibt die isolierende Stickstoff-Gasschicht, die sich um die Probe bildet, wenn diese in flüssigen Stickstoff gehalten wird (Arav et al., 2002). Diese Gasschicht isoliert die Probe vom flüssigen Stickstoff und reduziert damit die Abkühlrate. Um diese aber möglichst hoch zu halten und den Leidenfrost-Effekt zu verhindern, kann man mit im Vakuum unterkühlten flüssigen Stickstoff arbeiten, dieser hat dann eine Temperatur von bis zu -210°C (Orief et al., 2005). Oder man führt eine sogenannte Feststoffoberflächen-Vitrifikation durch, bei der die Probe auf einer durch flüssigen Stickstoff vorgekühlten Metallplatte vitrifiziert wird.

Seit der Zeit der ersten erfolgreichen Vitrifikationsversuche an Mäuse-Embryonen in den 80er Jahren (Rall und Fahy, 1985) wurden besonders wärmeleitfähige und anwenderfreundliche Kryogefäße und damit verbundene Vitrifikationsmethoden (siehe Arav, 2014) entwickelt, weniger toxische Vitrifikationslösungen erprobt und verschiedene Techniken des Einfrierens und Auftauens verglichen. Dadurch wurden Vitrifikationsprotokolle erstellt, mit denen verschiedene Zellarten unterschiedlicher Spezies erfolgreich konserviert werden können. Vor allem wird diese Methode jedoch in der Reproduktionsbiologie zur Konservierung von Säugetierzellen und Embryonen genutzt (Kuleshova und Lopata., 2002; Orief et al., 2005). Für die Kryokonservierung von Geweben, Organen und Sperma ist laut Arav et al. (2002) bedingt durch das größere Probenvolumen und der damit verbundenen schlechteren Wärmeleitfähigkeit eine Vitrifikation eher ungeeignet und ein Slow Freezing Protokoll vorzuziehen. Dem widersprechend werden auch für die Kryokonservierung von Geweben, ganze Organe und Spermien vitrifizierende Techniken angewendet, allerdings mit unterschiedlichem Erfolg. Es wurden zum Beispiel schon Kaninchenniere, Arteriensegmente, Hornhäute, Herzklappen und Ovarien mittels Vitrifikation eingefroren (Armitage et al., 2002; Brockbank und Song, 2003; Migishima et al., 2003; Wusteman et al., 2007; Baicu et al., 2008; Fahy et al., 2009; Kagawa et al., 2009).

Benson (2008) sieht sogar gerade in der eisfreien Vitrifikation Vorteile für die Kryokonservierung komplexer Strukturen, weil es schwierig ist für ein Slow Freezing-Protokoll eine Abkühlrate zu finden, die für all im Gewebe enthaltenen Zelltypen optimal ist. Generell wird die Methode der Vitrifikation vermehrt eingesetzt und ist sicherlich ein zukunftsweisender Trend der Kryobiologie.

1.3.4. Kryoprotektiva- Cryoprotective agents (CPAs)

Sowohl für kontrolliert langsames Einfrieren (Slow Freezing) als auch für die Vitrifikation biologischen Materials ist der Einsatz kryoprotektiver Substanzen (CPAs – cryoprotective agents), wenn auch in unterschiedlichen Konzentrationen unerlässlich (Holt et al., 2014). Eine erfolgreiche Kryokonservierung ohne die Zugabe von CPAs kann als äußerst seltene Ausnahme betrachtet werden, wie zum Beispiel die CPA-freie Vitrifizierung humaner Spermien (vgl. Isachenko, 2003). Generell unterscheidet man zwei Gruppen von Kryoprotektiva, die sich bedingt durch ihre Molekülgröße und Ladung unterscheiden, und zwar permeierende und nicht permeierende CPAs (Meryman, 1971).

1.3.4.1 Nicht permeierende CPAs

Nicht permeierende CPAs wirken nur extrazellulär, da sie nicht durch Zellmembranen treten. Sie können verschiedenen Substanzklassen angehören, so wird zum Beispiel manchen Zuckern (Trehalose, Saccharose, Maltose), Aminosäuren (Glutaminsäure, Prolin), Polysacchariden (Dextrane, Ficoll) aber auch manchen Makromolekülen (Polyvinylpyrrolidon-PVP, Polyvinylacetat-PVA) schützende Wirkung während des Einfrierens und Auftauens nachgesagt. Zudem existieren auch biologische Stoffmischungen, wie Eigelb und Milch die aufgrund ihrer schützenden Wirkung Kryolösungen zugesetzt werden (Bergeron und Manjunath, 2006). Eigelb wird schon seit über 60 Jahren und zum Teil bis heute standardmäßig als kryoprotektiver Zusatz vor allem bei der Spermienkonservierung landwirtschaftlicher Nutztiere verwendet (Dunn et al., 1950; Holt et al., 2014). Der genaue Wirkmechanismus, mit dem Eigelb Membranen schützen kann, ist noch weitgehend unbekannt, doch mehrere Untersuchungen deuten darauf hin, dass Low-Density-Lipoproteine (LDL) des Eigelbes zumindest einen Teil der Schutzwirkung hervorrufen (Moussa et al., 2002; Bergeron und Manjunath, 2006; Hu et al, 2011). Doch dieser Zusatz bringt aufgrund seiner biologischen Herkunft durchaus Gefahren und Probleme mit sich, z.B. birgt er eine klare Kontaminationsgefahr (Bousseau et al., 1998;

Bielansky und Vajta, 2009). Außerdem ist die genaue Zusammensetzung nur schwer standardisierbar und die enthaltenen Fremdproteine können zum Beispiel, wenn sie bei der Konservierung von Spermien verwendet wurden eine Immunantwort nach Insemination auslösen (Edwards, 1960). Deshalb ist das Interesse an effektiven Kryolösungen ohne tierische Zusätze groß und es wird vermehrt nach Ersatzstoffen für das Eigelb gesucht (Hinsch et al., 1997; Aires et al., 2002, Bergeron und Manjunath, 2006).

Alle nicht permeierende CPAs führen im Extrazellulärvolumen zu einer konzentrationsabhängigen Dehydrierung der Zellen, was wiederum der Bildung intrazellulären Eises zu Beginn der Abkühlung entgegenwirkt. Durch Erhöhung der Osmolalität im extrazellulären Raum, wird zudem auch in diesem Kompartiment die Eisbildung verringert (Wolfe und Bryant, 2001; Barbas und Mascarenhas, 2009). Die Zugabe nicht permeierender CPAs kann auch die sogenannten Lösungsschäden minimieren, da Salze und andere gelöste Stoffe zu jedem Zeitpunkt der Abkühlung weniger aufkonzentriert vorliegen, als ohne CPA. Die Schutzstoffe verdünnen quasi alle Salze während sie gleichzeitig die Osmolalität erhöhen. Zusätzlich können manche CPAs, insbesondere Kohlenhydrate, biologische Strukturen wie Proteine und Membranen während des Abkühlens und wieder Auftauens stabilisieren (Arakawa et al., 1990; Wolfe und Bryant, 1999; Shaw und Jones, 2003). Diese positive Eigenschaft von Kohlenhydraten wurde schon vielfach untersucht und wird zudem sehr häufig bei Kryokonservierungen genutzt. Pereira und ihre Kollegen (2004) beschreiben drei der gängigsten Hypothesen zum Wirkmechanismus von Zuckern, insbesondere Trehalose. Demnach können Zucker der Wasserersatz-Hypothese entsprechend Wassermoleküle ersetzen und dadurch biologische Strukturen in ihrer nativen Form erhalten, oder sie bilden nach der sogenannten Wassereinschluss-Hypothese einen schützenden Wasserfilm um die biologischen Strukturen, indem sie die restlichen Wassermoleküle nahe der biologischen Strukturen konzentrieren. Die dritte Hypothese sieht die Schutzwirkung durch Zucker in deren großer Glasbildner-Eigenschaft begründet. Nach dieser sogenannten Vitrifikationshypothese begünstigen Zucker die Bildung eines amorphen glasartigen Zustandes und schützen auf diese Weise die native Form der biologischen Strukturen. Welche dieser Mechanismen wirklich stattfinden und in welchem Ausmaß ist bislang noch nicht vollständig geklärt. Allerdings tendiert man mittlerweile vermehrt zu der Ansicht, dass eine Mischung dieser Vorgänge stattfindet (Clegg, 2001; Crowe, 2002; Pereira und Hünenberger, 2006; Crowe, 2014). Aufgrund dieser protektiven Eigenschaften ist die Verwendung von Zuckern, insbesondere Trehalose und Saccharose in der Kryokonservierung weit verbreitet. So finden sich viele Berichte über die Kryokonservierung von Eizellen, Embryonen, Spermien,

humanen Stammzellen und komplexen Geweben, bei denen Zucker als Protektivum erfolgreich eingesetzt wurde (Honadel und Killian, 1988; Woelders et al., 1997; Fabbri et al., 2001; Aisen et al., 2002; Buchanan et al., 2004; Scheinkönig, 2005). Und oft hat sich die Verwendung von Zuckern und/oder anderen nicht permeierenden Kryoprotektiva in gängigen Kryoprotokollen als Standard etabliert (Shaw und Jones, 2003). Doch nur selten reichen nicht membrangängige Schutzstoffe zur Erhaltung der Viabilität während der Konservierung aus (Gao und Critser, 2000). Szein und seine Kollegen (2001) scheinen bei ihren Versuchen zur Kryokonservierung von Mausspermien auf eine Ausnahme gestoßen zu sein. Ihrer Untersuchung nach überlebten die Mausspermien ein Slow Freezing besser, wenn sie nur mit Trehalose, Saccharose oder Raffinose statt mit Glycerin oder DMSO versetzt wurden und waren zudem fruchtbarer. Entgegen dieser Ausnahme sind meist permeierende CPA nötig, um eine erfolgreiche Kryokonservierung zu erzielen. Eine Kombination aus beiden CPA-Klassen wird dagegen recht häufig genutzt, da nicht permeierende CPAs die Wirkung permeierender CPAs verstärken und deren Toxizität verringern können (Gao und Critser, 2000). Der Zusatz an nicht permeierenden CPAs wird auch eingesetzt, um nach dem Auftauen ein zu starkes osmotisch bedingtes Anschwellen der Zellen während der Entfernung der permeierenden CPAs zu verhindern (Woods et al., 2004).

Als Ergänzung sei erwähnt, dass manche der nicht permeierenden Kryokonservierungsstoffe, z.B. Trehalose, Saccharose, Prolin und Glutaminsäure zu den sogenannten kompatiblen Soluten zählt. Die Angehörigen dieser sehr heterogenen Stoffgruppe zeichnen sich durch geringe Molekularmasse, gute Wasserlöslichkeit, elektrische Neutralität (bei physiologischem pH), Polarität und sehr geringe Toxizität aus. Außerdem beeinflussen sie selbst in hohen Konzentrationen nicht den Metabolismus vorhandener Zellen nicht negativ (Höing, 2008). Diese Substanzen werden in extremophilen Organismen als Schutzstoffe gebildet (Lentzen und Schwarz, 2006).

Neben den aufgeführten nicht permeierenden CPAs gehören unter anderem auch Glycerin und die Aminosäurederivate Ectin und Hydroxyectoin zu den kompatiblen Soluten. Ihre Wirkungsweise und geringe Toxizität eröffnet ein breites Anwendungsspektrum in der Kryobiologie, der Kühlung biologischen Materials, in der Medizin (Wirkstoffstabilisierung und in der Dermatologie bis hin zur Kosmetikindustrie (Lentzen und Schwarz, 2006; www.uni-ulm.de/IT/Scripte/biotech_kompatible-solute.pdf; Höing, 2008).

1.3.4.2 Permeierende CPAs

Die zweite Gruppe der CPAs sind die permeierenden Kryoprotektiva. Diese Schutzstoffe besitzen die wichtige Eigenschaft membrangängig zu sein, weshalb sie laut Pegg (2002) effektiver sind. Generell haben permeierende CPAs zwei Schutzwirkungen. Sie erhöhen die Osmolalität intra- und extrazellulär und erniedrigen damit die Gefriertemperatur, das hat zur Folge, dass zu jedem Zeitpunkt des Abkühlens ein geringeres Eisvolumen und eine schwächere Aufkonzentrierung der gelösten Stoffe vorliegen als ohne CPA. Dadurch wird Lösungsschäden und intrazellulärem Eis entgegengewirkt (Benson et al, 2012b). Zudem begünstigen sie, genauso wie nicht permeierende CPAs, eine Vitrifikation (Wolfe und Bryant, 1999), indem sie die zur Glasbildung benötigte Abkühlrate herabsetzen. Wie effektiv ein CPA ist, hängt laut Meryman (1971) von zwei wichtigen Eigenschaften ab, zum einen von der Wasser-Bindungs-Kapazität, welche über die Höhe der für eine Schutzfunktion benötigten Konzentration bestimmt, zum anderen die Stärke der Viskositäts-erhöhung während der Eisbildung und Aufkonzentrierung, denn sie entscheidet über den Zeitpunkt bzw. die Temperatur der Glasbildung.

Neben diesen generellen Auswirkungen haben permeierende CPAs noch weitere ihrer chemischen Struktur entsprechende Effekte (Rowley, 1992), diese sind jedoch nicht vollständig bekannt (Holt, 2000a). Laut Purdy (2006) und Barbas und Mascarenhas (2009) findet bedingt durch die membrangängigen CPAs eine Umlagerung der Membranlipide und -proteine statt, was zu einer verstärkten Membranfluidität, verbesserter Wasserdurchlässigkeit bei niedrigen Temperaturen und damit zu einer verbesserten Überlebensrate nach Auftauen führt. Doch alle permeierenden CPAs bringen auch große Probleme mit sich, denn sie besitzen alle auch eine toxische Wirkung (Wolfe und Bryant, 2001; Shaw und Jones, 2003). Diese kommt besonders zum Tragen, da CPAs für einen effektiven Schutz meist in hohen, multimolaren Konzentrationen eingesetzt werden müssen, insbesondere wenn vitrifiziert werden soll. Generell unterscheidet man die chemische Toxizität von der osmotischen Toxizität eines CPAs. Die chemische Toxizität hängt von den biochemischen Eigenschaften des CPAs, der benötigten Konzentration, der Dauer und Temperatur der Einwirkung, der zu konservierenden Zell- und Gewebsart sowie der Spezies des biologischen Materials ab. Im Vergleich zu manch anderen Substanzen, wie z.B. Salzen, sind CPAs im Grunde relativ unschädlich, doch aufgrund der hohen für die Schutzwirkung benötigten Konzentrationen, und der meist langen Inkubationszeiten und evtl. auch hohen -temperaturen, haben sie eine schädliche Wirkung (Arakawa et al., 1990). Die Toxizität eines CPAs kann in den benötigten Konzentrationen so hoch sein, dass sie als

limitierender Faktor für den Erfolg einer Kryokonservierung angesehen wird (Isachenko, 2003). Fahy (1986) schreibt dazu, dass die schädlichen Wirkungen der Kryoprotektiva fast genauso relevant für die Kryobiologie seien, wie deren Schutzwirkung und sieht eine Notwendigkeit in der Erforschung der schädlichen Effekte, um diesen entgegenwirken zu können. Da aber das Wissen über die toxischen Eigenschaften der CPAs genauso wie über ihre Schutzmechanismen noch unvollständig ist (Fahy et al., 1990; Fuller, 2004), sind Vorhersagen über die ideale CPA-Zusammensetzung und deren Konzentration für bestimmte Zelltypen nur schwer zu treffen. Die Aufgabe das optimale Kryoprotektivum in der optimalen Konzentration für einen bestimmten Zelltyp zu finden geschieht daher meist rein empirisch (Holt, 2000a). Zur Minimierung der Toxizität können jedoch einige Grundregeln verfolgt werden. Zunächst wird versucht, die geringste für die Konservierung benötigte Konzentration eines CPAs einzusetzen. Außerdem kann sich die Verwendung mehrerer CPAs bei gleicher Gesamtkonzentration positiv auswirken (Isachenko, 2003; Arav, 2014). Da auch die Inkubationsdauer und die Inkubationstemperatur eine wichtige Rolle spielen, wird vermehrt versucht die CPAs erst bei niedrigeren Temperaturen zuzusetzen und nur möglichst kurz vor und nach dem Einfrieren in der Probe zu belassen (Wolfe und Bryant, 2001; Pegg, 2002; Fuller, 2004). Doch diese Vorgehensweise führt evtl. wiederum zu Problemen, da mit reduzierter Temperatur auch die Permeation in die Zellen verlangsamt und damit die Schutzwirkung des CPAs verringert werden kann (Fuller, 2004). Neben diesen generellen Strategien zur Toxizitätsverminderung wird nach Substanzen gesucht, die die toxischen Wirkungen von CPAs z.B. von DMSO Substanzen abschwächen (Baxter und Lathe, 1971; Fahy et al., 1990; Fahy 2010). Trotz großer Bemühungen konnten nur Ansätze erarbeitet werden und ein Durchbruch blieb bislang aus (Fahy, 2010).

Anders als die chemische Toxizität sind die osmotisch bedingten Effekte von permeierenden CPAs durchaus bekannt (Fuller, 2004), obwohl sie während einer Kryokonservierung nicht leicht von chemisch bedingten Schäden unterscheidbar sind (Fahy, 1986). Diese Substanzen setzen die zu kryokonservierenden Zellen bei Zugabe und Entfernung zum Teil starkem osmotischem Stress aus, der zu irreversiblen Schäden bis hin zum Zelltod führen kann (Meryman, 2007; Petrunkina, 2007). Das Problem ist, dass CPAs zwar durch Zellmembranen treten können, doch dies deutlich langsamer tun, als Wasser (Pegg, 2002; Fuller, 2004). Deshalb kommt es zunächst zu einer konzentrationsbedingten Dehydrierung der Zellen, wenn das Kryoprotektivum zugesetzt wird. Die Zellen schrumpfen also zunächst und rehydrieren dann mit fortschreitender Permeierung der CPAs. Doch nicht nur die Zugabe der CPAs setzt die Zellen hohen osmotischen Schwankungen aus, auch die Entfernung der Kryoprotektiva kann gravierende osmotische Schäden z.B. durch eine

übermäßige Schwellung hervorrufen (Woods et al., 2004). Um diese osmotischen Schäden zu vermeiden, wurden und werden spezielle Vorgehensweisen zur CPA-Zugabe und -Entfernung untersucht und für die jeweiligen Anforderungen optimiert (Benson et al., 2012b). Zum Beispiel bietet sich eine schrittweise Veränderung der CPA-Konzentration sowohl für die Zugabe als auch für die Entfernung an. Diese Protokolle dürfen neben der osmotischen Toxizität allerdings nicht die chemische außer Acht lassen und die Inkubationszeit zu sehr verlängern (Benson et al., 2012a/b). Eine weitere Möglichkeit, zumindest die Entfernung der Kryoprotektiva schonender zu gestalten, ist die Zugabe eines nicht permeierenden CPAs, dieser kann dann als osmotischer Puffer wirken und einen übermäßigen Einstrom an Wasser bei der Entfernung der membrangängigen Kryoprotektiva verhindern (Pegg, 2002; Shaw und Jones, 2003). Insgesamt stellt die Toxizität der CPAs, sowohl die osmotische als auch die chemische, nach wie vor eine immense Herausforderung für eine erfolgreiche Kryobiologie dar.

Im Folgenden werden nun einige der wichtigsten Kryoprotektiva genauer vorgestellt.

1.3.4.2.1 Glycerin

Als Beginn der modernen Kryobiologie wird häufig die Entdeckung des Glycerins als Kryoprotektivum im Jahre 1949 (Polge et al., 1949) gesehen. Seit dieser Zeit wurden unterschiedliche Zell- und Gewebearten kryokonserviert und eine Vielzahl von Substanzen mit kryoprotektiver Wirkung entdeckt. Dennoch spielt Glycerin nach wie vor eine bedeutende Rolle. Besonders in der Kryokonservierung von Spermien wird Glycerin als Schutzstoff immer noch favorisiert (Holt, 2000; Medeiros et al., 2002). Doch auch in der Konservierung anderer Zell- und Gewebetypen wird Glycerin weiterhin eingesetzt (Fahning und Garcia, 1992; Rowley, 1992; Le Gal und Massip, 1999; Massip, 2001; Scott et al., 2005). Der Grund, warum dieser dreiwertige Zuckeralkohol immer noch so beliebt ist, ist seine relativ geringe Toxizität (Scott et al., 2005). Alle weiteren Eigenschaften des Glycerins sind im Vergleich zu den anderen permeierenden CPAs nicht besonders hervorstechend. So weist Glycerin eine vergleichsweise niedrige Permeabilität auf und begünstigt geringfügiger als andere CPAs die Vitrifikation (Fahy et al., 1987; Agca, 2000; Baudot et al., 2000).

1.3.4.2.2 Ethylenglykol (EG)

Ein weiteres noch recht neues Kryoprotektivum ist das Ethylenglykol (EG). Dieses relativ kleine Molekül wurde zuerst bei Kryokonservierungsversuchen in den späten 70er Jahren an Mäuse- und Rattenembryonen eingesetzt (Miyamoto und Ishibashi, 1977/ 1978). Weitere Untersuchungen unter anderem an Rinderembryonen zeigten, dass EG ein äußerst

effektives und zudem wenig toxisches Kryokonservierungsmittel darstellt (Voelkel und Hu, 1992; Gutierrez et al., 1993; Sommerfeld und Niemann, 1999; Kuwayama, 2007). Obwohl es ein schlechterer Glasbildner ist als z.B. Propylenglykol (PG) oder Dimethylacetamid (DMAA) (Fahy 1987), wird es häufig eingesetzt. So ist EG das wichtigste CPA für die Kryokonservierung von Rinderembryonen, laut Hasler (2003) wurden 79% aller kryokonservierten Rinderembryonen mittels EG eingefroren. Auch in Vitrifikationslösungen für Embryonen ist EG aufgrund seiner guten Membrangängigkeit und geringen Toxizität zum Standard geworden (Massip, 2001; Kasai, 2004; Arav, 2014).

1.3.4.2.3 Dimethylacetamid (DMAA)

Ein weiteres, jedoch deutlich weniger etabliertes Kryoprotektivum ist das Dimethylacetamid (DMAA). Es handelt sich um ein kleines, gut membrangängiges und hydrophiles Molekül, das die Bildung intrazellulären Eises reduzieren und osmotische Schäden über die Förderung der Membranpermeabilität verringern kann (Kim et al., 2011). DMAA wurde vereinzelt schon recht erfolgreich bei der Kryokonservierung von Spermien bestimmter Spezies angewendet, findet bislang allerdings kein breites Anwenderspektrum/keine verbreitete Anwendung. So bewies es zum Beispiel seine kryoprotektive Wirkung bei der Gefrierkonservierung von Zebrafisch-Spermien (Morris et al., 2003) und konnte an Koalaspermien (Zee et al., 2008) und Hahnspermien als effektiver Glycerinersatz eingesetzt werden (Tselutin et al., 1999). Dagegen scheint DMAA generell für die Konservierung von Kaninchenspermien (Iffaldano et al., 2012) und laut Kim und Kollegen (2011) auch für Eberspermien weniger geeignet zu sein. Eine recht neue Untersuchung zur Verwendung von DMAA bei der Kryokonservierung von Schweinespermien einer speziellen Rasse ergab dagegen, dass DMAA alleine oder in Kombination mit Glycerin ein effektives Gefrierschutzmittel darstellt (Pinho et al., 2014). Aus diesen vorgestellten Beispielen geht klar hervor, dass DMAA zwar kein CPA mit breitem Anwendungsspektrum ist, allerdings in Einzelfällen eine effektive Alternative zu Glycerin und DMSO darstellen kann.

1.3.4.2.4 Dimethylsulfoxid (DMSO)

Dimethylsulfoxid – DMSO gehört neben Glycerin zu den bedeutendsten und etabliertesten Kryokonservierungsmitteln (Wolfe und Bryant, 2001). Doch neben dem Gebrauch als Gefrierschutzmittel besitzt DMSO ein extrem breites Anwendungsspektrum, vor allem in der Zellbiologie und Medizin (Yu und Quinn, 1998; Santos et al., 2003). Es hat analgetische und antiphlogistische Wirkung und wird aufgrund seiner Membrangängigkeit in

Sportsalben, auch zum verbesserten perkutanen Wirkstofftransport verwendet. Desweiteren wird es als Radikalfänger, Membranpermeator und als Induktor der Zelldifferenzierung angewendet (Santos et al., 2003). Aufgrund seiner amphiphilen Molekülstruktur löst sich DMSO sowohl in wässrigen als auch in hydrophoben Lösungen und ist selbst ein hervorragendes Lösungsmittel für polare und wenig polare Stoffe.

Die kryoprotektive Wirkung von DMSO wurde in den 50er Jahren von Lovelock und Bishop (1959) entdeckt. In Einfrierversuchen an humanen und Rinder-Erythrozyten, sowie an Rinderspermien verglichen sie die Eigenschaften von Glycerin mit denen von DMSO. Es zeigte sich, dass DMSO eine deutlich höhere Membrangängigkeit aufweist als Glycerin und für die Kryokonservierung roter Blutzellen besser geeignet ist. Für Rinderspermien allerdings war DMSO in der durchgeführten Einfriermethode weniger effektiv als Glycerin. Lovelock und Bishop (1959) erkannten, dass verschiedene Zelltypen unterschiedliche Eigenschaften besitzen können und diese einen immensen Einfluss auf die Anforderungen an das verwendete Kryoprotektivum ausüben, weshalb effektive Alternativen zu Glycerin sinnvoll sind. Seitdem wurde eine Vielzahl an Slow Freezing-Protokollen und Vitrifikationen mit DMSO als CPA durchgeführt (Bsp. Ishimori et al., 1992; Vincente und Garcia-Ximenez, 1994; Kundu et al., 2001; Kasai, 2004; Ware et al., 2005). Von Agca (2000) wurde es sogar als das am häufigsten verwendete CPA für die Kryokonservierung von Fortpflanzungszellen bezeichnet. Und auch in der Weiterentwicklung von Kryomethoden wird immer wieder auf DMSO zurückgegriffen (Iffaldano et al., 2012). Baudot et al. (2000) verglichen die Glasbildungseigenschaften verschiedener zum Teil den CPAs angehörender Substanzen und fanden heraus, dass DMSO im Vergleich zu EG und Glycerin ein relativ guter Glasbildner ist. Deshalb wird es auch häufig in Vitrifikationslösungen eingesetzt. Neben den allgemeinen rein kolligativen Effekten besitzt DMSO auch eine biochemische Wirkung. Es wirkt stabilisierend auf Membranen während des Einfrierens und Auftauens (Anachordoguy et al., 1991; Yu und Quinn, 1998). Doch wie alle CPAs besitzt auch DMSO toxische Eigenschaften, die den erfolgreichen Gebrauch zur Kryokonservierung einschränken. Die Toxizität von DMSO ist relativ stark ausgeprägt und kommt vor allem bei physiologischen Temperaturen zum Tragen. Während es bei niedrigen Temperaturen ($\leq 0^{\circ}\text{C}$) Membranen und Proteine stabilisiert, wirkt es bei höheren Temperaturen destabilisierend auf diese biologischen Strukturen (Arakawa et al., 1990). Man geht davon aus, dass hydrophobe Wechselwirkungen zwischen DMSO und Proteinen bzw. Membranen vor allem bei höheren Temperaturen auftreten und für die destabilisierende Wirkung des DMSOs verantwortlich sind (Arakawa et al., 1990; Anachordoguy et al., 1991). Doch die genauen Mechanismen, die hinter diesem Verhalten stecken sind vielseitig, kompliziert und von mehreren Faktoren

abhängig und wurden trotz einiger Untersuchungen nicht vollends durchschaut (Yu und Quinn, 1998). Um die Toxizität zu verringern, wird DMSO häufig bei unphysiologisch niedrigen Temperaturen zugesetzt. Zudem werden häufig Mischungen aus DMSO und anderen CPAs verwendet, dass reduziert die Konzentration und damit auch Toxizität jedes einzelnen CPAs (Arav, 2014). Diese Taktik wird insbesondere bei Vitrifikationen verfolgt, wenn hohe CPA-Konzentrationen nötig sind.

1.4. Ziel der Arbeit

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es eine Methode zur Kryokonservierung von Bienenspermien zu entwickeln, die eine Lagerung dieser Geschlechtszellen ohne Einbußen in der Fruchtbarkeit gewährleistet. Bislang sind noch keine hinreichend effektiven Gefriermethoden für Bienenspermien bekannt. Die in Kapitel 1.2. beschriebene große ökonomische und ökologische Bedeutung der Honigbiene, sowie die fortschreitende Gefährdung dieser Nutztiere (siehe Kapitel 1.2.1.) verdeutlichen die Notwendigkeit einer effektiven Langzeitkonservierung von Bienenspermien. Außerdem werden einige positive Effekte beschrieben, die eine solche Methode mit sich bringen würde (vgl. 1.2.2.).

1.4.1. Meilenstein I: Entwicklung standardmäßig einsetzbarer Vitalitätstests

In vitro Standardverfahren zur Überprüfung der Spermaqualität im Mikromassstab waren erforderlich, um aussagekräftig Information in kurzer Zeit zu erhalten. Nur ca. 1µl Ejakulat pro Drohn werden gewonnen, d.h., die Labortests müssen mit sehr geringen Probenvolumen durchführbar sein. Solche Schnelltests standen für Bienensperma nicht zur Verfügung, würden aber auch über das Forschungsprojekt hinaus für die schnelle Beurteilung der Eignung von Bienensperma für eine Kryokonservierung langfristige Anwendung finden.

Bienenspermien besitzen eine Vielzahl an Eigenschaften und Funktionen, die als mögliche Vitalitätskriterien dienen könnten. Es wurden Motilität, Morphologie, Akrosomenzustand, DNA-Integrität, Mitochondrienintegrität, osmotische Stressresistenz und Plasmamembranintegrität als mögliche Qualitätskriterien mit *in vitro* Tests untersucht. Zur Beurteilung und Validierung der verschiedenen Untersuchungsmethoden wurden die Ergebnisse zunächst untereinander in Beziehung gesetzt und anschließend mit *in vivo* Daten, wie Anzahl von Spermien in Spermatheka, Anteil weiblicher Brut usw., verglichen.

Dadurch war es möglich aussagekräftige und sensitive Methoden zu erkennen und herauszustellen.

1.4.2. Meilenstein II: Entwicklung einer geeigneten Kryokonservierungsmethode

Bei der Ausarbeitung einer geeigneten Gefriertechnik wurden zunächst einige grundlegende Faktoren untersucht, so z.B. verschiedene Kryogefäße, toxische Effekte des wichtigen Kryoprotektivums (CPA) DMSO auf Bienenspermien, den Einfluss der Puffer-Osmolalität und des Probenvolumens. Diese Untersuchungen lieferten schon einige grundlegende Erkenntnisse, die für alle nachfolgenden Versuche wichtig waren. Für die Gefrierkonservierung gibt es zwei grundsätzliche Strategien, die Vitrifikation und das Slow Freezing. Beide Techniken unterscheiden sich in der benötigten Konzentration an CPA und der Abkühl- und Auftauwärme, besitzen jedoch ein gemeinsames Ziel, der Unterdrückung intrazellulären Eises durch Vitrifizierung der Zellen.

Zunächst wurde das Vitrifizieren des Bienenspermas versucht (siehe 1.3.3.2.). Zwar sind für diese Methode wesentlich höhere Anfang-Konzentrationen an CPAs notwendig, doch dafür fällt eine Aufkonzentrierung während des Gefrier- bzw. Vitrifiziervorganges weg. Außerdem ist bei der Vitrifikation kein kostenintensives Einfrierequipment (programmierbares Einfriergerät) erforderlich. Dieses stand während des Projektes nicht vor Ort, sondern beim Projektpartner (LIB Hohen Neuendorf) zur Verfügung, weshalb man eine Vitrifikation zunächst bevorzugte. Es wurden deshalb umfangreiche Versuche zur Vitrifikation von Bienenspermaproben durchgeführt, dabei wurden verschiedene CPAs alleine und in Kombinationen und unterschiedliche Vorgehensweisen ausprobiert.

Der zweite Ansatz zur Kryokonservierung stützte sich auf die Strategie des sogenannten Slow Freezings (vgl. 1.3.3.1.). Auch bei den Slow freezing-Versuchen wurden verschiedene CPAs und CPA-Kombinationen eingesetzt sowie unterschiedliche Abkühl- und AuftauprozEDUREN verwendet. Für die Beurteilung der Kryotechniken wurden die kryokonservierten Bienenspermaproben mittels der zuvor entwickelten *in vitro*-Tests untersucht. Nur Proben der vielversprechendsten Kryomethoden wurden auch bei *in vivo*-Untersuchungen Berücksichtigt.

1.4.3. Meilenstein III: Optimierung der erstellten Kryokonservierungsmethode

Die Tatsache, dass nicht auf DMSO verzichtet oder es teilweise ersetzt werden konnte, machte das Problem der starken DMSO-Toxizität besonders schwerwiegend. Deshalb wurde nach Möglichkeiten gesucht, DMSO nach dem Auftauen möglichst schonend aus der Probe zu entfernen. Es wurden zwei verschiedene Ansätze zur Probenreinigung verfolgt, die Zentrifugation und die Dialyse.

Die Dialyse wurde anschließend auch genutzt, um DMSO dem Bienensperma zuzusetzen. Erst hierdurch konnte ein befriedigendes Einfrieren von Bienensperma erreicht werden.

2. Material und Methoden

2.1. Versuchsmaterial

2.1.1. *Bienensperma*

Frische Bienenspermaproben stammten überwiegend vom Länderinstitut für Bienenkunde (LIB) 16540 Hohen Neuendorf, wo sie unmittelbar vor Express-Versendung von den Drohnen abgenommen und unverdünnt in dünne Glaskapillaren bzw. Kunststoffröhrchen gezogen wurden. Die Probensäule in den Röhrchen wurde auf beiden Seiten durch Kiev-Puffer (Zusammensetzung siehe 2.2.2.1.) begrenzt und/oder durch Klemmen, Verschweißen oder Vaseline verschlossen. Für Vorversuche wurden zum Teil Bienenspermaproben aus Frankreich (Institut National de la Recherche Agronomique (INRA), F-84914 Avignon Cedex 9) verwendet. Die Bienenspermaproben wurden immer bis zum Versuch in einem temperaturgeregelten Inkubationsschrank bei 17°C gelagert.

2.1.2. *Ebersperma*

Für manche Vor- und Vergleichsversuche wurden Eberspermien verwendet. Diese wurden von der Zucht- und Besamungsunion Hessen e.G. Eberzuchtstation in 64347 Griesheim bezogen. Sie wurden mit einem Verdünnungs- und Nährpuffer, Beltsville Thawing Solution (BTS) (Zusammensetzung siehe 2.2.2.1.), im Volumenverhältnis 1:10 verdünnt und in einer Kühlbox bei ca. 17° C transportiert. Auch die Lagerung erfolgte in einem temperaturgeregelten Inkubationsschrank bei 17°C.

2.2. Chemikalien und Geräte

2.2.1. Auflistung verwendeter Chemikalien

Tab.1: Auflistung verwendeter Chemikalien, mit Bezugsfirma und Katalognr.

Bezeichnung	Firma	Artikel - Nr.
Acridin Orange	Sigma Aldrich 82024 München	A6014
Agarose high EEO	Serva 69115 Heidelberg	11397
Anti-Akrosin - primärer Antikörper	Invitrogen GmbH 64271 Darmstadt	MA1-19180
Anti-Hexokinase - primärer Antikörper	antibodies online GmbH	ABIN100459
Anti-Maus IgG gekoppelt mit Alexa Fluor 488	Invitrogen GmbH 64271 Darmstadt	A-11029
Anti-Kaninchen IgG gekoppelt mit Alexa Fluor 488	Invitrogen GmbH 64271 Darmstadt	A-11008
Anti-Kaninchen IgG gekoppelt mit Alexa Fluor 546	Invitrogen GmbH 64271 Darmstadt	A11010
Aprotinin	Sigma Aldrich 82024 München	A6279
Arginin	Serva 69115 Heidelberg	13930
Beltsville Thawing Solution (BTS)	Minitüb 84184 Tiefenbach	13525/2005
Borsäure	Sigma Aldrich 82024 München	B6768
Bovine Serum Albumin (BSA)	Roche 68305 Mannheim	775835
Calciumchlorid (CaCl ₂ x 2H ₂ O)	Sigma Aldrich 82024 München	C 5080
Citronensäure	Merck 64271 Darmstadt	1002440500

Dextran 10000	Sigma Aldrich 82024 München	D9260
Dimethylacetamid (DMAA)	Carl Roth GmbH 76185 Karlsruhe	HN45.1
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma Aldrich 82024 München	D8418
Di-Natriumphosphat (Na_2HPO_4)	Merck 64271 Darmstadt	6585
Dithiothreitol (DTT)	Roche 68305 Mannheim	10708984001
Ectoin	Sigma Aldrich 82024 München	81619
Ethanol	Carl Roth GmbH 76185 Karlsruhe	K928/T868
Ethylendiamintetracetat (EDTA)	Sigma Aldrich 82024 München	E 5134
Ethylenglykol (EG)	Sigma Aldrich 82024 München	324558
Ficoll PM 70	Sigma Aldrich 82024 München	F2878
Fluorescein	Thermo scientific 64293 Darmstadt	46410
Fructose	Merck 64271 Darmstadt	104007
Fructose-6-phosphat	Sigma Aldrich 82024 München	F3627
Gentamicin	Minitüb 84184 Tiefenbach	13526/0253
Glucose-6-Phosphatdehydrogenase (G6PDH)	Roche 68305 Mannheim	12882721
D-Glucose- Monohydrat ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 \times \text{H}_2\text{O}$)	Merck 64271 Darmstadt	108342
Glutamin	Merck 64271 Darmstadt	1002890100

Glutaminsäure	Merck 64271 Darmstadt	291
Glutathion	Boehringer Mannheim/ Roche, 68305 Mannheim	127736
Glycerin	Carl Roth GmbH 76185 Karlsruhe	6967.2
Harnstoff	Merck 64271 Darmstadt	108488
2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)- ethansulfonsäure (HEPES)	Sigma Aldrich 82024 München	H 4034
Hoechst 33342	Sigma Aldrich 82024 München	B2261
Hydroxyectoin	Sigma Aldrich 82024 München	70709
Isocitrat	Sigma Aldrich 82024 München	11252
Kaliumchlorid (KCl)	Merck 64271 Darmstadt	104936
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Carl Roth GmbH 76185 Karlsruhe	3904.1
Kaliumhydrogencarbonat (KHCO ₃)	Merck 64271 Darmstadt	1048540500
Kaliumhydroxid (KOH)	Sigma Aldrich 82024 München	P1767
Kaltwasserfischgelatine	Sigma Aldrich 82024 München	G7041
Katalase aus Rinderleber	Boehringer Mannheim/ Roche, 68305 Mannheim	1C64105,
Lectin von <i>Arachis hypogaea</i> gekoppelt mit Fluoresceinisothiocyanat (PNA- FITC)	Sigma Aldrich 82024 München	L 7381

Lectin von <i>Pisum sativum</i> gekoppelt mit Fluoresceinisothiocyanat (PSA- FITC)	Sigma Aldrich 8202 4 München	L 0770
Lysin	Sigma Aldrich 8202 4 München	L5501
Magnesium-Acetat	Merck 64271 Darmstadt	7507315
Mowiol	Sigma Aldrich 82024 München	81381
Nicotinamid Adenin-Dinukleotidphosphat (NADP ⁺)	Roche 68305 Mannheim	10128058001
Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth GmbH 76185 Karlsruhe	3957.2
Natrium-Citrat	Sigma Aldrich 82024 München	S4641
Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat (NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O)	Merck 64271 Darmstadt	64271
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Serva 69115 Heidelberg	20770.01
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO ₃)	Merck 64271 Darmstadt	5295522
Natriumhydroxid (NaOH)	Carl Roth GmbH 76185 Karlsruhe	6771,1
Ovalbumin	AppliChem GmbH, 64291 Darmstadt	A2245
Paraformaldehyd (PFA)	Agar scientific Essex, UK	R1018
Polyethylenglycol (PEG)	Aldrich chemistry/ Sigma Aldrich 82024 München	202398
Poly-Lysin	Sigma Aldrich 82024 München	P8920
Polyvinylpyrrolidon (PVP)	Sigma Aldrich 82024 München	PVP10

Material und Methoden

Prolin	Sigma Aldrich 82024 München	P0380
1,3-Propandiol (PD)	Sigma Aldrich 82024 München	P50404
Propidiumiodid (PI)	Sigma Aldrich 82024 München	81845
Saccharose	Carl Roth GmbH 76185 Karlsruhe	9097.1
Salzsäure (HCl)	Carl Roth GmbH 76185 Karlsruhe	P074
Sucrose	Sigma Aldrich 82024 München	S9378
Sulfanilamid	Sigma Aldrich 82024 München	S9251
Trehalose	Sigma Aldrich 82024 München	T9531
TRA (Triethanolamin)	Sigma Aldrich 82024 München	90279
TRIS (2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3- propanediol)	Sigma Aldrich 82024 München	T 1378
TRIS-HCl	Sigma Aldrich 82024 München	T3253
Triton x-100	Roche 68305 Mannheim	789704
Trypsinhemmer aus der Sojabohne	Sigma Aldrich 82024 München	T9128
Tween 20	Sigma Aldrich 82024 München	P1379
Vaseline	Carl Roth GmbH 76185 Karlsruhe	E746

2.2.2. Puffer und Versuchslösungen

Es werden alle verwendeten Puffer, Verdüner und Versuchslösungen aufgelistet und deren Zusammensetzung sowie ggf. Lagerung und Handhabung beschrieben.

2.2.2.1 Spermaverdünner

BTS (Beltsville Thawing Solution)

Diese für Eberspermien fertige Nährpuffermischung ist als Pulver bei der Firma Minitüb, Tiefenbach erwerbbar und muss vor Gebrauch nur in deionisiertem Wasser gelöst werden. Für 1 Liter Puffer werden 50g des Pufferpulvers gelöst. Ein verbesserter Lösungsvorgang kann durch die Erwärmung des Wassers auf 30°C erreicht werden. BTS ist mit und ohne Antibiotika-Zusatz erhältlich, bei den hier beschriebenen Versuchen wurde ausschließlich gentamicinhaltiges BTS verwendet. Der fertige Puffer enthält Glucose, Natriumcitrat, EDTA, Natriumbicarbonat, Kaliumchlorid und Gentamicin und weist einen pH von 7,3 und eine Osmolalität von 320-340mOsmol/kg auf.

BSS (Bee Sperm Solution) 450mOsmol/kg; 30mM Trehalose.

Tab.2: Zusammensetzung des BSS

Substanz	Molekulargewicht [g/Mol]	Einwaage	Konzentration im Puffer
HEPES	238,5	477mg	20mM
Kaliumchlorid (KCl)	74,55	410mg	55mM
Natriumcitrat	294,1	2,43g	82,6mM
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO ₃)	84,01	210mg	25mM
Trehalose*2H ₂ O	378,24	1,146g	30mM
Aqua <small>dest.</small>		Ad 100ml	
→ mit KCl auf 450mOsmol/kg bringen; mit KOH auf pH 8,2 bringen			

Teilweise wurden dem BSS nachträglich Steptomycin (0,02%) und Penicillin (0,01%) zugesetzt (siehe 2.8.).

BSS 450mOsmol/Kg T60.

Tab.3: Zusammensetzung des BSS 450mOsmol/Kg T60.

Substanz	Molekulargewicht [g/Mol]	Einwaage	Konzentration im Puffer
HEPES	238,5	477mg	20mM
Kaliumchlorid (KCl)	74,55	410mg	55mM
Natriumcitrat	294,1	2,43g	82,6mM
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO ₃)	84,01	210mg	25mM
Trehalose*2H ₂ O	378,24	2,292g	60mM
Aqua dest.		Ad 100ml	
➔ mit KCl auf 450mOsmol/kg bringen; mit KOH auf pH 8,2 bringen			

BSS+ 320mOsmol/kg; 60mM Trehalose.

Tab.4: Zusammensetzung des BSS+.

Substanz	Molekulargewicht [g/Mol]	Einwaage	Konzentration im Puffer
HEPES	238,5	477mg	20mM
Kaliumchlorid (KCl)	74,55	410mg	55mM
Natriumcitrat	294,1	882,4mg	30mM
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO ₃)	84,01	210mg	25mM
Trehalose*2H ₂ O	378,24	2,292g	60mM
Aqua dest.		Ad 100ml	
➔ mit KCl auf 320mOsmol/kg bringen; mit KOH auf pH 8,2 bringen			
➔ für BSS+ mit KCl auf 330mOsmol/kg bringen; mit KOH auf pH 8,2 bringen			

BSS oT 320mOsmol/kg; ohne Trehalose.

Tab.5: Zusammensetzung des BSS oT

Substanz	Molekulargewicht [g/Mol]	Einwaage	Konzentration im Puffer
----------	-----------------------------	----------	----------------------------

HEPES	238,5	477mg	20mM
Kaliumchlorid (KCl)	74,55	446mg	60mM
Natriumcitrat	294,1	1,470g	50mM
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO ₃)	84,01	210mg	25mM
Aqua dest.	Ad 100ml		
➔ mit KCl auf 320mOsmol/kg bringen; mit KOH auf pH 8,2 bringen			

BSS oT mit DMSO 320mOsmol/kg; ohne Trehalose, 20% DMSO

Tab.6: Zusammensetzung des BSS oT mit 20% DMSO

Substanz	Molekulargewicht [g/Mol]	Einwaage	Konzentration im Puffer
HEPES	238,5	477mg	20mM
Kaliumchlorid (KCl)	74,55	446mg	60mM
Natriumcitrat	294,1	1,470g	50mM
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO ₃)	84,01	210mg	25mM
DMSO	20ml		
Aqua dest.	Ad 100ml		
➔ mit KCl auf 320mOsmol/kg bringen; mit KOH auf pH 8,2 bringen			

Kiev-Puffer (nach Taylor et al., 2009; leicht verändert)

Tab.7: Zusammensetzung des Kiev-Puffers (320mOsmol/kg; pH 8,3).

Substanz	Molekulargewicht [g/Mol]	Einwaage	Konzentration im Puffer
Glucose	180,16	300mg	16,65mM
Kaliumchlorid (KCl)	74,55	40mg	5,37mM
Natriumcitrat	294,1	2,43g	82,6mM
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO ₃)	84,01	210mg	25mM
Aqua dest.	Ad 100ml		
➔ nicht eingestellt: 320mOsmol/kg; pH 8,3 oder eingestellt 330 mOsmol/kg; pH 8,2			

Harbo Puffer – Phosphatpuffer.

Tab.8: Zusammensetzung des Harbo Puffers.

Substanz	Molekulargewicht [g/Mol]	Einwaage	Konzentration im Puffer
Natriumdihydrogenphosphat- Monohydrat (NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O)	137,99	956mg	69,3mM
Di-Natriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄)	141,96	448mg	31,6mM
Aqua dest.		Ad 100ml	

Künstliche Hämolymphe

Tab.9: Zusammensetzung der künstlichen Hämolymphe.

Substanz	Molekulargewicht [g/Mol]	Einwaage	Konzentration
Bovine Serum Albumin (BSA)	-	2,7g	27g/L
Calciumchlorid (CaCl ₂)* 2H ₂ O	147,02	73,5mg	5mM
Fructose	180,16	800mg	44,4mM
Glucose	180,16	859,4mg	47,7mM
Glutamin	146,14	637,2mg	43,6mM
Glutaminsäure	147,13	189,8mg	12,9mM
Kaliumchlorid (KCl)	74,55	134,2mg	18mM
Natriumchlorid (NaCl)	58,44	187mg	32mM
Prolin	115,13	1,596g	138,6mM
Sucrose	342,3	338,9mg	9,9mM
Trehalose*2H ₂ O	378,24	1,271g	33,06mM
Aqua dest.		Ad 100ml	

Künstliche Spermatheka-Flüssigkeit**Tab.10: Zusammensetzung der künstlichen Spermatheka-Flüssigkeit.**

Substanz	Molekulargewicht [g/Mol]	Einwaage	Konzentration
Arginin	174,20	436mg	25mM
Bovine Serum Albumin (BSA)	-	200mg	2g/L
Calciumchlorid (CaCl ₂)* 2H ₂ O	147,02	59mg	4mM
Fructose	180,16	198mg	10mM
Glucose	180,16	486mg	27mM
Glutaminsäure	147,13	265mg	18mM
Kaliumhydrogencarbonat (KHCO ₃)	100,12	1,402g	140mM
Lysin	146,19	205mg	14mM
Natriumchlorid (NaCl)	58,44	94mg	16mM
Sucrose	342,3	377mg	11mM
Trehalose*2H ₂ O	378,24	76mg	2mM
Aqua dest.		Ad 100ml	

K+ Puffer**Tab.11: Zusammensetzung des K+ Puffers.**

Substanz	Molekulargewicht [g/Mol]	Einwaage	Konzentration
Natriumcitrat	294,1	2,43g	82,6mM
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO ₃)	84,01	210mg	25mM
Kaliumchlorid (KCl)	74,55	40mg	5,4mM
Glucose	180,16	300mg	16,7mM
Sucrose	342,3	3,1g	90,6mM
Sulfanilamid	172,2	300mg	17,4mM
Polyvinylpyrrolidon	111,14	13mg	1,17mM
Aqua dest.		Ad 100ml	

Alle Puffer zur Spermaverdünnung können mehrere Tage im Kühlschrank aufbewahrt bzw. aliquotiert eingefroren werden. Vor Verwendung ist eine Equilibrierung auf die nötige Ausgangstemperatur und eine Durchmischung mittels Vortexer oder Magnetrührer erforderlich.

2.2.2.2 Versuchspuffer/ Lösungen

Hoechst33342 (H342)

Der Fluoreszenzfarbstoff H342 wurde unter anderem für Zellzählungen, Motilitätsanalysen und Lebend-Tot-Markierungen von Bienenspermaproben verwendet. Für alle Versuche wurde eine mit Wasser angesetzte 5mM Stocklösung verwendet. Die Stocklösung kann sowohl im Kühlschrank gekühlt als auch eingefroren über einen längeren Zeitraum verlustfrei gelagert werden, allerdings muss auf ständigen Lichtverschluss geachtet werden. Ausgehend von dieser 5mM (entspricht ca. 3mg/ml) Stocklösung wurden die Versuchslösungen durch Verdünnung mit den entsprechenden Puffern hergestellt. Für die mikroskopischen Analysen wurde der Leika Filterwürfel A4 verwendet.

Propidiumiodid (PI)

Der rote Fluoreszenzfarbstoff PI wurde ausschließlich für die Lebend-Tot-Markierungen benötigt und als Pulver von der Firma Sigma Aldrich bezogen. Mit vollentsalztem Wasser wurde eine Lösung mit einer Konzentration von 1,5mg/ml hergestellt, aliquotiert und eingefroren. Die Aliquots wurden vor Versuchsbeginn aufgetaut und durch Vortexen gemischt, gegebenenfalls wurde die Lösung mit entsprechendem Puffer weiterverdünnt. Für die mikroskopischen Analysen wurde der Leika Filterwürfel N3 verwendet.

PNA-FITC – Lectin von *Arachis hypogaea* (peanut)

Der grüne Fluoreszenzfarbstoff wurde ausschließlich für Versuche zur Akrosomenmarkierung verwendet und als Lyophilisat von der Firma Sigma Aldrich bezogen. Mit vollentsalztem Wasser wurde eine Lösung mit einer Konzentration von 1mg/ml hergestellt, aliquotiert und eingefroren. Die Aliquots wurden vor Versuchsbeginn aufgetaut und durch Vortexen gemischt, gegebenenfalls wurde die Lösung mit entsprechendem Puffer weiterverdünnt. Für die mikroskopischen Analysen wurde der Leika Filterwürfel L5 verwendet.

GPI-Test**Tab.12: Zusammensetzung der Lösungen und Puffer für den GPI-Test.**

Substanz	Molekulargewicht [g/Mol]	Einwaage	Konzentration
TRA-Puffer			
TRA	185,65	3,99g/100ml	215mM
mit NaOH auf pH 7,6 einstellen			
Mg-Acetat			
Mg-Acetat	214,15	4,28g/100ml	200mM
NADP			
NADP	787,4	32mg/10ml	4mM
Fructose-6-Phosphat			
Fructose-6-Phosphat	304,1	42,5mg/10ml	14mM
Alle bisher aufgeführten Lösungen können aliquotiert eingefroren werden			

Für den GPI-Test wird das Hilfsenzym Glucose-6-Phosphat Dehydrogenase (G6PDH) benötigt. Für jeden Versuchstag wurden deshalb 6,6µl der vorliegenden G6PDH-Ammonium Sulfat- Suspension 5min zentrifugiert und das Pellet anschließend in 1ml TRA-Puffer gelöst. Die entstandene Enzymlösung mit 4,6U/ml wurde dann bis zum Gebrauch auf Eis gekühlt. Die Hilfsenzymlösung wurde für jeden Versuchstag frisch hergestellt.

ICDH-Test**Tab.13: Zusammensetzung der Lösungen und Puffer für den ICDH-Test.**

Substanz	Molekulargewicht [g/Mol]	Einwaage	Konzentration
TRA-Puffer			
TRA	185,65	3,99g/100ml	215mM
mit NaOH auf pH 7,6 einstellen			
Mg-Acetat			
Mg-Acetat	214,15	4,28g/100ml	200mM
NADP			
NADP	787,4	32mg/10ml	4mM
Isocitrat			
Isocitrat	192,13	480mg/10ml	250mM
Alle bisher aufgeführten Lösungen können aliquotiert eingefroren werden			

TUNEL-Analyse

Die TUNEL-Analyse wurde mit dem *In situ* cell death detection kit von Roche durchgeführt. Somit standen die Enzym- und die Färbelösung bereit und mussten vor dem Versuch nur aufgetaut und durchmischt werden.

Tab.14: Zusammensetzung benötigter Lösungen und Puffer für den TUNEL-Test.

Substanz	Molekulargewicht [g/Mol]	Einwaage	Konzentration
PBS			
Natriumchlorid (NaCl)	58,44	812mg	139mM
Di-Natriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄)	141,96	170,4mg	12mM
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	136,09	50mg	3,6mM
➔ ad 100ml H ₂ O _{dest.} ; pH 7,4 ggf. mit NaOH und HCl einstellen			
Fixierungslösung			
Für die Fixierungslösung werden 4g Paraformaldehyd (PFA) mit ca. 90ml PBS pH 7,4 gemischt und während ständigen Rührens auf einem Magnetrührer stark erhitzt (auf ca. 90°C) bis sich das PFA vollständig gelöst hat. Dann wird PBS zugegeben, bis genau 100ml vorliegen. Es resultiert eine 4%ige (w/v) PFA-Lösung. Die Fixierungslösung wurde immer frisch für den versuchstag angesetzt.			
Permeabilisierungslösung - 0,1% Triton in 0,1% (w/v) Na-Citrat			
50mg Na-Citrat werden in ca. 45ml H ₂ O _{dest.} gelöst. Dieser Lösung werden 50µl TritonX-100 zugesetzt und mit Hilfe einer Magnetrührers gemischt. Danach wird der Lösung H ₂ O _{dest.} zugegeben, bis genau 50ml erreicht sind. Nach kurzem Schütteln ist die Permeabilisierungslösung gebrauchsfertig und kann bis zur Verwendung auf Eis gekühlt werden. Die Permeabilisierungslösung wurde für jeden Versuchstag frisch angesetzt.			
Adhäsionslösung zur Deckglasbeschichtung			
Eine von der Firma Sigma Aldrich bezogene 0,1%ige Poly-Lysin Lösung wird 1:10 mit H ₂ O _{dest.} verdünnt. In diese Gebrauchslösung werden zur Beschichtung für kurze Zeit die Deckgläser gelegt und danach luftgetrocknet.			
Puffer für DNase; pH 7,5			
Substanz	Molekulargewicht [g/Mol]	Einwaage	Konzentration
Tris-HCl	157,6	78,8mg	50mM
Rinderserumalbumin (BSA)	66 kDa (66000)	10mg	1mg/ml ≈15µM

	g/Mol)		
→ ad 10ml H ₂ O _{dest.} ; pH 7,5 ggf. mit HCl einstellen			
Der Puffer kann aliquotiert eingefroren werden			

Für die Positivkontrolle wird eine Spatelspitze DNase in 2ml DNase-Puffer gelöst und bis zum Gebrauch kühl gelagert. Die Enzymlösung wurde für jeden Versuchstag frisch hergestellt.

SCD – Sperm Chromatin Dispersionsassay nach Fernandez et al., 2003.

Tab.15: Zusammensetzung benötigter Lösungen und Puffer für den SCD-Test.

PBS → siehe Puffer für TUNEL-Analyse (oben)			
Säure-Denaturierungslösung			
5ml einer 1molaren (1M) Salzsäure (HCl) werden mit 57,5ml H ₂ O _{dest.} gemischt, dadurch entstehen 62,5ml einer 0,08M Säure-Denaturierungslösung.			
Lyse-Puffer I; pH7,5			
Substanz	Molekulargewicht [g/Mol]	Einwaage	Konzentration
Tris	121,14	4,85g	0,4M
Dithiothreitol (DTT)	154,3	12,34g	0,8M
SDS	288,4	1g	1% (w/v)
EDTA	372,24	1,86g	50mM
→ ad 100ml H ₂ O _{dest.}			
Lyse-Puffer II; pH7,5			
Substanz	Molekulargewicht [g/Mol]	Einwaage	Konzentration
Tris	121,14	4,85g	0,4M
Natriumchlorid (NaCl)	58,44	11,69g	2M
SDS	288,4	1g	1% (w/v)
→ ad 100ml H ₂ O _{dest.}			
Tris-Borat-Puffer; pH7,5			
Substanz	Molekulargewicht [g/Mol]	Einwaage	Konzentration
Tris	121,14	1,09g	90mM
EDTA	372,24	74,45mg	2mM
→ pH 7,5 mit 1M Borsäure einstellen			

AOT – Acridin Orange Test

Tab.16: Zusammensetzung benötigter Lösungen und Puffer für den AOT.

PBS → siehe Puffer für TUNEL-Analyse (oben)			
Fixierungslösung			
Für die Fixierungslösung werden 1g Paraformaldehyd (PFA) mit ca. 90ml PBS pH 7,4 gemischt und während ständigen Rührens auf einem Magnetrührer stark erhitzt (auf ca. 90°C) bis sich das PFA vollständig gelöst hat. Dann wird PBS zugegeben, bis genau 100ml vorliegen. Es resultiert eine 1%ige (w/v) PFA-Lösung. Die Fixierungslösung wurde immer frisch für den versuchstag angesetzt.			
Färbelösung			
Substanz	Molekulargewicht [g/Mol]	Einwaage	Konzentration
Citronensäure	210,14 g/Mol	2,1g	10mM
→ ad 100ml H ₂ O _{dest.}			
Di-Natriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄)	141,96 g/Mol	1,42g	200mM
→ ad 50ml H ₂ O _{dest.}			
Acridin Orange	265,35 g/Mol	0,6mg	22,6mM
→ Der Farbstoff wird in 90ml der 10mM Zitronensäure-Lösung und 10ml der 200mM Na ₂ HPO ₄ – Lösung gelöst.			
TNE-Puffer ; pH 7,4			
Tris-HCl	157,6 g/Mol	394mg	10mM
Natriumchlorid (NaCl)	58,44 g/Mol	2,19g	150mM
EDTA	372,24 g/Mol	93,1mg	1mM
→ ad 250ml H ₂ O _{dest.} ; pH7,4 ggf. mit HCl /NaOH einstellen			
Detergenzpuffer			
Natriumchlorid (NaCl)	58,44 g/Mol	876,6 mg	150mM
TritonX-100		100µl	0,1%
HCl		8ml einer 1M HCl-Lösung	0,08M
→ ad 100ml H ₂ O _{dest.}			

Antikörpervermittelte Fluoreszenzmarkierung**Tab.17: Zusammensetzung benötigter Lösungen und Puffer für eine antikörper-vermittelte Fluoreszenzmarkierung.**

Substanz	Molekulargewicht [g/Mol]	Einwaage	Konzentration
Antikörperpuffer			
Natriumchlorid (NaCl)	58,44	876,6mg	150mM
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	136,09	272,2mg	20mM
→ ad 100ml H ₂ O _{dest.} ; pH 7,2 ggf. mit NaOH und HCl einstellen			
PBS			
Natriumchlorid (NaCl)	58,44	812mg	139mM
Di-Natriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄)	141,96	170,4mg	12mM
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	136,09	50mg	3,6mM
→ ad 100ml H ₂ O _{dest.} ; pH 7,4 ggf. mit NaOH und HCl einstellen			
Blocklösung			
1ml einer 45%igen Kaltwasserfischgelatine werden in 89ml PBS gelöst Endkonzentration der Gelatine: 0,5%) und mit 0,1% Ovalbumin versetzt.			
Permeabilisierungslösung - 0,1% Triton in PBS			
50µl TritonX-100 werden in ca. 45ml PBS gelöst. Danach wird der Lösung weiter PBS zugegeben, bis genau 50ml erreicht sind. Nach kurzem Schütteln ist die Permeabilisierungslösung gebrauchsfertig und kann bis zur Verwendung auf Eis gekühlt werden.			
Adhäsionslösung zur Deckglasbeschichtung			
Eine von der Firma Sigma Aldrich bezogene 0,1%ige Poly-Lysin Lösung wird 1:10 mit H ₂ O _{dest.} verdünnt. In diese Gebrauchslösung werden zur Beschichtung für kurze Zeit die Deckgläser gelegt und danach luftgetrocknet.			
Fixierungslösung			
Für die Fixierungslösung werden 2g Paraformaldehyd (PFA) mit ca. 90ml PBS pH 7,4 gemischt und während ständigen Rührens auf einem Magnetrührer stark erhitzt (auf ca. 90°C) bis sich das PFA vollständig gelöst hat. Dann wird PBS zugegeben, bis genau 100ml vorliegen. Es resultiert eine 1%ige (w/v) PFA-Lösung. Die Fixierungslösung wurde immer frisch für den versuchstag angesetzt.			

Zentrifugationsmedien**Tab.18: Zusammensetzung benötigter Puffer für die durchgeführten Zentrifugations-experimente**

Substanz	Einwaage	Konzentration
Tris; pH: 8,7 nach (Moritz, 1984; Kühnert et al. ,1989)		
Natriumchlorid (NaCl)	1,1g	188,2mM
L-Arginin	10mg	0,6mM
L-Lysin	10mg	0,6mM
Tris	610mg	50mM
Glucose	100mg	5,6mM
➔ ad 100ml H ₂ O _{dest.}		
Tris hypertonisch ; pH: 7,2		
Natriumchlorid (NaCl)	880mg	150,6mM
Kaliumchlorid (KCl)	1,12g	150,2mM
Tris	610mg	50mM
K+; pH: 8,4		
Na-Citrat	2,43g	82,6mM
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO ₃)	210mg	25mM
Kaliumchlorid (KCl)	40mg	5,4mM
Sulfanilamid	300mg	17,4mM
Glucose	300mg	16,7mM
Sucrose	3,1g	90,6mM
Polyvinylpyrrolidon	13mg	-
➔ ad 100ml H ₂ O _{dest.}		
Künstliches Seminalplasma; pH: 7,2		
Natriumchlorid (NaCl)	0,33	56,5
Kaliumchlorid (KCl)	0,63	84,5
Fructose	0,08	4,4
Glucose	0,08	4,4
Trehalose	0,05	1,32
L-Arginin	0,28	16,1
L-Lysin	0,24	14,6
Glutaminsäure	0,16	10,9
Rinderserum-Albumin (BSA)	0,67	-

Allen Medien wurden zusätzlich 0,01% Penicillin und 0,02% Streptomycin zugesetzt. Sollte eine längere Lagerung der Puffer stattfinden, wurden die Medien vor Antibiotika- und Albumin-Zugabe aliquotiert und bei -20°C gelagert. Erst nach Auftauen wurden dann Penicillin, Streptomycin und Albumin zugegeben und der pH-Wert eingestellt.

2.2.3. Auflistung verwendeter Gerätschaften

Tab.19: Auflistung verwendeter Geräte, mit Bezugsfirma und Bezeichnung.

Gerät	Bezeichnung	Bezugsfirma
Dewar-Gefäße	10Liter/50Liter	Union Carbide
Eisschrank	electronic	Liebherr
Fluorimeter	Fluoroskan Ascent Type 374	Labsystems
Gefriertrockner	Alpha2-4 Loc-1m	Christ
Heizplatten mit Rührfunktion	IKA-CombiMAG RCH	IKA-Werg
	IKA-CombiMAG RCO	
Hybridisierungsöfen	Kompakt Line ov4	Biometra
Inkubationsschrank	WTC; Typ:3305309900310	Binder
Kamera am Mikroskop	UEye UI2230SE-C-HQO	IDS Imaging Development Systems
Kühlschränk	Verschiedene (Bsp.Profiline)	Liebherr
Labornetzgerät	Phero-stab.500	BIOTEC Fischer GmbH, Reiskirchen
Mikroskop	Inverses Leitz DM IRB Mikroskop mit Kamera (Kappa)	Leica
Mikroskop	SN1025963	Hund
Objektträger zur Zellzählung	Neubauer- Zählkammer	Carl Roth GmbH, Karlsruhe

Osmometer	Osmomat 030 Cryoscopic	Gonotec Berlin
pH-Meter	pH-Meter CG 702	Schott Mainz
Sonifier	Sonoplus	Bandelin
Stoppuhr	Stoppuhr und Kurzzeitmesser	Firma TCM;
Thermometer digital	Unitherm standard	Unitherm Messtechnik
Ultraschallbad	Transsonic 460	Elma
Vortexer	REAX 2000	Heidloph
Vortexer	Vortex-Genie	Scientific industries AG
Waagen	PN 1210	Mettler
	AE 240	Mettler
	Satorius Basic	Satorius
Wasserbäder	Desaga Frigostat	Desaga Heidelberg
	GFL	Mitlacher
	Mgw M3	Lauda
Zentrifugen	5415C Centrifuge	Eppendorf
	Mini spin	Eppendorf
	für Reagenzgläser	Micron

2.2.4. Standard- Labormaterial/ Verbrauchsmaterial

Tab.20: Auflistung verwendeter Materialien, mit Bezugsfirma und Bezeichnung.

Standard-Labormaterial / Verbrauchsmaterial	Bezeichnung	Bezugsfirma
Aluminiumfolie	AA77	Carl Roth GmbH 76185 Karlsruhe
Deckgläser	18x18mm; 24x24mm	Marienfeld 97922 Lauda
Dialysekammern	ZelluTrans	Carl Roth GmbH 76185 Karlsruhe
Dialyseschlauch	1780.1	Carl Roth GmbH 76185 Karlsruhe
Einweg-Sicherheitshandschuhe	Neoprotekt Latex	neoLab Migge Laborbedarf- Vertriebs GmbH, Heidelberg
Glaskapillaren	Hämatokrit Kapillaren Hirschmann	VWR international
Kalibrierlösung für Osmomat	300mosmol/kg	Gonotec GmbH 10553 Berlin
Laborpapier	Kimtech science	Kimberlay - Clark
Magnetrührstäbchen	Diverse Ausführungen	verschieden
Mikroliterspritzen	Hamiltonspritze	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Mikrotiterplatten	NUNC PolySorp Mikrotiterplatte 96-well F- Boden	VWR international
Objektträger	Lot 8820778	Menzel 38116 Braunschweig
Pipetten	Eppendorf versch. Varianten	Fisher scientific GmbH, Schwerte/ Eppendorf AG, Hamburg
Pipettenspitzen (1000µl, 200µl, 10µl)	Verschiedene Größen	BRAND GMBH + CO KG, 97877 Wertheim /neoLab Migge Laborbedarf-Vertriebs GmbH, Heidelberg
Pipettierhilfe	Nr. T749.1	Carl Roth GmbH 76185 Karlsruhe

Reaktionsgefäße	Reaktionsgefäße (2ml, 1,5ml, 0,5ml)	Carl Roth GmbH 76185 Karlsruhe
Spezial-Objektträger	Standard Count Analysis Chambers SC20-01-FA	Leja 2153 GN Nieuw-Vennep
Teflonschläuche	Nr. 228-0735/228-0732	VWR international
Verschlussfolie	Parafilm M	neoLab Migge Laborbedarf- Vertriebs GmbH, Heidelberg

2.3. Methodenentwicklung eines schnellen *in vitro* Spermiovitalitätstests zur Validierung der Spermaqualität

Für die Erarbeitung einer Konservierungsmethode, als auch für eine serienmäßig durchgeführte Qualitätsprüfung im Falle einer Kommerzialisierung werden schnelle und standardisierte Labortests, die mit wenig Probenvolumen funktionieren, zur Beurteilung der Spermaqualität benötigt. In der vorliegenden Arbeit wurden verschiedene Eigenschaften und Funktionen, wie Motilität, Stressresistenz, DNA-Integrität, Morphologie und Akrosomenzustand der Spermien, untersucht und ihre Eignung als Vitalitätskriterium überprüft.

Zunächst wurden alle Vitalitätstests einzeln erprobt, dann aber wenn möglich mit einander gekoppelt. Zur Validierung der *in vitro* Ergebnisse wurde für die gleichen Proben ein Inseminations-Experiment durchgeführt und *in vivo* Leistungsmerkmale herangezogen. Korrelationsberechnungen der Methoden untereinander und zu den *in vivo*-Daten sollten klären, welche *in vitro* Analysen für die Beurteilung der Spermaqualität aussagekräftig sind und welche nicht.

Nach mehreren Vorversuchen, in denen grundsätzliche Versuchsbedingungen festgelegt sowie Aufwand und Durchführbarkeit getestet wurden, fand ein umfangreicher Hauptversuch statt. Das Hauptexperiment wurde so angelegt, dass die *in vivo* und *in vitro* Analysen für 8 unterschiedliche Kryoprotektivum-Konzentrationen und 3 verschiedene Volksherkünfte (Ursprünge) durchgeführt wurden um die Varianz der Ergebnisse zu maximieren. Die Versuchstiere für dieses kombinierte *in vivo/in vitro* Experiment stammten aus 3 Koloniegruppen der Bienenart *Apis mellifera carnica*. Die Samenproben wurden von 17-21 Tage alten Drohnen entnommen, dabei wurde zur Vermeidung einer Kontamination nur steriles Material verwendet. Um eine für die Analysen genügende Spermamenge zu

erhalten, wurden zwei Tage lang Ejakulatproben gesammelt, bei 20-22°C gelagert und dann sortiert nach Kolonieursprung gepoolt (ca. 210µl pro Ursprung). Die Spermapools wurden mit einer Pipettenspitze vorsichtig homogenisiert, dann wurden pro Pool 2 x 20 µl für die *in vivo* und *in vitro* Analysen mit ungefrorenen Spermien ohne Kryokonservierungsmittel entnommen. Der Rest jedes Pools wurde anschließend 1:2 mit eigelhaltigem Test-Puffer (Wegener et al., 2012) verdünnt und durch Rühren gemischt. 8 Portionen a 40µl wurden pro Pool entnommen und 1:1,5 in Test-Puffer mit 8 unterschiedlichen DMSO-Konzentrationen weiterverdünnt. Die resultierenden DMSO-Konzentrationen in den Spermaproben waren: 0; 1,5; 3; 4,5; 6; 7,5; 9; und 10,5% (v/v). Pro Ursprung und DMSO-Konzentration wurden 6 Portionen a 8µl in Glaskapillaren mit einem Innendurchmesser von 0,7mm gefüllt. Vor und hinter den Probensäulen wurden mit einem Abstand von ca. 2mm je weitere 8 µl Puffer in die Kapillaren gefüllt. Diese wurden anschließend über einer Bunsenbrennerflamme zugeschmolzen ohne dabei die Probe stark zu erwärmen. Danach wurden die Proben mit 3°C/min bis -35°C abgekühlt und im direkten Anschluss in flüssigen Stickstoff bei -196°C überführt (siehe Kaftanoglu and Peng, 1984) und dort gelagert. Zum Auftauen wurden die Kapillaren für eine Minute in ein 35°C warmes Wasserbad gehalten. Während die Proben für das Inseminationsexperiment 24-27h bei -196°C gelagert wurden, lagen die Proben für die *in vitro* Tests 17-21 Wochen in N₂.

Um das Projekt möglichst effizient durchzuführen, wurde mit dem LIB Hohen Neuendorf eng zusammengearbeitet und die Experimente der Ausrüstung und Erfahrung entsprechend aufgeteilt. Die oben beschriebene Probenentnahme und -behandlung sowie der Gefrierprozess wurden von den Mitarbeitern des LIB in Hohen Neuendorf durchgeführt. Auch die *in vivo* Experimente fanden am LIB statt und werden aus diesem Grund hier methodisch nicht weiter erläutert. Alle *in vitro* Analysen wurden von AMP-Lab GmbH Mainz durchgeführt und werden nun genauer vorgestellt.

2.3.1. Zellkonzentrationsbestimmung

Die Spermiedichte einer Ejakulatprobe ist allgemein ein wichtiges Qualitätskriterium, auch für Spermaproben von Drohnen ist das der Fall. Es gibt unterschiedliche Methoden die Zelldichte in Ejakulaten zu bestimmen, manche basieren auf eine manuelle Auszählung (2.3.1.1.), andere auf ein computergestütztes Verfahren und eine Fluoreszenzmarkierung (2.3.1.2.). Eine weitere Quantifizierungsmethode wird mittels Fluoreszenzmessung am Fluorimeter durchgeführt (2.3.1.3.). Die unterschiedlichen Vorgehensweisen werden im Folgenden detaillierter beschrieben.

2.3.1.1 *Manuelle Quantifizierung am Mikroskop*

Für eine manuelle Auszählung der Spermien am Phasenkontrastmikroskop muss das Bienenejakulat zunächst verdünnt werden, da die Spermiedichte im Sperma zu hoch für eine Zählung ist. Deshalb wurden die unbehandelten Bienenejakulate 1:100 mit BSS verdünnt, schon zuvor verdünnte Proben wurden dementsprechend mit weniger BSS versetzt. Statt BSS wurde für manche Proben auch $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$ verwendet. Dadurch rollen sich die Spermien ein und werden immotil, beides erleichtert das Zählen. Durch Rühren mit einer Pipettenspitze oder durch vorsichtiges Hoch- und Runterziehen in einer Pipette vermischten sich das Sperma und der BSS zu einer homogenen Suspension. Nach einer weiteren 1:10 Verdünnung mit BSS konnten $10\mu\text{l}$ dieser entstandenen Versuchslösung auf eine Neubauerkammer gegeben und mit einem Deckglas so abgedeckt werden, dass Newtonsche Ringe erkennbar waren. Je nach Verteilung wurden nun die Spermien in 16-32 Kleinquadraten ausgezählt. Der resultierende Durchschnittswert wurde in die folgende Formel eingetragen: $\text{MW} * 250 * \text{VF} = \text{Zellzahl} / \mu\text{l} \text{ Suspension}$. Mit diesem Wert lässt sich durch Einrechnung des Verdünnungsfaktors (VF) die Spermienkonzentration im Ejakulat berechnen. Will man die Zellzählung an einem anderen Zeitpunkt durchführen oder Rohdaten für eine spätere Überprüfung sichern, so ist es möglich Fotoaufnahmen zu erstellen und zu speichern. Allerdings sollte man dabei streng nach einem Schema vorgehen um Doppelzählungen zu vermeiden. Eine weitere Schwierigkeit ist, dass die Spermien häufig in verschiedenen Fokusebenen liegen (siehe Abb.25A). Um trotzdem alle Spermien zu erfassen müssen mehrere Aufnahmen des gleichen Bereichs mit verschiedenen Fokusebenen erstellt werden. Statt des Puffers kann auch $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$ für die Probenverdünnung genommen werden. Das vereinfacht die Handauszählung, da die Zellen in gerollter Form vorliegen und sich weniger bewegen (vgl. Abb. 25D).

2.3.1.2 *Fluoreszenzmikroskopische Quantifizierung mittels Software supported Image Quantification (SSIQ)*

Für eine computergestützte Auszählung ist ein hohes Kontrastverhältnis von Spermium und Hintergrund notwendig. Um dieses zu gewährleisten wurden die Bienenspermien mit Hoechst 33342 (H342) markiert. Dieser blau fluoreszierende Farbstoff ist gut membrangängig und färbt dementsprechend sowohl intakte als auch defekte Zellen an. Da der Farbstoff ausschließlich an die DNA bindet, markiert er nur den Kopfbereich der Spermien, was zu punkt- bis stäbchenförmigen Fluoreszenzsignalen führt und sowohl eine

manuelle als auch automatisierte Quantifizierung vereinfacht. Für weitere Informationen zum Farbstoff siehe 2.3.3.

Für die Auszählung wurden die Spermien, wie unter 2.3.1.1. beschrieben, zunächst 1:100 mit BSS verdünnt. 2µl der entstandenen Suspension wurden anschließend mit 2µl H342 (50µM) versetzt und mit 16µl BSS weiterverdünnt. Die resultierende Versuchslösung enthielt nun 1:1000 verdünntes Sperma und 5µM H342. Nach einer 20 minütigen Inkubation bei Raumtemperatur im Dunkeln, wurden 10µl der Versuchslösung in eine Neubauer-Zählkammer gegeben. Die zu zählenden Quadrate konnten dann nacheinander fotografiert werden, wobei pro Bereich ein Phasenkontrastbild und eine Fluoreszenzaufnahme erstellt und gespeichert wurden. Für die Auswertung wurden die Phasenkontrastbilder und die Fluoreszenzaufnahmen mit Hilfe von Photoshop CS4 übereinandergelegt (siehe 2.3.3.1.) und der Bereich eines Quadrates ausgeschnitten. Dieser Vorgang konnte durch Erstellung eines Makros zur Stapelverarbeitung beschleunigt werden. Danach erfolgte mit dem frei zugänglichen Programm Image J die automatisierte Auszählung. Durch optimierte Programmeinstellungen (minimale und maximale Partikelgröße; Form; Kontrastverhältnis) bei der Spermienkopfzählung wird verhindert, dass evtl. Fremdpartikel mitgezählt werden, außerdem können auch Spermien, die nicht in der Fokusebene des Bildes liegen erfasst werden, wenn die Fluoreszenz stark genug ist. Für eine detailliertere Beschreibung der ImageJ- Einstellungen bzw. der Auszählung siehe 2.3.3.2. Diese Quantifizierungsmethode kann man durch Zugabe weiterer Fluoreszenzfarbstoffe leicht mit anderen fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen kombinieren.

2.3.1.3 Fluorimetrische Zellzahlbestimmung

Die hier beschriebene Methode wurde von Herrn [REDACTED] durchgeführt und entwickelt. Auch sie beruht auf der Fluoreszenzmessung H342-markierter Spermien zur Zellkonzentrationsbestimmung. Allerdings werden keine einzelnen Spermien gezählt und anschließend durch Einrechnung von Verdünnungsfaktor und Volumen die Konzentration ermittelt. Vielmehr wird die Gesamtfluoreszenz einer Spermiesuspension an einem Fluorimeter gemessen und mit Hilfe der Geradengleichung einer zuvor entwickelten Kalibriergerade die Konzentration berechnet. Da H342 die Spermienköpfe sowohl defekter als auch intakter Spermien markiert, steht die Zelldichte in einem proportionalen Zusammenhang zur Fluoreszenzstärke. Diese Proportionalität ist natürlich durch die Messgrenzen des Gerätes auf einen bestimmten Konzentrationsbereich beschränkt. Für die Kalibrierung werden frische und zuvor gefrorene Bienenejakulate mit bekannter

Spermiendichte (bestimmt durch manuelles Auszählen siehe 2.3.1.1.) mehrfach mit BSS verdünnt und jeweils mit H342 versetzt (Endkonz. 5 μ M). Nach einer 30minütigen Inkubation im Dunkeln bei 35°C, pipettiert man dann 100 μ l in je ein Well einer vorgewärmten (35°C) 96-Well-Platte. Die Fluoreszenz wird anschließend im Fluorimeter Ascent mit einem Messinterval von 2min über einen Zeitraum von 30min. bestimmt. Der ermittelten Fluoreszenzstärken wird der Fluoreszenzwert einer reinen BSS-H342 Lösung subtrahiert, um das Hintergrundrauschen heraus zurechnen. Die Fluoreszenzstärken werden dann im Rechenprogramm Excel gegen die entsprechenden Spermiendichten, die durch manuelles Zählen am Mikroskop ermittelt wurde, aufgetragen und es wird eine Gerade samt Geradengleichung erstellt. Mit Hilfe der Gleichung können nun für Spermisuspensionen unbekannter Zellkonzentrationen aber ermittelter Fluoreszenzstärken die Spermiendichten errechnet werden.

2.3.2. Hypoosmotischer Schwelltest (HOS-Test)

Die hier beschriebene Methode wurde von Frau [REDACTED] durchgeführt und für Bienenspermien optimiert. Der HOS-Test beruht auf einer morphologischen Formveränderung als Reaktion auf ein hypoosmotisches Medium. Da nur Spermien mit intakten Zellmembranen eine solche Reaktion zeigen, kann man mittels dieses Tests den Anteil der Spermien mit intakter Plasmamembran ermitteln und damit die Qualität einer Ejakulatprobe einschätzen. Der HOS-Test ist weit verbreitet und wird vor allem in der Bewertung humaner Ejakulate häufig eingesetzt. Einige Untersuchungen weisen zudem darauf hin, dass die Resultate dieser Methode unter anderem auch Hinweise auf den genetischen Zustand von humanen Spermien zulässt (Bassiri et al., 2013; Muratori et al., 2000). Bei den hier beschriebenen Untersuchungen sollte vor allem geklärt werden, ob dieser Test auch auf Bienenspermien anwendbar ist und inwiefern er Informationen zur Qualität von Bienenproben liefert. Für den HOS-Test wurden sowohl die unverdünnten und unbehandelten Spermapools als auch die zuvor verdünnten und eingefrorenen Spermarien zunächst mit so viel Medium (BSS, Kiev- oder Harbo-Puffer) gemischt, dass alle Proben in einer 1:100 Verdünnung vorlagen. Die Spermisuspensionen wurden anschließend nochmals 1:5; 1:10 oder 1:20 verdünnt, diesmal allerdings mit H₂O_{dest.}. Nach einer 30 minütigen Inkubation bei 35°C konnte die Probe dann mikroskopisch untersucht und Spermien mit und ohne HOS-Effekt ausgezählt werden. Diese Untersuchungsmethode ist auch mit anderen mikroskopischen Analysen kombinierbar. So kann man durch Zugabe der Fluoreszenzfarbstoffe PI und H342 gleichzeitig eine Lebend-Tot-Markierung

durchführen (siehe 2.3.3.). Auch die Kombination mit einer Akrosomenfärbung wäre denkbar, wurde allerdings in diesem Rahmen nicht durchgeführt.

2.3.3. Lebend-Tot-Färbung mittels Hoechst 33342 (H342) und Propidiumiodid (PI)

„Lebend-Tot“-Färbung mittels fluoreszierender Farbstoffe ist eine gängige Analyse, die schon für Spermien verschiedener Spezies benutzt wurde. Obwohl unterschiedliche Farbstoff(e) und -kombinationen existieren, beruht die Untersuchungsmethode selbst immer auf dem gleichen Prinzip. Neben einem permeierenden Farbstoff, der meist im Kern des Spermiums bindet, wird auch ein Farbstoff zugesetzt, der nicht durch intakte Membranen lebender Zellen treten kann. Er kann somit nur Zellen mit geschädigter und damit durchlässiger Plasmamembran markieren. Als solcher „Tot“-Farbstoff wird meist Propidiumiodid (PI) (siehe Abb. 10) eingesetzt, hierbei handelt es sich um einen roten Fluoreszenzfarbstoff, der in die DNA interkaliert. Er wird mit grünem Licht bei 535nm maximal angeregt und strahlt rotes Licht bei maximal 617nm ab.

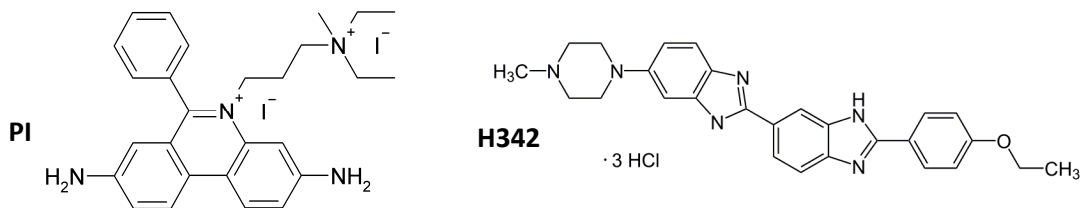


Abb.10: Strukturformeln von Propidiumiodid (PI) und Hoechst 33342 (H342).

Quelle: <http://de.wikipedia.org/wiki/Propidiumiodid> und http://de.wikipedia.org/wiki/Hoechst_33342

Für den permeierenden Farbstoff gibt es verschiedene Alternativen, so kann man z.B. SYBR-14, Calcein AM (Collins and Donoghue, 1998) oder wie in den hier beschriebenen Versuchen Hoechst 33342, dessen Strukturformel in Abb. 10 gezeigt ist, einsetzen. Alle diese Farbstoffe erzeugen in Zellen ein Fluoreszenzsignal. Das hier eingesetzte Hoechst 33342 besitzt den Vorteil, dass es erst fluoresziert, wenn es an die DNA der Zelle, genauer gesagt an die kleine Furche AT-reicher DNA-Bereiche, gebunden hat. Diese Eigenschaft bewirkt ein sehr gutes Signal-Rausch-Verhältnis. An DNA gebundenes H342 (Hoechst 33342) wird im UV-Bereich bei 355nm maximal angeregt und strahlt blaues bis cyanfarbenes Licht einer Wellenlänge von 465nm ab.

Eine vorrausgegangene Untersuchung an Eberspermien deutet auf eine toxische Wirkung hoher PI-Konzentrationen hin. Je höher die PI-Konzentration gewählt wurde, desto mehr

Zellen wiesen Plasmamembranschäden auf und waren deshalb PI-positiv. Um einen für Bienenspermien optimalen PI-Gehalt zu finden, wurden die ersten Bienenspermproben mit 3 verschiedenen PI-Konzentrationen (0,75µg/ml; 75µg/ml und 150µg/ml) versetzt und nach 15, 30 und 45 min Inkubation im Dunkeln bei 35°C untersucht. Zusätzlich wurde je einem Aliquot jeder Probe auch H342 (5µM) zugegeben um die Einflüsse der Farbstoffe aufeinander zu prüfen.

Alle folgenden Untersuchungen wurden dann mit der gleichen PI-Konzentration und auf gleicher Weise durchgeführt. Sowohl die unbehandelten Ejakulatproben als auch die eingefrorenen Spermisuspensionen wurden mit BSS bzw. einem anderen geeigneten Puffer verdünnt, so dass eine Suspension mit ca. 50000 Sp/µl resultierte, meist entsprach das einer 1:100 Verdünnung. 2µl dieser Suspension wurden dann mit 30µL BSS und 4µL H342 in BSS (5µM) gemischt. Nach einer 20 minütigen Inkubation bei 37°C im Dunkeln wurden der Probe 4µL einer PI-Lösung (1,5mg/ml) zugesetzt und vermischt (Gesamtverdünnung 1:2000). Es folgte eine weitere 15 minütige Inkubation im Dunkeln bei 37°C. Dann konnte die Probe unter einem Fluoreszenzmikroskop untersucht werden. Dafür wurden ca. 15µL auf einen Objektträger gegeben und sofort mit einem Deckglas 24x24mm abgedeckt. Um die Auswertung möglichst objektiv zu gestalten und die Ergebnisse des Versuches auch für eine nachfolgende Kontrolle festzuhalten, wurden Fotoaufnahmen von mehreren Bereichen angefertigt und abgespeichert. Zu jedem Bereich wurde mit einem 20-fachen Objektiv ein Phasenkontrastbild, ein H342-Fluoreszenzbild und ein PI-Fluoreszenzbild aufgenommen ohne den Objektträger zu verschieben. Es wurde darauf geachtet, dass insgesamt min. 200 Spermien fotografiert wurden. Diese Fluoreszenzmarkierung ist gut mit weiteren mikroskopischen Analysen/ Anfärbungen kombinierbar.

2.3.3.1 Bearbeitung erstellter Aufnahmen mittels Photoshop CS4

Eine automatisierte Zählung mittels Software Supported Image Quantification (SSIQ, siehe Peters et al., 2002) erfordert eine vorrausgehende Bildbearbeitung, diese wurde mit dem Programm Adobe Photoshop CS4 durchgeführt. Zwar werden für die SSIQ-Auswertungen nur die Fluoreszenzbilder benötigt, allerdings ist es sinnvoll für eine manuelle Kontrolle auch die Phasenkontrastbilder verfügbar zu haben; nur sie ermöglichen im Nachhinein die genaue Zuordnung der Fluoreszenzsignale zu den entsprechenden Strukturen. Für die Bearbeitung im Photoshop CS4 werden zunächst 3 Bilder pro Bereich (1 Phasenkontrast, 1 für die PI-Rotfluoreszenz, 1 für die H342-Blafluoreszenz) hochgeladen und in den RGB-

Modus überführt. Danach werden die Rotfluoreszenzbilder mit Hilfe des Kanalmixers rot und die Blaufluoreszenzbilder blau eingefärbt. Im Anschluss erfolgt die Tonwertkorrektur aller Fluoreszenzbilder, mit der man die qualitative und quantitative Stärke des Leuchtens verändern kann. Dabei dürfen nur der weiße und der schwarze Regler bewegt werden, da man sonst das Verhältnis der Bildabschnitte zueinander und damit das Ergebnis manipuliert. Außerdem müssen alle Fluoreszenzbilder der gleichen Sorte innerhalb eines Versuchs gleich behandelt werden. Das Phasenkontrastbild bleibt meist unbearbeitet, wenn erforderlich kann man jedoch Helligkeit und Kontrast anpassen. Nach der Bearbeitung der einzelnen Aufnahmen werden diese übereinander gelegt und mit dem Befehl „umgekehrtes Multiplizieren“ zu einem Bild verarbeitet. Die ursprünglich einzelnen Bilder ergeben jetzt eines, das aus 3 Ebenen besteht. Durch das „ausblenden“ der einzelnen Ebenen kann man verschiedene Bildkombinationen erhalten. Man bekommt z.B. ein reines Fluoreszenzbild, also mit Blau- und Rotfluoreszenzsignalen, wenn man das Phasenkontrastbild ausblendet. Dieses kann man dann im Jpeg-Format für die SSIQ-Auswertung abspeichern. Genauso verfährt man mit dem reinen Rotfluoreszenzbild. Das gesamte Bild mit den 3 Ebenen kann man für eine eventuell später stattfindende Kontrolle als Photoshop-Datei (PSD) abspeichern. Um die Arbeitsschritte der Bildbearbeitung zu beschleunigen, kann man unter dem Menüpunkt „Aktionen“ ein eigenes Makro aufnehmen, das alle oben aufgeführten Vorgänge automatisch durchführt. Zum einen ist die Zeitersparnis immens hoch und zum anderen wird die Tonwertkorrektur, wenn sie einmal eingestellt wurde, nicht mehr verändert, was eine ungewollte Ergebnismanipulation verhindert.

2.3.3.2 SSIQ-Auswertung mittels Image J

ImageJ ist ein auf Java basierendes kostenloses Programm, dessen source code frei zugänglich ist und von jedermann bearbeitet werden darf (open source program). Dementsprechend ist eine Vielzahl an verschiedenen Plugins auf der Image J-Homepage zu finden, insbesondere existieren viele Plugins für medizinische und wissenschaftliche Bildauswertungen. Für die hier beschriebene Software unterstützte Bildauswertung, bei der es sich um eine reine Signalzählung handelt, ist allerdings die Grundversion des Programmes ausreichend. Um den prozentualen Anteil PI-markierter Spermien zu erhalten, müssen zu jedem Bereich zwei Bilder ausgewertet werden. Während das Fluoreszenzbild mit beiden (H342/PI) Fluoreszenzsignaltypen die Information der Gesamtanzahl der Spermien enthält gibt das reine PI-Fluoreszenzbild Aufschluss über den Anteil PI-markierter Spermien. Damit lässt sich dann der %-Teil errechnen. Bevor die Fluoreszenzsignale

Material und Methoden

ausgezählt werden können, müssen die Bilder in den 32-bit Modus gebracht werden, danach werden über den Menüpunkt „Treshold“ die Grenzen der zu erfassenden Signalstärken festgelegt (siehe Abb.11 A und B). Diese Einstellung muss für jeden Bildstapel nur einmal vorgenommen werden.

Über die Funktion „ Analyse Partikels“ wird dann der Grad der Zirkularität, die minimale und maximale Größe der zu zählenden Signale bestimmt (Abb.11 C) und die Art der Ergebnisdarstellung ausgewählt (Abb. 11 D). Sind alle Einstellungen gewählt, werden die Fluoreszenzsignale ausgezählt und das Ergebnis wird in einer Tabelle eingefügt. Die Erstellung eines eigenen „Macros“ ermöglicht es ganze Bildserien in wenigen Sekunden auszuwerten. Die Ergebnisse liegen in Form einer Excel-kompatiblen Tabelle vor. Um diese Methode zu validieren wurden mehrere Bildstapel zusätzlich von Hand ausgezählt und die Ergebnisse verglichen.

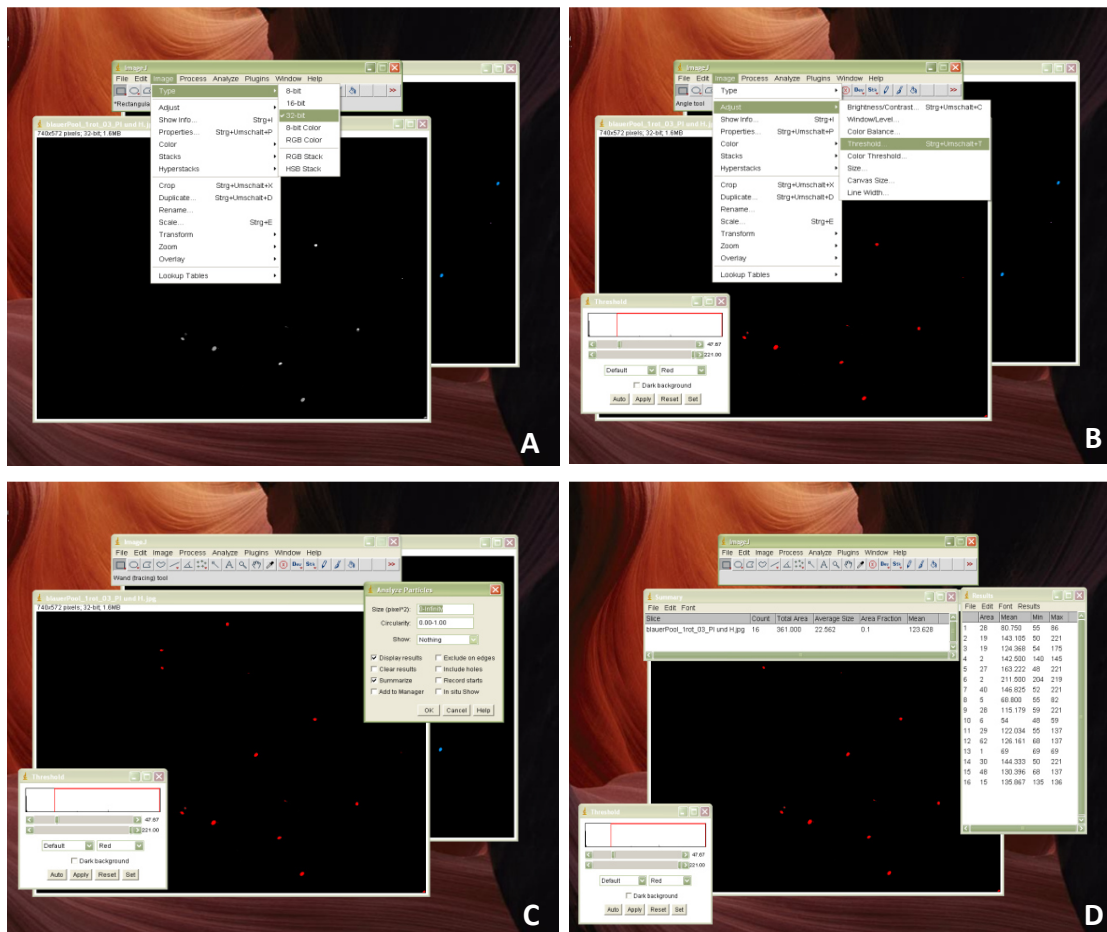


Abb.11: Automatisierte Quantifizierung von Spermien mittels Image J. Die Arbeitsschritte werden in chronologischer Reihenfolge dargestellt. A) Auswahl des Bildtyps; B) Grenzwertsetzung; C) Analysenwahl und Parameter; D) Ergebnisdarstellung

2.3.4. Vergleichende Aktivitätsmessung der Glukose-Phosphat-Isomerase (GPI)

Eine intakte Plasmamembran ist für die Funktion von Spermien essentiell. Sowohl Kälteeinwirkung als auch toxische Effekte kryoprotektiver Substanzen, sowie osmotisch bedingter Stress, können Membrandefekten verursachen und so die Fruchtbarkeit der Spermien reduzieren. Der GPI-Test beruht auf dem Prinzip, dass das Enzym Glucose-6-phosphat-Isomerase als diffusibles Enzym im Zellplasma vorliegt und nicht durch intakte Plasmamembranen treten kann. Membrandefekte machen das Enzym einem Aktivitätstest zugänglich.

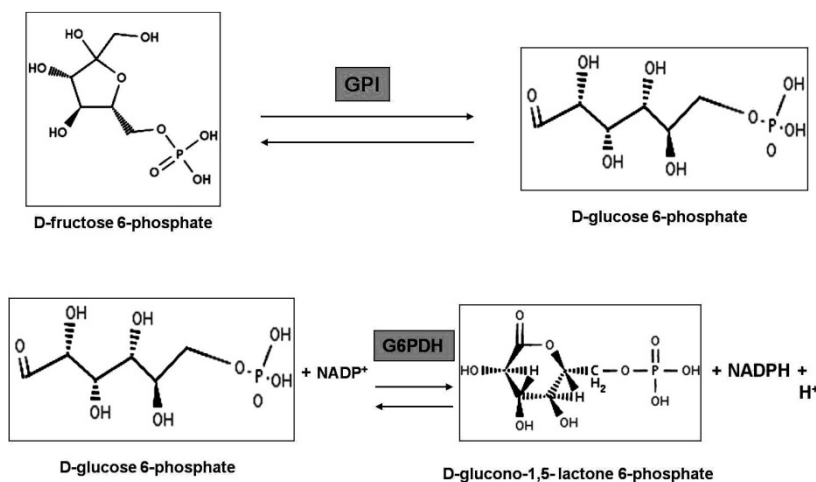


Abb.12: Schematische Darstellung der während des GPI-Tests stattfindenden Reaktionen. Eigene Zusammenstellung; Strukturformeln aus versch.

Quellen: <http://www.chemnet.com>; <http://ezcatdb.cbrc.jp/EzCatDB/>; <http://www.ecmdb.ca/>

Bei diesem Messverfahren wird die extrazellulär messbare und die maximale GPI-Aktivität mit Hilfe des Hilfsenzym Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase (G6PDH) über die Zunahme an dem reduzierten Coenzym (NADPH+H⁺) fluorimetrisch ermittelt (siehe Abb. 12). Dabei wird bei 340nm angeregt und die Emission bei 538nm gemessen. Um die maximale GPI-Aktivität derselben Probe zu ermitteln, werden in einem Aliquot der Versuchsprobe vor Messung alle Membranen durch Ultraschalleinwirkung zerstört (min. 5x5sek.) und die gesamte Glucose-6-Phosphat-Isomerase für den Test zugänglich. Während der Sonifierbehandlung wird die Probe in Eis gekühlt um eine zu starke Temperaturerhöhung zu verhindern.

Der durch die NADPH+H⁺-Zunahme bedingte lineare Abschnitt der Fluoreszenzsteigerung wird für die Berechnung der Enzymaktivität verwendet. Das kinetische Modul des Fluorimeters berechnet für eben diesen linearen Bereich die Steigung ($\Delta\text{RFU min}^{-1}$), mit der

dann die enzymatische Aktivität U/ml (U = Unit; 1 Unit entspricht der Enzymaktivität, die nötig ist um 1µMol Substrat in einer Minute umzusetzen) errechnet werden kann. Je höher der Koeffizient aus GPI-Aktivität /GPI-Aktivität max., der Wert liegt immer zwischen 0 und 1, desto mehr Spermien besitzen Membrandefekte. Die Ergebnisse werden meist relativ zu der maximalen Enzymaktivität, als Prozentsatz oder als Dezimalwert angegeben.

Für die GPI-Messungen wurden die Spermaproben stets 1:1000 mit BSS oder einem dem Versuch entsprechenden Puffer verdünnt. Die Messungen wurden in 96-Well Platten vorgenommen um Probenvolumen zu sparen und mehrere Bienenspermien suspensionen zeitgleich untersuchen zu können.

Tab.21: Zusammensetzung und Durchführung des GPI-Tests.

Komponente	Einsatzkonzentration	Testkonzentration	Einsatzvolumen [µl]	
TRA-Puffer	215mM	85mM	40	Mastermix 60µl
Mg-Acetat	200mM	20mM	10	
NADP+	4mM	0,4mM	10	
G6PDH	4,6U/ml	0,46U/ml	10	
Spermien-suspension	1:1000 Verd.	1:10000/ 1:5000 Verd.	10/20	
H ₂ O _{dest.}			10/-	
<ul style="list-style-type: none"> • 30sec. Schütteln, dann Vorlauf 5 min.; bei 35°C 				
Fructose-6-Phosphat	14mM	1,4mM	10	
Gesamtvolumen		100µl		
<ul style="list-style-type: none"> • Messung bei 35°C, λexc. 340nm, λem 538nm, alle 30sec. 5 min lang 				

2.3.5. Vergleichende Aktivitätsmessung der Isocitrat-Dehydrogenase (ICDH).

Dieser Enzym-Aktivitätstest wurde von Herrn [REDACTED] für Bienenspermien optimiert und getestet. Der ICDH-Test (siehe Abb. 13, bzw. Testzusammensetzung in Tab. 22) verläuft nach dem gleichen Messprinzip, wie der GPI-Test, auch hier wird die extrazellulär messbare und maximale Enzymaktivität über Zunahme an reduziertem Coenzym ermittelt. Sowohl die Sonifier-Behandlung des Aliquots für die Messung der maximalen Aktivität, als auch die Fluoreszenzmessung verlaufen gleich zur GPI-Messung. Der einzige große

Unterschied ist, dass die zu messende NADP⁺-abhängige Isocitrat-Dehydrogenase (EC 1.1.1.42) kein rein cytoplasmatisches Enzym ist wie die GPI, sondern teilweise im Lumen der Mitochondrien vorliegt und dem Citratzyklus angehört. Deshalb liefert diese Messmethode auch Informationen über den Zustand der Mitochondrien.

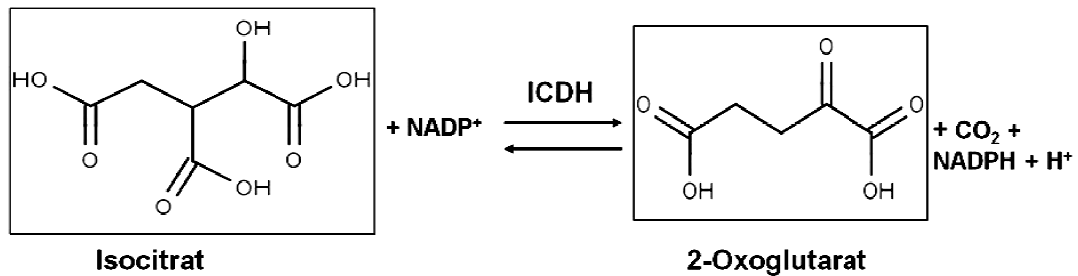


Abb.13: Schematische Darstellung der während des ICDH-Tests stattfindenden Reaktionen.

Zusammenstellung; aus versch. Quellen z. B.:

<http://www.scbt.com/datasheet-253302.html>; <http://www.ebi.ac.uk/chebi/searchId.do?chebiId=CHEBI:16810>

Auch die Berechnungen sind die Gleichen, wie beim GPI-Test. Es wird wieder der lineare Abschnitt der Fluoreszenzzunahme für die Berechnung der Steigung ($\Delta\text{RFU min}^{-1}$) und der Enzymaktivität verwendet (siehe 2.3.4). Je höher der Koeffizient aus ICDH-Aktivität /ICDH-Aktivität max., der Wert liegt immer zwischen 0 und 1, desto mehr Spermien besitzen theoretisch Mitochondriendefekte. Da das Enzym allerdings auch z.T. zytoplasmatisch vorliegt, sind die Gegebenheiten deutlich komplizierter. Die Ergebnisse werden immer relativ zu der maximalen Enzymaktivität, als Prozentsatz oder als Dezimalwert angegeben.

Tab.22: Zusammensetzung des ICDH-Tests.

Komponente	Einsatzkonzentration	Testkonzentration	Einsatzvolumen [μl]	
TRA-Puffer	300mM	150mM	50	Mastermix 60 μl
Mg-Acetat	200mM	20mM	10	
NADP+	5mM	0,5mM	10	
Spermien-suspension	1:1000 Verd.	1:10000/ 1:5000 Verd.	10/20	
H ₂ O _{dest.}			10/-	
<ul style="list-style-type: none"> • 30sec. Schütteln, dann Vorlauf 5 min.; bei 35°C 				
Isocitrat	250mM	25mM	10	
Gesamtvolumen		100 μl		
<ul style="list-style-type: none"> • Messung bei 35°C, $\lambda_{\text{exc.}}$ 340nm, λ_{em} 538nm, alle 30sec. 5 min lang 				

2.3.6. Motilitätsanalyse

Auch die Spermienmotilität wird als mögliches Qualitätskriterium betrachtet. Bei vielen Nutztierarten wird die Motilität der Spermien schon als wichtiger Indikator für die Spermaqualität standardisiert gemessen. Es existieren mehrere CASA (computer assisted sperm analysis)-Systeme, mit deren Hilfe schnell und objektiv ganze Probenserien untersucht werden können. Bei all diesen Mikroskop-basierten Systemen werden die Spermienköpfe erkannt und in ihrer Bewegung verfolgt (siehe Abb. 14). Diese Systeme können sogar die Kopfposition relativ zum Flagellum messen und damit den Ausschlagwinkel. Die verschiedenen Parameter einer solchen Bewegungsanalyse werden in Abb. 15 veranschaulicht.

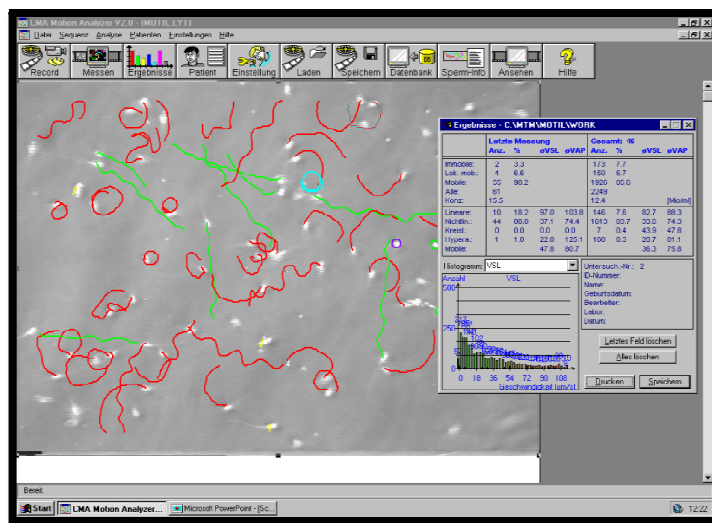


Abb.14: Bewegungsanalyse mittels CASA. Beispielhaftes Ergebnis einer Motilitätsanalyse, die an einer Eberspermienprobe mit Hilfe des CASA-Programmes durchgeführt wurde. Das Programm erkennt und verfolgt in einer Phasenkontrast-Videoaufnahme bzw. im Phasenkontrast-Livebild die zum Hintergrund relativ hellen Spermienköpfe und errechnet so Anteil und Art der motilen Spermien in der Probe. Bei der Ergebnisanzeige werden verschiedene Motilitätstypen mit unterschiedlichen Farben markiert, um die Übersichtlichkeit zu steigern.

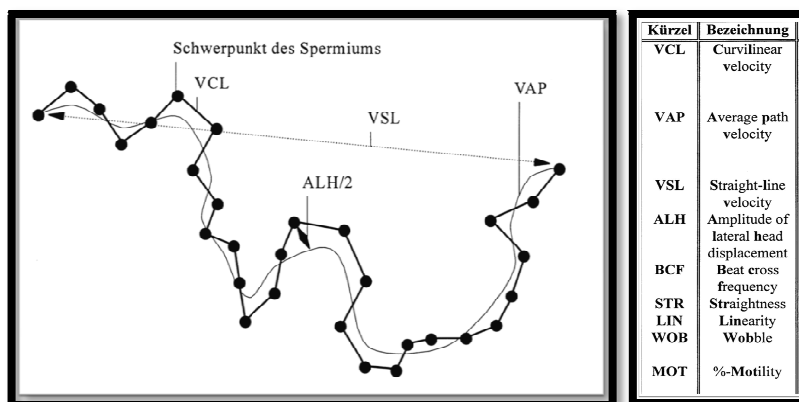


Abb.15: Parameter der CASA-Analyse. Verschiedene Parameter, die während der CASA-Bewegungsanalyse ermittelt werden.

Bei Bienenspermien funktionieren diese Programme allerdings nicht, da die Köpfe der Spermien sich morphologisch nicht ausreichend vom Flagellum abheben. Zusätzlich zu der bisher einzigen Methode zur Motilitätsbewertung von Bienenspermaproben, der manuellen Zählung bzw. Schätzung, die über den gesamten Projektzeitraum als Kontrolle durchgeführt wurde, konnte eine neue Methode entwickelt werden. Dieses computergestützte Verfahren wird unter 2.3.6.3. vorgestellt.

2.3.6.1 Manuelle Bewegungsanalyse mittels Phasenkontrastmikroskopie (LIB)

Für die manuelle Zählung bzw. Schätzung wurden die Spermaproben mit BSS oder Kiev-Puffer verdünnt (1:300/1:1000/1:2000 Gesamtverdünnung) und 30 Minuten bei 35°C inkubiert. Danach wurden 10µl der Versuchsprobe auf einen Objektträger gegeben und mit einem Deckglas (18x18mm) abgedeckt. Die Untersuchung erfolgte am Phasenkontrastmikroskop. Es wurden 200 Spermien ausgezählt und die Anzahl motiler und immotiler Spermien ermittelt. Um den Spermien mehr freien Raum für ihre Bewegungen zu lassen wurden die Proben z.T. auch in Leja-Kammern untersucht. In diesen Kammern mit einer Höhe von 0,02mm können sich die Spermien freier bewegen.

2.3.6.2 Fluoreszenzmikroskopische Bewegungsanalyse mittels Langzeitbelichtungsbilder

Für diese Art der Motilitätsanalyse werden die Bienenspermien mit H342 versetzt, wodurch alle Spermienköpfe als blaue Fluoreszenzsignale erkennbar werden. Mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops und einer angeschlossenen Kamera können nun Fluoreszenzbilder mit unterschiedlicher Belichtungsdauer aufgenommen werden. Je länger man die Belichtungszeit wählt, desto stärker sind die Fluoreszenzsignale auf den Bildern. Außerdem erzeugen bei langen Belichtungszeiten bewegliche Spermien Lichtbahnen, während immotile Spermien nur Lichtpunkte hervorrufen, so kann man durch nachträgliche Betrachtung und Zählung die Motilität der Probe auswerten. Zuerst wurden Eberspermien für diese Art der Bewegungsanalyse verwendet. Die Eberspermien wurden für dieses Verfahren 1:50 mit BTS verdünnt und mit 5µM H342 versetzt. Nach einer 30 minütigen Inkubation im Dunkeln bei 37°C konnte die Probe am Fluoreszenzmikroskop untersucht werden.

Die Proben wurden für diese Analyse 1:1000/1:2000 mit BSS verdünnt und mit 5µM H342 versetzt. Nach einer 30 minütigen Inkubation bei 37°C im Dunkeln befüllte man eine vorgewärmte Leja-Kammer mit ca. 2,3µL. Während der Untersuchung am Fluoreszenzmikroskop wurde die Probe von dem beheizbaren Objektträgertisch durchgehend auf 37°C gehalten. Es wurden Aufnahmen mit unterschiedlichen Belichtungszeiten (4000ms/6000ms/8000ms) gemacht und abgespeichert. Der Anteil motiler Spermien wurde nachträglich auf den Bildern ausgezählt.

2.3.6.3 Fluoreszenzmikroskopisches computergestütztes neues Verfahren – CASAnova –

Dieses von AMP-Lab GmbH im Rahmen des vorgestellten LaBis Projektes neu entwickelte Verfahren zur Motilitäts-Analyse von Bienenspermien nutzt auch den Fluoreszenzfarbstoff H342. Allerdings werden bei dieser Methode keine Bilder aufgenommen und es findet auch keine subjektive Zählung durch einen Mitarbeiter statt, vielmehr wertet ein neuartiges Computerprogramm CASAnova die Bewegung der Fluoreszenzsignale aus. CASAnova kann Proben sowohl direkt analysieren (Liveauswertung), als auch anhand kurzer Filmsequenzen im Nachhinein. Es wertet sekundenschnell eine Probe aus und erfasst dabei mehrere wichtige Qualitätskriterien, wie Zelldichte, Anteil motiler Spermien, Art der Bewegungen und Grad der Agglutination.

Auch für diese Motilitätsanalyse wurden die Bienenspermien 1:1000/1:2000 mit BSS verdünnt, mit 5µMH342 versetzt und 30 Minuten bei 35°C im Dunkeln inkubiert. Pro Probe wurden 2,3µl in je eine vorgewärmte Leja-Kammer gegeben und mit einem Fluoreszenzmikroskop mit Kamera durch CASAnova analysiert. Da CASAnova kein Spezies-spezifisches Programm ist, mussten die Analyseinstellungen für die relativ langsamen Bienenspermien erst optimiert werden.

2.3.7. Korrelationen der bisherigen Ergebnisse

Um herauszufinden welche der Untersuchungsmethoden verlässliche Ergebnisse liefert, mit denen die Spermaqualität bewertet werden kann, wurden die Analysenergebnisse untereinander und mit *in vivo* Daten aus den zugehörigen Inseminationsversuchen verglichen und auf Zusammenhänge (Korrelationen) hin untersucht. Pearson Korrelationskoeffizienten wurden für die DMSO-Konzentrationen und die Ergebnisse der verschiedenen *in vitro* Tests, sowie für die Ergebnisse der Lebend-Tot-Färbung mit den Ergebnissen der anderen Analysen berechnet.

$$r = \frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})}{\sqrt{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2} \cdot \sqrt{\sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2}}$$

Abb.16: Formel zur Berechnung des Korrelationskoeffizienten r, der das Maß der linearen Abhängigkeit zweier Merkmale angibt.

Quelle: http://www.statistics4u.info/fundstat_germ/cc_corr_coeff.html

Bei der Pearson Korrelation wird stets ein linearer Zusammenhang zwischen den zwei untersuchten Merkmalen vorausgesetzt und der Korrelationskoeffizient r gibt das Maß der linearen Abhängigkeit an, nicht aber die kausalen Zusammenhänge (Formel siehe Abb. 16). Der r-Wert liegt immer zwischen -1 und +1, je näher der r-Wert an Null liegt, desto weniger korrelieren die Merkmale. Bei r=0 existiert keinerlei Korrelation, auch bei Werten nahe Null muss durch einen T-Test festgestellt werden, ob eine Korrelation vorliegt. Deshalb wurde für alle Korrelationskoeffizienten anschließend ein T-Test durchgeführt. Bei $p > 0,05$ korrelieren die Merkmale nicht signifikant und man bleibt bei der Hypothese $r=0$, bei $p < 0,05$ dagegen liegt eine signifikante Korrelation vor.

Für die Korrelationsberechnungen der *in vivo* Daten mit den verschiedenen *in vitro* Ergebnissen wurde die Spearman-Rangkorrelationsberechnungen verwendet. Dafür wurden zunächst alle X und Y Werte ihrer Größe nach sortiert und jedem Wert eine Rangzahl zugeordnet. Der Korrelationskoeffizient wurde anschließend mit diesen Rangzahlen ermittelt. Eine Bonferroni-Korrektur diente der Neutralisierung der Alphafehler-Kumulierung.

2.3.8. DNA-Integritätstests

Es ist sinnvoll neben den üblichen von der WHO empfohlenen Qualitäts-Parametern, wie Motilität, Morphologie und Spermienkonzentration im Ejakulat, auch die Integrität des genetischen Materials zu überprüfen. Die DNA-Integrität ist unerlässlich für die erfolgreiche Entwicklung gesunder Nachkommen und wird deshalb vor allem in der Humanmedizin seit vielen Jahren intensiv untersucht. Ein hoher Anteil DNA-geschädigter Spermien gilt in der Reproduktionsmedizin als möglicher Hauptgrund für undiagnostizierte Infertilität. Befruchtungen mit DNA-fragmentierten Spermien führen häufiger zu Schwangerschaftsabbrüchen, schlechterer Embryonalentwicklung und erhöhtem Risiko für ein späteres Krebsleiden. Deshalb werden in der Humanmedizin parallel zur steigenden Bedeutung von künstlicher Befruchtung (AI) und *in vitro* Fertilisation (IVF) auch die DNA-Integrität und

DNA-schädigende Faktoren verstärkt erforscht. Es wurden mehrere mögliche Ursachen für DNA-Schäden erkannt, z.B. fehlerhaftes Packen des Chromatins noch während der Spermatogenese, defekte Apoptosevorgänge und umweltbedingte Toxine, wenn die Spermien oder der ganze Organismus den schädigenden Einflüssen länger ausgesetzt ist und/oder das Toxin in hoher Konzentration vorliegt (Chohan et al., 2006; Sun et al., 1997). Auch eine übermäßige Produktion und/oder verstärkte Einwirkung von reaktiven Sauerstoffverbindungen (ROS- reactive oxygen species) können neben Membranschäden auch DNA-Defekte hervorrufen (Duru et al., 2000). Da das Hauptziel dieses Projektes die erfolgreiche Bienenspermienkonservierung mittels Einfrieren ist und mit einer Kryokonservierung meist auch eine erhöhte ROS-Belastung einhergeht, was wiederum das Risiko für DNA-Schäden erhöht, ist die Überprüfung des DNA-Zustandes erforderlich.

Es wurden mehrere für humane Spermien entwickelte DNA-Tests betrachtet und auf ihre Anwendbarkeit an Bienenspermien hin überprüft. Im Folgenden werden die einzelnen Untersuchungsmethoden detaillierter vorgestellt.

2.3.8.1 *Acridinorange Test (AOT) und Sperm Chromatin Structure Assay (SCSA)*

Der AOT, sowie der SCSA machen sich die dichromatischen Eigenschaften des Fluoreszenzfarbstoffes Acridinorange, Strukturformel siehe Abb. 17, zu Nutze. Bindet Acridinorange an dsDNA, so besitzt der entstandene Farbstoff-DNA-Komplex ein Absorptionsmaximum bei 502nm und emittiert grünes Licht einer Wellenlänge von 526nm. Bindet der Farbstoff jedoch an denaturierte ssDNA oder RNA, so wird er bei 460nm maximal angeregt und strahlt rotes Licht einer Wellenlänge von 650nm ab. Der Farbstoff wird deshalb auch zur Unterscheidung von DNA und RNA verwendet.

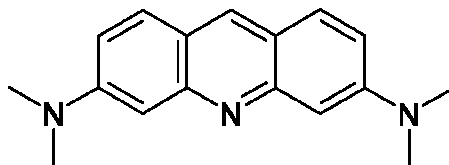


Abb.17: Strukturformel des Farbstoffes Acridinorange.

Quelle: <http://de.academic.ru/dic.nsf/dewiki/28811>

Die Spermien werden für den AOT, sowie für den SCSA, bestimmten Stressfaktoren, wie Hitze oder Säure, ausgesetzt und dann durch Acridinorange angefärbt. Je anfälliger die Spermien-DNA für Hitze- und/oder Säureeinwirkung ist, desto mehr denaturierte ssDNA ist

vorhanden und desto mehr Rotfluoreszenz ist messbar bzw. mikroskopisch erkennbar. Am praktischsten und schnellsten funktioniert die Auswertung mit Hilfe eines Durchflusszytometers, es ermöglicht eine schnelle und aussagekräftige Bewertung des DNA-Zustandes einer Spermienprobe. Das Durchflusszytometer gibt den DFI-Wert an, den sogenannten DNA Fragmentations Index, der aus dem Quotienten Rotfluoreszenz/Rot- und Grün-Fluoreszenz resultiert und zwischen 0 und 1 liegt. Findet die Auswertung mit einem Durchflusszytometer statt, nennt man den Test SCSA – Sperm Chromatin Structure Assay. Dieser ist im Gegensatz zum reinen AOT, der nur am Fluoreszenzmikroskop durchgeführt wird, eine standardmäßige Methode und korreliert mit dem TUNEL- und SCD-Test (Chohan et al., 2006). Der AOT dagegen zeigte bei den Versuchen von Chohan et al. (2006) keine gute Korrelation mit den anderen Verfahren zur Messung der DNA-Integrität.

Da für die durchgeführten Versuche kein Durchflusszytometer zur Verfügung stand, musste auf den AOT zurückgegriffen werden. Die Ergebnisse wurden sowohl rein fluoreszenzmikroskopisch betrachtet, als auch z.T. am Fluorimeter gemessen. Für die AOT-Vorversuche, die zeigen sollten, ob der Test für eine standardisierte Durchführung mit Bienenspermien geeignet ist, wurden zunächst Eberspermien verwendet. Erst wenn der Test sich bewährt hätte, wäre man auf Bienenspermien umgestiegen. Der AOT wurde weitgehend nach Angaben von Nicoletti und Mannucci (1998) durchgeführt. Dafür wurden die Eberspermaproben zunächst 1:10 PBS verdünnt. Die Zellen in dieser Spermiesuspension wurden im Anschluss gewaschen, dafür wurden 1ml der Suspension bei 200g 5 min lang zentrifugiert und das Pellet anschließend in 1ml PBS resuspendiert. Zu dieser der entstandenen Suspension wurden 9 ml einer eisgekühlten Fixierungslösung (1% Paraformaldehyd in PBS) gegeben und vermischt. Nach einer 15 minütigen Inkubation auf Eis fanden zwei weitere Zentrifugationsschritte statt (je 5 min lang bei 200g). Nach der ersten Zentrifugation wurde das Pellet in 5ml PBS und nach dem zweiten Waschschrift in 1ml PBS resuspendiert. Der Probe wurden dann 9 ml eisgekühlter 70%iger Ethanol zugesetzt. Die Inkubation fand auf Eis statt und dauerte min. 4 Stunden. Nach einem weiteren Waschen (Zentrifugation 5min bei 200g) wurde das Pellet in 500µl PBS aufgenommen und mit 500µl HCL 0,1M versetzt. Die Inkubation wurde mit nur 30-45sek. kurz gehalten und wurde bei Raumtemperatur durchgeführt. Anschließend wurden der Probe 2ml Acridinorange-Färbelösung (6µg/ml) zugesetzt, es resultierte eine Farbstoffkonzentration von 4µg/ml. Die Probe wurde dann am Fluoreszenzmikroskop mit entsprechenden Filter (13 Anregung bei 450-490nm) untersucht. Da die am Mikroskop angeschlossene Kamera keine Farbaufnahmen erstellen kann, musste die Auswertung direkt am Mikroskop erfolgen. Bilder wurden trotzdem erstellt und abgespeichert,

allerdings war es nicht möglich diese nachträglich für eine Farbdifferenzierung und Quantifizierung zu verwenden. Laut Chohan et al. (2006) korreliert der AOT mit dem TUNEL- und dem SCD-Assay und lässt eine zuverlässige Fertilitätsprognose zu, deshalb wurde er als möglicher DNA-Integrationsstest für Bienenspermien ausprobiert.

2.3.8.2 Sperm Chromatin Dispersion Assay (SCD)

Der Sperm Chromatin Dispersion Assay ist eine noch relativ neue Methode, die sich auf das Prinzip, dass in Agarosegel eingebettete Spermien, die mit Lyselösung behandelt und deproteinisiert wurden nach DNA- Anfärbung sog. „Halos“ aufzeigen, stützt. Chohan et al. (2006) und Zhang et al., (2010) konnten zeigen, dass der SCD gut mit den etablierten Methoden TUNEL und SCSA korreliert und den Grad der DNA-Schädigung mit mindestens gleicher Sensitivität anzeigt. Während unfragmentierte intakte DNA große Halos ausbildet, entstehen durch fragmentierte DNA je nach Grad der Beschädigung nur kleine bzw. keine Halos. Dabei ist es egal, welcher DNA-Farbstoff verwendet wurde. Für diesen Test können verschiedene DNA-Farbstoffe, wie z.B. H342, DAPI, PI oder Methylenblau verwendet werden, was den Test variabler macht. Das Phänomen der Halos kommt zu Stande, weil unfragmentierte DNA nach Säuredenaturierung und Deproteinierung in Schlaufen vorliegt, die, wenn sie durch einen Fluoreszenzfarbstoff markiert sind, ausgedehnte charakteristische „Lichthöfe“ produzieren. Handelt es sich jedoch um fragmentierte DNA, so werden keine oder nur kleine DNA-Schlaufen bzw. Lichthöfe gebildet.

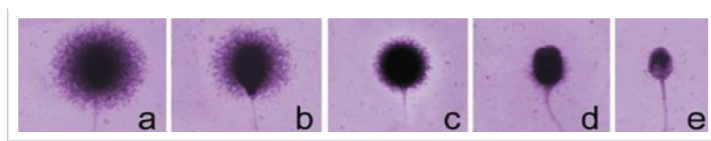


Abb.18: Durch Methylenblau angefärbte Humanspermien, an denen ein SCD-Test durchgeführt wurde. Die Einzelabbildungen 18a-e zeigen jeweils ein humanes Spermium mit unterschiedlich stark ausgebildetem Halo.

Quelle: Cortes-Gutierrez et al., 2007

Abb. 18 zeigt mit Methylenblau angefärbte Humanspermien nach Denaturierung und Deproteinierung, eingebettet in Agarosegel. In Abb. 18a und 18b sind deutliche Halos erkennbar, die um den Spermienkopf liegen und diesen viel größer erscheinen lassen. In Abb.c und 18d sind nur noch ansatzweise solche Farbhöfe zu sehen, die Spermienköpfe wirken weitaus konzentrierter und kleiner. Der Spermienkopf in Abb. 18e weist keinerlei Halo auf und wirkt weder angefärbt noch vergrößert.

Um diese Methode auf ihre Eignung als Qualitätsassay für (Bienen-)Spermaproben hin zu überprüfen, wurden erst nur Eberspermien verwendet. Das konnte den Verbrauch von sowieso nur in begrenzten Mengen vorhandenem Bienensperma verringern und erlaubte ausgedehnte Vorversuche. Methode wurden nach den Angaben von Carretero et al. (2012) und dem Versuchsprotokoll von Fernandez et al. (2003) durchgeführt. Die Zusammensetzungen der benötigten Puffer und Lösungen sind unter Kapitel 2.2.2.2. zu finden.

Zunächst wurden gereinigte Standard-Objektträger mit 0,65%igem Agarosegel überschichtet. Dafür wurde die noch flüssige Agaroselösung (50µl pro Objektträger) auf die Objektträger pipettiert und sofort mit einem Deckglas gleicher Größe abgedeckt. Die so behandelten Objektträger mussten anschließend 20-30min bei 37°C aushärten, bevor die Deckgläser entfernt werden konnten. Danach wurden die zu untersuchenden Spermisuspensionen (1:20 oder 1:50 Verdünnung des Ejakulats) vorgewärmt (37°C) und mit flüssiger 1%iger Low Melt-Agaroselösung gemischt, dass eine 0,7%ige Agarosegel-Spermisuspension entstand. Während der Mischung musste eine Temperatur von 37°C gehalten werden, um ein vorzeitiges Aushärten des Agarosegels zu verhindern. Je 20µl dieser Gelsuspension wurden dann auf die vorbeschichteten Objektträger gegeben und mit einem Deckglas (22x22mm) abgedeckt. Nach der Aushärtung (4min bei 4°C) wurden die Deckgläser vorsichtig entfernt, hierbei ist es wichtig die Gelschichten nicht zu beschädigen. Für die Objektträger erfolgte anschließend eine 7 Minuten lange Inkubation in 17°C warmer Denaturierungslösung (0,08N HCl), in horizontaler Lage. Im Anschluss wurden sie, wieder horizontal, für 10 min bei Raumtemperatur (ca. 20°C) in Lysepuffer I und nachfolgend für 5 min bei gleicher Temperatur in Lysepuffer II gelegt. Die Objektträger wurden daraufhin in TRIS-Borat-Puffer transferiert und in diesem für 2 min bei Raumtemperatur inkubiert. Zur Dehydrierung wurden alle Objektträger dann in Folge je 2 min in 70%, 90% und 100% Ethanol gelegt. Vor der DNA-Färbung wurden sie anschließend an der Luft getrocknet. Für die DNA-Markierung wurden die Objektträger mit 5µM H342 oder DAPI (2µg/ml) überschichtet und mit je einem Deckglas abgedeckt. Sie konnten nach 10-15min mikroskopisch untersucht werden.

2.3.8.3 *Terminal deoxynucleotidyl transferase - mediated deoxy-uridine-triphosphate – Nick End Labeling (TUNEL)*

Bei diese Methode werden sowohl Einzel- als auch Doppelstrangbrüche der DNA markiert, indem an freie 3'-OH- Enden mittels terminaler Deoxynucleotidyl-Transferase (tDT) modifizierte Nucleotide (UTP) gebunden werden. Diese Modifikationen können z.B.

gekoppeltes Biotin oder Fluorescein sein. Je fragmentierter die DNA ist, desto mehr freie 3'-OH- Enden existieren und desto stärker wird das Signal des an UTP gekoppelten Farbstoffes. Generell ist diese Methode an Zellausstrichen, sowie mit Zellsuspensionen anwendbar. Die Auswertung kann neben einem Durchflusszytometer, womit viele Proben innerhalb kurzer Zeit untersucht werden können, auch mit einem Fluoreszenzmikroskop erfolgen. Der TUNEL-Test ist ein gut etabliertes Verfahren, das für humane und Spermien anderer Spezies standardmäßig eingesetzt wird.

Die TUNEL-Versuche wurden, wie alle DNA-Integritätstests zunächst an Eberspermien und erst im weiteren Verlauf an Bienenspermien durchgeführt. Mit Spermien suspension durchgeführte TUNEL-Assays zeigten in ersten Vorversuchen kein gutes Signal-Rausch-Verhältnis, weshalb alle Untersuchungen an Zellausstrichen durchgeführt wurden. Für das Verfahren wurde ein TUNEL-Kit mit an Fluorescein gekoppeltem UTP der Firma Roche Diagnostics (Mannheim) verwendet, an dessen Protokoll sich weitgehend gehalten wurde.

Für die DNA-Bewertung mittels TUNEL-Test wurden zunächst Spermienausstriche hergestellt, dafür wurden die Eberproben 1:100 mit BTS und die Bienenproben 1:500 mit BSS verdünnt und gut gemischt. Im Anschluss wurden 8µL der Spermien suspension auf den Randbereich eines zuvor gereinigten Deckglases (18x18mm) gegeben und mit einem weiteren Deckglas über die gesamte Glasfläche verstrichen. Dabei durfte keinerlei Druck ausgeübt werden, weil sonst die Spermien erheblichen Schaden davongetragen hätten. Die Ausstriche wurden anschließend in Raumluft, leicht abgedeckt um Verunreinigungen zu vermeiden, getrocknet. Danach wurden die Proben mit einer 4%igen Paraformaldehydlösung 1h bei 17°C fixiert. Die Fixierungslösung wurde anschließend mit PBS gewaschen und die Spermien konnten permeabilisiert werden. Dafür wurden auf jeden Ausstrich 100µl eisgekühlte Permeabilisierungslösung (0,1% Triton) gegeben und 2 min auf Eis inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit PBS wurden die Ausstriche erneut an der Raumluft leicht angetrocknet, bis die Randbereiche keinen Flüssigkeitsfilm mehr zeigten. Dann wurden je 50µl der TUNEL-Lösung auf die Ausstriche gegeben und 60min bei 37°C in feuchtigkeitsgesättigter Luft und Dunkelheit inkubiert. Die TUNEL-Lösung wurde zuvor hergestellt, indem 450µl der Färbelösung und 50µl der Enzymlösung des Kits gemischt wurden. Die restlichen 100µl der Färbelösung wurden für 2 Negativkontrollen anstatt der TUNEL-Lösung verwendet. Für die Positivkontrolle wurde ein Ausstrich nach Fixierung und Permeabilisierung 10min bei 17°C mit DNase I (3-3000U/ml in 50mM Tris-HCl) behandelt um DNA-Strangbrüche zu erzeugen. Die Positivkontrolle wurde anschließend mit PBS gewaschen und wie die anderen Ausstriche mit TUNEL-Lösung

inkubiert. Nach Einwirkung der TUNEL-Lösung wurden die Ausstriche mehrmals (min. 3x) mit PBS gewaschen. Die Deckgläser wurden dann mit der Probenseite nah unten auf Objektträger gelegt und am Mikroskop untersucht. Wenn eine kombinierte Anfärbung mit H342 erwünscht war, wurde zuvor ein Tropfen H342-Lösung (5 μ M in PBS) auf den Objektträger gegeben und die Untersuchung um 10 min verzögert begonnen. Für die mikroskopische Untersuchung der TUNEL-Signale wurde Leica Filter Y3 mit einer maximalen Excitation bei nm verwendet. Die TUNEL-Signale stammten von dem an UTP-gekoppelten Fluorescein und erschienen daher grün. Zusätzlich konnte auch die blaue H342-Fluoreszenz betrachtet werden. Mit der am Mikroskop angeschlossenen Kappa-Kamera wurden für eine spätere Quantifizierung mehrere Bereiche fotografiert. Je ein Phasenkontrastbild, ein H342-Fluoreszenzbild und eine Fluorescein-Aufnahme wurden pro Bereich erstellt und abgespeichert. Für die Auswertung wurden die Bilder zunächst mit Photoshop CS4 bearbeitet, eine detaillierte Beschreibung der Arbeitsschritte ist in 2.3.3.1 zu finden. Auch wenn prinzipiell eine Quantifizierung mittels SSIQ möglich ist, wurden die TUNEL-Signale der Bienenspermien per Hand ausgezählt, weil die Signale häufig sehr klein ausfielen.

2.3.9. Akrosomenintegritätstests

Neben intakter Plasmamembran und ungeschädigter DNA ist auch ein unversehrtes Akrosom, das in der Lage ist eine Akrosomenreaktion durchzuführen, für eine erfolgreiche Befruchtung unerlässlich. Deshalb wurde nach einer Methode zur Beurteilung des Akrosomenzustandes gesucht.

2.3.9.1 Fluoreszenzmarkierung mit an FITC gebundenen Agglutininen

Eine weit etablierte Untersuchungsmethode des Akrosoms ist die Fluoreszenzmarkierung durch FITC-gekoppelte Agglutinine, besonders PNA (Lectin aus *Arachis hypogaea* und PSA (Lectin aus *Pisum sativum*). PNA ist ein Lectin aus der Erdnuss, das spezifisch an die Innenseite der äußeren Akrosomenmembran bindet. Dagegen bindet PSA, ein Lectin aus der Erbse, an die Akrosomenmatrix. Weil die Agglutinine an den Fluoreszenzfarbstoff FITC gebunden sind, resultiert eine Bindung der Lektine in einem grünen Fluoreszenzsignal. Genauere Angaben zu den Bindungseigenschaften von PNA und PSA sind unter Kapitel 3.1.9.1. zu finden.

Die Markierungsversuche wurden z.T. parallel an Eber- und Bienenspermien in Suspension, sowie an Zellausstrichen durchgeführt. Es wurden fixierte, unfixierte, permeabilisierte und unpermeabilisierte Proben, sowie zuvor eingefrorene Spermien untersucht.

Markierung mit PNA- oder PSA-FITC in Spermien suspension, z.T. in Kombination mit PI und H342.

Zusammensetzung für Bienenspermien:

- 2µl Bienenspermien suspension (1:100 Verdünnung des Ejakulates)
- 5µl PNA- oder PSA-Lösung (0,1mg/ml) --> Endkonzentration 12,5µg/ml
- optional: 4µl H342 (50µM) --> 5µM Endkonzentration
- optional: 2µl PI (150µg/ml) --> Endkonzentration 7,5µg/ml
- 27µl BSS bzw. PBS bei einer kombinierten Markierung mit PI und H342
- 33µl BSS bzw. PBS bei einer reinen Akrosomenmarkierung
- optional zur Permeabilisierung: 4µl Triton X100 (1%ig) dafür 4µl weniger Puffer

Zusammensetzung für Eberspermien:

- 8µl Eberspermien suspension (1:10 Verdünnung des Ejakulates)
- 5µl PNA- oder PSA-Lösung (0,1mg/ml) --> Endkonzentration 12,5µg/ml
- optional: 4µl H342 (50µM) --> 5µM Endkonzentration
- optional: 2µl PI (150µg/ml) --> Endkonzentration 7,5µg/ml
- 21µl BSS bzw. PBS bei einer kombinierten Markierung mit PI und H342
- 27µl BSS bzw. PBS bei einer reinen Akrosomenmarkierung
- optional: Permeabilisierung mit 4µl Triton X100 (1%ig) dafür 4µl weniger Puffer

Probenvolumen je 40µl; 10 minütige Inkubation bei 35°C im Dunkeln. Danach Untersuchung am Fluoreszenzmikroskop. Zum Teil wurden die Spermienproben vor der Markierung in N₂L eingefroren und in Raumtemperatur wieder aufgetaut.

Anfärbung angetrockneter Eber- und Bienenspermien mit PNA- oder PSA-FITC

Arbeitsschritte des Versuches in chronologischer Reihenfolge:

- Polylysinbeschichtung gereinigter Deckgläser (18x18mm) um Anhaftung der Spermien an die Glasoberfläche zu verbessern.

- Herstellung der Spermienausstriche mit 1:100 in BTS verdünntem Ebersperma und 1:500 in BSS verdünnten Bienenspermien. Dafür werden 8µL der jeweiligen Spermiesuspension auf den Randbereich eines Deckglases (18x18mm) gegeben und mit einem weiteren Deckglas ohne Druckausübung über die gesamte Glasfläche verstrichen.
- Spermienausstriche auf Deckgläser bei Raumtemperatur für ca. 15 Min. trocknen lassen.
- Optional: Fixierung mit 100µl PFA-Lösung (2%), für 3 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren.
- Optional: Permeabilisierung durch 100µl Triton X-100 (0,1%), für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren.
- Waschen mit PBS 100µl (5 Minuten, bei Raumtemperatur)
- Inkubation mit 60µl PSA-FITC bzw. PNA-FITC (jeweils 60µg/ml) für 15 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln.
- Optional: Inkubation mit 60µl PI (15µg/ml) für 15 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln.
- Waschen 3-mal mit je 100µl PBS. Entfernen der Waschlösung erstmals nach 30 Min., dann 2-mal nach 5 Minuten.
- Waschen mit H₂O_{dd} 100µl für 10 Min.
- Optional: Einbettung in Mowiol auf Objektträger, ansonsten ohne Mowiol ggf. mit etwas H₂O_{dd} oder 5µM H342 in H₂O_{dd} auf Objektträger legen.
- Untersuchung am Fluoreszenzmikroskop

2.3.9.2 Antikörpervermittelte Fluoreszenzmarkierung von Akrosin

Eine weitere Methode zur Akrosomenbeurteilung, die bei Säugerspermien häufig angewendet wird, ist eine antikörpervermittelte Akrosinmarkierung. Akrosin ist eine Serinprotease, die die Spaltung von Peptidbindungen katalysiert und im Zuge der Akrosomenreaktion dem Spermium das Durchdringen der Zona Pellucida erleichtert. Für die Befruchtung spielt es deshalb eine sehr wichtige Rolle, was auch durch den Sachverhalt, dass Männer mit einer Akrosinbildungsstörung infertil sind, bekräftigt wird. Akrosin befindet sich, solange es nicht während der Akrosomenreaktion freigesetzt wird, in der Akrosomenmatrix. Solange die Membranen (Plasmamembran und Akrosomenmembran) intakt sind, ist es deshalb nicht möglich das Akrosin über einen entsprechenden Antikörper zu markieren. Nur wenn Membrandefekte vorhanden sind kann der primäre Antikörper an

das Akrosin binden und an diesen einen fluorochromgekoppelten sekundären Antikörper. Damit besteht eine Möglichkeit Spermien mit geschädigten und intakten Akrosomen zu unterscheiden und objektiv zu quantifizieren.

Zunächst wurde die antikörpervermittelte Fluoreszenzmarkierung von Akrosin an getrockneten Spermienausstrichen nach klassischem Protokoll, also mit und ohne Fixierung und nach Permeabilisierung durchgeführt. Die Ergebnisse des Versuchs sollten zeigen, ob Akrosomen von Bienenspermien mit der Methode überhaupt markierbar sind.

Arbeitsschritte des Versuches in chronologischer Reihenfolge:

- Polylysinbeschichtung gereinigter Deckgläser (18x18mm) um Anhaftung der Spermien an die Glasoberfläche zu verbessern.
- Herstellung der Spermienausstriche mit 1:100 in BTS verdünntem Ebersperma und 1:500 in BSS verdünnten Bienenspermien. Dafür werden 8µL der jeweiligen Spermiesuspension auf den Randbereich eines Deckglases (18x18mm) gegeben und mit einem weiteren Deckglas ohne Druckausübung über die gesamte Glasfläche verstrichen.
- Spermienausstriche auf Deckgläser bei Raumtemperatur für ca. 15 Min. trocknen lassen.
- Optional: Fixierung mit 100µl PFA-Lösung (2%), für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren.
- Permeabilisierung durch 100µl Triton X-100 (0,1%), für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.
- Behandlung mit 100µl Tween 20 (0,01%), für 10 min bei Raumtemperatur, zur Reduktion der Oberflächenspannung.
- Bei fixierten Proben: Absättigung der freien NH₂-Gruppen mit 100µl NH₄Cl (50mM) 10min bei Raumtemperatur.
- Mind. 2-mal waschen mit PBS 100µl (5 Minuten, bei Raumtemperatur).
- Abblocken unspezifischer Bindungsstellen mit 100µl Blocklösung (Zusammensetzung siehe 2.2.2.2.) für 2h bei Raumtemperatur.
- Inkubation mit primärem Antikörper (1:67 Verdünnung; Anti-Akrosin; genauere Angaben siehe Tab. 1) 60µl/ Deckglas, über Nacht in einer Feuchtkammer bei 4°C.
- 1-mal waschen mit PBS 100µl (30 Minuten, bei Raumtemperatur).
- 2-mal waschen mit PBS 100µl (5 Minuten, bei Raumtemperatur).

- Inkubation mit sekundärem Antikörper (1:400 Verdünnung; Anti-mouse IgG gekoppelt an Alexa Fluor 488; genauere Angaben siehe Tab. 1) 60µl/ Deckglas, 2h bei Raumtemperatur im Dunkeln.
- 3-mal waschen mit PBS 100µl (5 Minuten, bei Raumtemperatur).
- 1-mal waschen mit H₂O_{dd} 100µl (5 Minuten, bei Raumtemperatur).
- Einbettung in Mowiol auf Objektträger, bis zur mikroskopischen Untersuchung bei 4°C im Dunkeln lagern.

Als Negativkontrolle wurde eine Probe statt mit prim. Antikörper mit PBS inkubiert.

2.3.9.3 Antikörpervermittelte Fluoreszenzmarkierung von Hexokinase

Ein weiteres Protein, über dessen immunologische Fluoreszenzmarkierung der Zustand der Akrosomen von Bienenspermien beurteilt werden sollte, ist das Enzym Hexokinase. Dieses katalysiert die Phosphorylierung von Glukose zu Glukose-6-Phosphat, die erste glykolytische Reaktion. In Vertebraten kennt man vier somatische Isoformen der Hexokinase (Hk I-IV), von denen aber nur die Hexokinase I als Sonderform HkI-sc in Spermien vorkommt (Travis et al., 1998).

Als primärer Antikörper wurde verwendet: Anti-Hefe-HK aus Kaninchen, polyklonal, Produktnr. ABIN100459, antibodies online GmbH

Als sekundäre Antikörper wurden verwendet: 1. Anti-Kaninchen IgG, gekoppelt an Alexa Fluor 488, polyklonal, aus Ziege; Produktnr. A-11008, Invitrogen GmbH Darmstadt und 2. Anti-Kaninchen IgG, gekoppelt an Alexa Fluor 546, polyklonal, aus Ziege; Produktnr. A11010, Invitrogen GmbH Darmstadt

Zunächst wurden antikörpervermittelte Fluoreszenzmarkierungen an nach klassischem Protokoll Ausstrichen (siehe 2.3.9.2.) durchgeführt.

Arbeitsschritte der klassischen Immunfluoreszenzmarkierung an Ausstrichen in chronologischer Reihenfolge:

- Polylysinbeschichtung gereinigter Deckgläser (18x18mm) um Anhaftung der Spermien an die Glasoberfläche zu verbessern.
- Herstellung der Spermienausstriche mit 1:500 in BSS verdünnten Bienenspermien. Dafür werden 8µL der jeweiligen Spermien suspension auf den Randbereich eines

Deckglases (18x18mm) gegeben und mit einem weiteren Deckglas ohne Druckausübung über die gesamte Glasfläche verstrichen.

- Spermienausstriche auf Deckgläser bei Raumtemperatur für ca. 15 Min. trocknen lassen.
- optional: Fixierung mit 100µl PFA-Lösung (2%), für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren.
- Permeabilisierung durch 100µl Triton X-100 (0,1%), für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren.
- Bei fixierten Proben: Absättigung der freien NH₂-Gruppen mit 100µl NH₄Cl (50mM) 10min bei Raumtemperatur.
- Mind. 2-mal waschen mit PBS 100µl (5 Minuten, bei Raumtemperatur).
- Abblocken unspezifischer Bindungsstellen mit 100µl Blocklösung (Zusammensetzung siehe 2.2.2.2.) für 2h bei Raumtemperatur.
- Inkubation mit primärem Antikörper (1:25 in Blocklösung verdünnt; Anti-Hefe-Hexokinase; Informationen siehe Tab. 1) 50µl/ Deckglas, über Nacht in einer Feuchtkammer bei 4°C.
- 1-mal waschen mit PBS 100µl (30 Minuten, bei Raumtemperatur).
- 2-mal waschen mit PBS 100µl (5 Minuten, bei Raumtemperatur).
- Inkubation mit sekundärem Antikörper (1:400 Verdünnung in PBS; Anti-Kaninchen IgG gekoppelt an Alexa Fluor 488; Informationen siehe Tab. 1) 60µl/ Deckglas, 2h bei Raumtemperatur im Dunkeln.
- 3-mal waschen mit PBS 100µl (5 Minuten, bei Raumtemperatur).
- 1-mal waschen mit H₂O_{dd} 100µl (5 Minuten, bei Raumtemperatur).
- Optional: Einbettung in Mowiol auf Objektträger, ansonsten ohne Mowiol ggf. mit etwas H₂O_{dd} oder 5µM H342 in H₂O_{dd} auf Objektträger legen.

Als Negativkontrolle wurde eine Probe statt mit prim. Antikörper mit PBS inkubiert. Für diesen Versuch wurden nur Bienenspermien verwendet.

Immunofluoreszenzmarkierung von Hexokinase in Bienen- und Eberspermien suspensionen:

Langzeitmethode

- 60µl Spermien suspension (für Bienen 1:100 Verdünnung des Ejakulates; für Eber 1:10 Verdünnung des Ejakulates) werden mit 60µl Blocklösung (Zusammensetzung siehe 2.2.2.2.) versetzt.
- Inkubation von 3h bei 17°C

- Waschen: 4min lang mit 500g bei Raumtemperatur zentrifugieren
- 100µl des Überstandes abziehen und verwerfen
- restl. Suspension bzw. sedimentiertes Pellet (20µl) in 25µl Blocklösung resuspendieren und anschließend 5µl des unverdünnten Anti-Hefe-Hexokinase-Antikörpers zugeben. --> 1:10 Verdünnung des prim. AK. = 8mg/ml
- Inkubation über Nacht (ca. 21h) bei 4°C
- Waschen: 4-mal zentrifugieren (je 4min mit 500g bei Raumtemperatur); nach jedem Zentrifugationsschritt 45µl Überstand abziehen, verwerfen und das Pellet in 45µl BSS (Bienenspermien)/ BTS (Eberspermien) resuspendieren. --> nach dem letzten Waschen wird das Pellet in nur 35µl BSS (Bienenspermien)/ BTS (Eberspermien) resuspendiert.
- Der Spermiesuspension (40µl) werden 10µl des zuvor 1:10 in PBS verdünnten sekundären Antikörpers (Anti-Kaninchen IgG gekoppelt an Alexa Fluor 488nm oder Alexa Fluor 546nm) zugegeben.
- 3 stündige Inkubation im Dunkeln bei Raumtemperatur
- 2-malige Waschen, je 4min bei 500g; nach dem ersten Waschen werden 45µl des Überstandes abgezogen, verworfen und das Sediment wird in 45µl BSS (Bienenspermien)/ BTS (Eberspermien) resuspendiert. Nach dem zweiten Zentrifugationsschritt werden wieder 45 µl des Überstandes verworfen, das Pellet (5µl) wird allerdings in 40µl BSS (Bienenspermien)/ BTS (Eberspermien) und 5µl H342 (50µM) gelöst.
- Nach ca. 15 min kann die Spermiesuspension am Fluoreszenzmikroskop untersucht werden.

Als Negativkontrolle wurde eine Probe statt mit prim. Antikörper mit PBS inkubiert. Als Positivkontrolle diente ein Probenaliquot, welches durch vorhergehende Triton x100-Behandlung (0,1%) oder durch Einfrieren in N₂L permeabilisiert wurde.

Aufgrund der Ergebnisse wurde die Methode mehrfach modifiziert, es resultierte eine zeitlich verkürzte antikörpervermittelte Fluoreszenzmarkierung der Hexokinase in Suspension. Die Kurzzeitmethode für Bienen- und Eberspermien unterscheiden sich in einigen Arbeitsschritten, so z.B. in den Wirkzeiten der Antikörper. Die Unterschiede sind in der Methodenbeschreibung erläutert. Außerdem wurde das Azid aus der prim. Antikörperlösung entfernt. Dafür wurde die Antikörperlösung mehrmals mit H₂O_{dd} in einem Centricon (50000) gewaschen. Die azidfreie Antikörperlösung wurde anschließend lyophilisiert und der Antikörper in Antikörperpuffer (siehe 2.2.2.2.) gelöst.

Kurzzeitmethode

- 30µl Spermien suspension (für Bienen 1:100 Verdünnung des Ejakulates; für Eber 1:10 Verdünnung des Ejakulates) werden mit 100µl BSS (Bienenspermien)/ BTS (Eberspermien) vermischt und anschließend 4min mit 500g zentrifugiert.
- 100µl des Überstandes werden abgezogen und verworfen.
- Die restlichen 30µl werden in 20µl Blocklösung (Zusammensetzung siehe 2.2.2.2.) resuspendiert.
- Inkubation von 15min bei 17°C
- Waschen: 4min lang mit 500g bei Raumtemperatur zentrifugieren und 40µl des Überstandes abziehen und werfen.
- restl. Suspension bzw. sedimentiertes Pellet (20µl) in 25µl Blocklösung resuspendieren und anschließend 5µl des unverdünnten Anti-Hefe-Hexokinase-Antikörpers zugeben.
- Inkubation von 1 1/2h bei 17°C für Bienenspermien; Inkubation von 30min bei 17°C für Eberspermien
- Waschen: 4-mal zentrifugieren (je 4min mit 500g bei Raumtemperatur); nach jedem Zentrifugationsschritt 45µl Überstand abziehen, werfen und das Pellet in 45µl BSS resuspendieren. --> nach dem letzten Waschen wird das Pellet in nur 35µl BSS resuspendiert.
- Der Spermien suspension (40µl) werden 10µl des zuvor 1:20 in PBS verdünnten sekundären Antikörpers (Anti-Kaninchen IgG gekoppelt an Alexa Fluor 488nm oder Alexa Fluor 546nm) zugegeben.
- 1 1/2h Inkubation im Dunkeln bei 17°C; Inkubation von 30min bei 17°C für Eberspermien
- 2-malige Waschen, je 4min bei 500g; nach dem ersten Waschen werden 45µl des Überstandes abgezogen, werfen und das Sediment wird in 45µl BSS resuspendiert. Nach dem zweiten Zentrifugationsschritt werden wieder 45 µl des Überstandes verworfen, das Pellet (5µl) wird allerdings in 40µl BSS und 5µl H342 (50µM) gelöst.
- Optional: 5µl der Suspension abziehen und mit 5µl PI (7,5µg/ml) ersetzen, wenn eine Dreifachmarkierung erwünscht ist.
- Nach ca. 15 min kann die Spermien suspension am Fluoreszenzmikroskop untersucht werden.

Als Negativkontrolle wurde eine Probe statt mit prim. Antikörper mit PBS inkubiert. Als Positivkontrolle diente ein Probenaliquot, welches durch vorhergehende Triton x100-Behandlung (0,1%) oder durch Einfrieren in N₂L. permeabilisiert wurde.

Es wurde eine Quantifizierung der unterschiedlichen Anti-HK/AF546-Markierungstypen an 5 Eberspermien suspensionen von 4 Ebern durchgeführt. Mit den Spermien suspensionen (1:10 des Ejakulates, mit BTS verdünnt) wurde dafür nach 1, 3 und 5 Tagen Inkubation bei 17°C eine Anti-HK/ AF546-Markierung nach verkürztem und angepasstem Protokoll durchgeführt. Zu jeder Probe wurden für mehrere Bereiche Phasenkontrastbilder und AF546- Fluoreszenzaufnahmen erstellt, mittels Photoshop CS4 bearbeitet und ausgezählt. In Office Excel wurden die Ergebnisse der Zählung dann in Prozentanteile umgerechnet und in Säulendiagrammen dargestellt.

2.4. Vorversuche zum Einfluss versch. Faktoren auf die Spermienvitalität

Da die Kryokonservierung von Zellen oder auch Geweben ein multifaktorieller Prozess ist, sind vorhergehende Untersuchungen einzelner Faktoren sinnvoll. Deshalb wurden auch im Rahmen des vorgestellten Projektes einige Einzelfaktoren in Vorversuchen untersucht und deren Einfluss auf die Spermienvitalität beleuchtet.

2.4.1. Eignung versch. Kryogefäße

Ein für die Konservierung von Bienenspermienproben geeignetes Kryogefäß sollte kleine Volumina fassen und verlustfrei gefüllt und entleert werden können. Das Gefäß selbst sollte thermisch möglichst wenig isolieren und Tiefsttemperaturen aushalten. Außerdem sollten Proben-Verunreinigungen jeder Art vermieden werden, deshalb wäre ein luftdichtes Verschließen sinnvoll. Zusätzlich sollte ein optimales Kryogefäß kostengünstig und leicht beziehbar sein.

Es wurden 5 verschiedene Kryogefäße untersucht, unter anderem eine Hämatokrit-Glaskapillare der Firma Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co. KG, 74246 Eberstadt mit einem Innendurchmesser von 0,95mm und einem Außendurchmesser von 1,35mm. Auch eine Ringkapillare derselben Firma mit einem Innendurchmesser von 0,74mm wurde getestet. Außerdem zwei verschiedene Teflonschläuche der Firma Bohlender GmbH, 97947 Grünfeld (bezogen von VWR international GmbH, 64295 Darmstadt) mit unterschiedlichen Durchmessern und Wandstärken (\emptyset innen 0,2mm; \emptyset außen 0,4mm, und \emptyset innen 0,4mm; \emptyset

außen 0,9mm). Zusätzlich wurde auch handelsübliche Alufolie als mögliches Kryogefäß betrachtet, allerdings konnte diese nur bei Vitrifikationstests verwendet werden, da sie keine Möglichkeit des Verschlusses bietet und die Spermienproben während der Abkühlungstests weggespült worden wären.

Die Kryogefäße wurden bei 17°C mit verdünnten Bienenspermienproben (1:10 mit BSS) gefüllt. Dabei wurde jedes Schlauchstück bzw. jede Kapillare mit 7µl befüllt. Die Kapillaren wurden durch Verschweißen oder durch Vaseline verschlossen. Das Verschließen der Teflonschläuche geschah durch Verschweißen oder durch Zuklemmen. Anschließend fand eine sequentielle Abkühlung statt, indem die Proben für je 15 min bei abnehmender Umgebungstemperatur (17°C, 5°C, 0°C, -20°C, -196°C) gelagert wurden. Zuerst wurden die Kapillaren miteinander verglichen, dafür wurden pro Temperatur und Kapillarart 2 Proben mittels GPI-Test untersucht (gesamt 10 Proben pro Kapillarsorte). Anschließend wurde die besser abgeschnittene Hämatokritkapillare mit den Teflonschläuchen verglichen. Für diesen Versuch wurden wiederum die GPI-Aktivitäten von 2 Proben pro Gefäßart und Temperatur (10 Proben pro Gefäßsorte) gemessen.

2.4.2. Toxizität von DMSO

DMSO ist ein etabliertes Kryoprotektivum, welches weite Anwendung findet. Es wird für die Kryokonservierung einer Vielzahl von Zell- und Gewebstypen und sogar ganzen Organismen verwendet (Yu und Quinn, 1995). Allerdings besitzt DMSO vor allem in höheren Konzentrationen (>10% v/v) toxische Wirkung, zudem wird DMSO genotoxische Eigenschaften zugesprochen (Yu und Quinn, 1995; Harbo, 1986). Da die Kryokonservierung von Bienenspermien bisher auf DMSO angewiesen war und wohl auch in Zukunft nicht komplett darauf verzichtet werden kann, ist es sinnvoll die Art und Stärke der durch DMSO hervorgerufenen Schädigungen an Bienenspermien zu ermitteln. Zunächst wurden dafür *in vitro* Experimente durchgeführt und im Anschluss durch *in vivo* Versuche komplettiert.

2.4.2.1 Einfluss auf Motilität

Es wurden Bienenspermienproben mit 0%, 10% und 30% (v/v) DMSO und 5µM H342 versetzt und nach 30 minütiger Inkubation bei Raumtemperatur (24°C) am Fluoreszenzmikroskop untersucht. Dabei wurde besonders auf die Motilität der Spermien geachtet und eine Auszählung motiler und unbeweglicher Spermien vorgenommen. Die Verdünnung der Spermien suspensionen wurde mit BSS durchgeführt.

2.4.2.2 Einfluss auf Membranintegrität

Es wurden die Membranintegritäten von Bienenspermienproben mit 0%, 10% und 30% (v/v) DMSO nach 5 und 30 minütiger Inkubation bei Raumtemperatur (24°C) mittels GPI-Aktivitätsmessung ermittelt. Die Durchführung der GPI-Messung wird unter 2.3.4. beschrieben.

2.4.2.3 Einfluss auf DNA-Integrität

Um eine mögliche genotoxische Wirkung von DMSO zu untersuchen wurden DNA-Strangbrüche in Bienenspermienproben mit (10% (v/v)) und ohne DMSO-Zusatz mittels TUNEL-Test detektiert. Bei allen 4 Bienenproben handelte es sich um Frischproben, die zum Teil mit DMSO versetzt und 60 min. bei Raumtemperatur (21°C) inkubiert wurden. Der TUNEL-Test wird unter 2.3.8.3. näher erläutert.

2.4.2.4 Einfluss nach Versamung auf den Füllungsgrad der Spermatheka

Der hier beschriebene besamungsversuch wurde von den Projektpartnern am LIB Hohen Neuendorf geplant und durchgeführt.

Bienenköniginnen wurden mit DMSO-haltigem Sperma reifer Drohnen (15-20 Tage alt) besamt und in Kleinstvölkern (100 Arbeiterinnen; siehe Abb 19.) gehalten. Die Konzentration der Kyroprotektionssubstanz betrug 10% (v/v), als Verdünnungspuffer diente Harbo-Puffer (siehe 2.2.2.1.). Nach 6 Tagen wurden die Königinnen getötet und die Anzahl der Spermien in den Spermatheken gezählt. Es wurden je 4 Königinnen mit unbehandeltem (Kontrolle) und DMSO-haltigem Sperma besamt



Abb.19: Versuchsanlage, bestehend aus Kleinstvölkern mit ca. 100 Arbeiterinnen pro Volk. Zur Verfügung gestellt vom Länderinstitut für Bienenkunde Hohen Neuendorf.

2.4.2.5 Zugabe von Trehalose zur Abschwächung des negativen Einflusses

Bienenspermienproben wurden mit 3 verschiedenen DMSO- (0%, 10% und 30% v/v) und 3 unterschiedlichen Trehalose-Konzentrationen (22,5mM, 45mM und 90 mM) versetzt und anschließend langsam (0,33°C/min) von 23°C auf 5°C abgekühlt. Die Verdünnung betrug stets 1:4. Danach erfolgte die Beurteilung der Membranintegrität mittels GPI-Aktivitätsmessung (siehe 2.3.4.).

2.4.3. Einfluss unterschiedlicher Probenvolumina

Für diese Untersuchung wurde gepooltes Bienenejakulat aufgeteilt. Beide Teile wurden mit trehalosehaltigem BSS+ 1:4 verdünnt, allerdings unterschieden sich die resultierenden Trehalosekonzentrationen in der Probe, ein Aliquot enthielt 22,5mM und der andere Teil 45mM Trehalose. Die beiden Proben wurden dann nochmals in Aliquot unterschiedlichen Volumens (4µl und 10µl) geteilt. Alle Proben wurden anschließend langsam mit 0,33°C/min auf 5°C abgekühlt und mittels GPI-Messung untersucht. Als Kontrolle diente ein Aliquot des gepoolten Spermas, welches vor Aufteilung auch mit BSS+ 1:4, verdünnt wurde.

2.5. Vitrifikationsversuche

2.5.1. Versuche zur Abkühlung vor der Vitrifikation

Obwohl DMSO bislang das vielversprechendste Kryoprotektivum für Bienenspermien darstellt, konnte eine toxische Wirkung, besonders höherer Konzentrationen gezeigt werden. Da für eine Vitrifikation aber hohe Kryoprotektiva-Konzentrationen notwendig sind ($\geq 30\%$) und die schädliche Wirkung temperaturabhängig ist, wurden Vorversuche durchgeführt, bei denen DMSO teilweise erst nach schonender Abkühlung auf 5°C zugesetzt wurde. Trehalose, der Blutzucker der Insekten und eine für viele Anwendungen bekannte Schutzsubstanz sollte eine stabilisierende Wirkung schon während der Abkühlung ausüben, weshalb sie manchen Proben zugesetzt wurde. Auch der Einfluss verschiedener Pufferlösungen auf die Vitalität der Spermien während der Abkühlung und des DMSO-Zusatzes wurde untersucht.

Für diese Untersuchungen wurde gepooltes Bienensperma aufgeteilt und teilweise mit 1:2 mit Kievpuffer, BSS oT (ohne Trehalose), BSS+ und BSS ohne Trehalose aber mit DMSO

verdünnt (Zusammensetzung der Puffer siehe 2.2.2.1.). Als Kontrolle wurde ein Aliquot, welche direkt mittels GPI-Test (siehe 2.3.4.) analysiert wurde, verwendet. Das Ergebnis dieser Kontrollprobe diente als Referenzwert (Anteil intakter Spermien maximal -> 100%).

2.5.2. Einsatz unterschiedlicher Kryoprotektiva

Von den Projektpartnern am LIB Hohen Neuendorf wurde ein Besamungsversuch geplant und durchgeführt, der den Einfluss von 10% (v/v) DMSO, Ethylenglykol (EG) und deren Kombinationen nach Versamung auf den Füllungsgrad der Spermatheka beleuchtet. Der Versuch soll aufzeigen, dass Kombinationen mehrerer Schutzstoffe evtl. weniger toxisch wirken, als die Einzelstoffe in gleicher Konzentration.

Die Ergebnisse sowie die Methodenbeschreibung dieses Experiments sind unter Wegener et al., *Theriogenology* Volume 77, Issue 3, 2012, P 600–607 zu finden.

Bienenköniginnen wurden mit DMSO- und/oder Ethylenglykol-haltigem Sperma reifer Drohnen (15-20 Tage alt) besamt und in Kleinstvölkern (100 Arbeiterinnen; siehe Abb 19.) gehalten. Die Gesamtkonzentration der Kryoprotektionssubstanzen betrug immer 10% (v/v), als Verdünnungspuffer diente Harbo-Puffer (siehe 2.2.2.1.). Nach 6 Tagen wurden die Königinnen getötet und die Anzahl der Spermien in den Spermatheken gezählt. Für jede Behandlungsart und die Kontrolle wurden je 4 Königinnen besamt, als Kontrolle dienten Königinnen, die mit reinem Drohnensperma besamt wurden.

Neben DMSO und Trehalose wurden auch viele weitere Substanzen mit kryoprotektiver Wirkung eingesetzt, um DMSO ganz oder zumindest teilweise zu ersetzen und eine erfolgreiche Vitrifikation zu erreichen. Unter den getesteten Stoffen befanden sich bekannte Kryoprotektiva, wie Glycerin und Ethylenglykol, genauso wie großmolekulare Polysaccharide (Ficoll und Dextran 10000). Auch Saccharose und ein für humane Oozyten entwickeltes Vitrifikationskit der Firma Fertipro wurden für Vitrifikationstests eingesetzt. Die eingesetzten Konzentrationen sind unter 3.3.1. in Tab. 30 angegeben. Zur Vitalitätsermittlung wurde in den Proben nach schnellem Auftauen (schnelles Überführen von N_{2l} in ein Wasserbad mit 35°C) die GPI-Aktivität gemessen. Es wurden auch verschiedene Einfrier-, bzw. Vitrifikationsmethoden ausprobiert, direktes Überführen nach Kryoprotektivazusatz bei Raumtemperatur in N_{2l} wurde genauso getestet, wie langsames Abkühlen (mit 0,33°C/min) auf 5°C mit anschließendem Zusatz der Schutzsubstanzen und nachfolgendem schnellem Einfrieren in N_{2l} . Das Auftauen geschah dagegen bei allen Versuchen konstant durch schnelle Überführung in ein 35°C warmes Wasserbad.

2.6. Entwicklung eines Slow Freezing-Protokolles

Während für eine Vitrifikation sehr schnelle Abkühlungsgeschwindigkeiten und hohe Kryoprotektiva-Konzentrationen nötig sind, erfordert eine Konservierung mittels Slow Freezing vergleichsweise niedrige Schutzstoff-Konzentrationen und langsames Abkühlen. Allerdings werden die Zellen auch mit dieser Methode für einen längeren Zeitraum verschiedenen Stressfaktoren ausgesetzt. Durch das langsame Abkühlen erhöht sich bedingt durch zunehmende extrazelluläre Eisbildung der osmotische Stress, auch werden kryoprotektive Stoffe aufkonzentriert und die Zellen sind relativ lange niedrigen Temperaturen, die dennoch Reaktionen zulassen, ausgesetzt. Verschiedene Zellen oder Gewebe können sich beim Slow Freezing unterschiedlich verhalten, weshalb alle Faktoren (Zusammensetzung und Konzentrationen der Kryoprotektiva, Zeitpunkt, bzw. Temperatur der Zugabe, Abkühlungsgeschwindigkeit, Auftaugeschwindigkeit, Verdünnungsgrad, Verdünnungspuffer, u.a.) für ein optimales Ergebnis perfekt eingestellt sein müssen.

2.6.1. Einsatz unterschiedlicher Kryoprotektiva

Obwohl beim Slow Freezing generell geringere Kryoprotektionsstoffgehalte eingesetzt werden, konzentrieren sich diese während des langsamen Gefriervorganges auf und die zu konservierenden Zellen sind diesen Bedingungen länger ausgeliefert als beim Vitrifizieren. Um diese schädigenden Einflüsse auf die Bienenspermien und die negativen Auswirkungen des DMSOs auf die Fruchtbarkeit nach Besamung zu verringern, wurden auch fürs Slow Freezing nach Alternativen zum DMSO gesucht. Zusätzlich wurden auch verschiedene Puffer mit DMSO-Zusatz auf ihre Eignung als Kryopuffer hin untersucht. Alle Experimente wurden dabei nach gleichem Protokoll durchgeführt: Gepoolte Bienenspermienproben wurden aufgeteilt und jeweils 1:4 mit den verschiedenen Kryolösungen verdünnt. Anschließend wurden die Proben in Teflonschläuche gefüllt und langsam (siehe Abkühlungsverlauf Abb. 20), von ca. 17°C auf -20°C abgekühlt und bis zur Analyse bei dieser Temperatur gelagert. Das Auftauen geschah recht schnell durch direktes Überführen der Proben von -20°C in ein 35°C warmes Wasserbad.

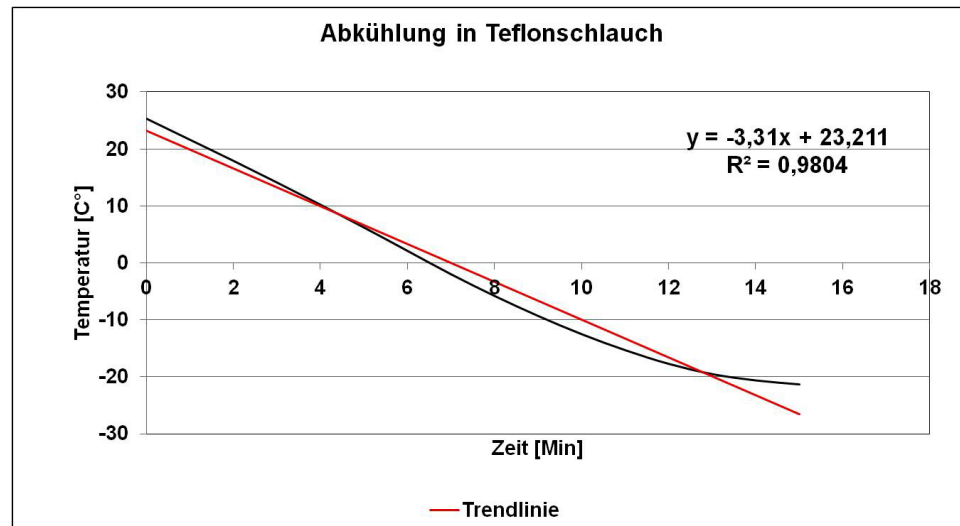


Abb.20: Temperaturverlauf während der Slow Freezing - Versuche. Gezeigt wird die Temperaturabnahme in den Probenschläuchen während der langsamen Abkühlung auf -20°C . Die Temperatur wurde minütlich mittels eines feinen Temperaturfühlers ($0,2\text{mm } \varnothing$) in der Probe ermittelt

Da kein programmierbares automatisches Einfriergerät zur Verfügung stand, wurden die Proben nach klassischer Art eingefroren. Dazu wurden die Probenschläuche in Isolationsmaterial (Schaumstoff) verpackt, in einer Halterung befestigt und ohne Kontakt mit dem Boden einfach in einen Eisschrank gestellt. Der in Abb. 20 dargestellte Abkühlungsverlauf mit Trendlinie und Geradengleichung zeigt, dass durchschnittlich eine Abkühlrate von $-3,3^{\circ}\text{C}/\text{min}$ anlag, diese aber nicht konstant gehalten wurde. Zu Beginn der Abkühlung nahm die Temperatur schneller ab und zum Ende langsamer. Dennoch konnte diese Einfriermethode gut verwendet werden um mögliche Alternativen zum DMSO aufzuspüren und unterschiedliche Kryopuffer zu testen. Die Proben wurden nach Lagerung (-20°C) unterschiedlicher Dauer in ein 35°C warmes Wasserbad überführt und so relativ schnell aufgetaut. Im Anschluss fanden PI-H342-Markierungen und GPI-Aktivitätsmessungen statt, um die Vitalität der Spermien in den Proben zu beurteilen.

Als mögliche DMSO-Ersatzstoffe wurden 1,3-Propandiol (PD), Saccharose, Dimethylacetamid (DMAA), Harnstoff und Hydroxyectoin (HE) getestet. Neben BSS+ wurden zusätzlich auch PBS, künstliche Hämolymphe und künstliche Spermathekaflüssigkeit mit DMSO (10%) und/oder anderen Schutzstoffen (siehe oben) versetzt und als Kryopuffer verwendet. Die Ergebnisse der GPI-Messungen dieser Slow Freezing-Versuche sind unter 3.4.1. in Tab. 31-33 zusammengefasst.

2.6.2. Ermittlung der optimalen Einfrier- und Auftaurate. (Koop. LIB)

Sowohl die Einfrier- als auch die Auftaugeschwindigkeit sind wichtige Faktoren, die für eine erfolgreiche Kryokonservierung optimal eingestellt sein müssen. Beide Aspekte wurden deshalb nacheinander untersucht um die optimalen Raten zu ermitteln. Zunächst wurden 6 verschiedene Einfrierraten vergleichend untersucht. Die Durchführung des Einfrierprozesses geschah am LIB in Hohen Neuendorf, während das Auftauen und die anschließenden Untersuchungen z. T. am LIB und bei AMP-Lab in Mainz durchgeführt wurden. Hier eine Methodenbeschreibung vom LIB:

Einfrieren:

Einfriermedium : 13,33% (v/v) DMSO in BSS

- Am Einfriergerät sechs Einfrierprotokolle erstellen (Gleichmäßige Abkühlung mit 1°C/min; 2°C/min; 3°C/min; 4°C/min; 6°C/min; 10°C/min; bei -50°C Umlagerung in N₂)
- Sperma in Eppendorfgefäß (Eppi) mit Deckeleinlage aus feuchtem Zellstoff ausstoßen und mit feiner Glaskapillare verrühren
- Pro Einfriergeschwindigkeit je 5µl des Spermapools in ein Eppi geben und mit 15µl Einfriermedium mischen. Aus diesen Gemischen je 2 Einfrierschläuche á 8µl befüllen und einfrieren (je eine Probe für LIB und AMP-Lab)

Das Auftauen geschah durch direktes Überführen der Proben vom N₂ in ein 35°C warmes Wasserbad, in das die Probe 1 min lang gehalten wurde. Im Anschluss konnten die Vitalitätstests wie zuvor beschrieben durchgeführt werden.

Auch der Einfluss der Auftaugeschwindigkeit auf den Erfolg der Kryokonservierung wurde untersucht und die optimale Auftaurate ermittelt. Dafür wurden alle Proben nach gleichem Einfrierprotokoll eingefroren und unterschiedlich schnell aufgetaut. 5 verschiedene Auftauraten wurden am LIB getestet, wobei für jede Rate 6 Probenaliquots untersucht wurden und jeweils Rückstellproben für die Messung zusätzlicher Qualitätsindikatoren bei AMP-Lab gebildet wurden. Die Bienenspermienproben wurden für diesen Versuch mit „Habo's“ (6 Durchgänge) und „BSS“ (Durchgänge 1-4) bzw. „BSS+“ (Durchgänge 5 und 6) verdünnt.

Einfriermedium 1: 13,33% (v/v) DMSO in Harbo's Puffer

Einfriermedium 2: 13,33% (v/v) DMSO in BSS/BSS+

Einfrierschläuche: Polyethylen, Roth No. 9583.1, 3 cm lange Stücke

Einfrieren:

- Spermapool ohne vorherige Durchmischung gleichmäßig aus zwei Eppi verteilen
- Das 3-fache Volumen Einfriermedium 1 (Eppi 1) bzw. Einfriermedium 2 (Eppi 2) hinzugeben, mit dünner Glaskapillare gut verrühren
- Pro Eppi 5-7 Einfrierschläuche mit je 8µl Sperma-Medien-Gemisch füllen, Enden Zuschweißen. Schläuche mit Sperma in Medium 1: blau markiert; mit Medium 2: rot markiert.
- Einfrierschläuche in mehrfach durchbohrtes Cryo-tube geben und im Einfriergerät (SyLab 14S) einfrieren (3°/min von 20°C bis -50°C, danach Überführung in N₂l).

Auftauen:

- Fünf verschiedene Auftaumethoden werden verglichen, für die in Vorversuchen die Auftaugeschwindigkeiten annähernd ermittelt wurden:
 - Inquetschen zwischen zwei mit Aluminium-Folie bespannten Schaumstoffstücken (4x4x1cm; 60 sek.)
 - Eintauchen in Wasserbad bei 35°C, 60 sek.
 - Eintauchen in Paraffinbad bei 35°C, 60 sek.
 - Auftauen in Luft bei Raumtemperatur (ca. 22°C), 120 sek.
 - Auftauen in CO₂ bei Raumtemperatur, 120 sek. (ein mit einem seitlichen Stopfen und einem dichten, aber locker aufliegenden Deckel versehenes Gefäß mit CO₂ aus Druckflasche gefüllt; Stopfen kurz entnommen und Probe eingeführt; Stopfen wieder angebracht)
- Pro Auftaumethode und Farbe ein Tube auftauen
- Vitalitäts-Assays durchführen (LIB: Motilitätsmessung nach manueller Methode; AMP: GPI-Test).

2.6.3. Besamungsversuch zur Überprüfung der erstellten Methode

Aus den Daten der vorherigen Versuche wurde eine Methode entwickelt, die anschließend in einem umfangreichen Besamungsexperiment überprüft werden sollte. Bienensperma wurde 1:2 mit 20% (v/v) DMSO in Harbo`s Puffer verdünnt und durch vorsichtiges Rühren mit einer dünnen Glaskapillare vermischt. Nach 5minütiger Equilibrierung wurden die

Proben dann mit 3°C/min von 20°C auf -40°C gebracht und anschließend sofort in LN₂ überführt. Aufgetaut wurden die Proben durch Halten in ein 35°C warmes Wasserbad für 10 Sekunden. Danach wurden junge Königinnen mit diesen Proben, sowie unbehandeltem Frischsperma besamt. Es wurden 11 Königinnen mit Kryo-Sperma und 3 mit unbehandeltem Sperma besamt.

2.6.4. DMSO-Entfernung vor Versamung

Für eine schonende DMSO-Entfernung vor Versamung wurden zwei grundsätzlich unterschiedliche Methoden verfolgt und miteinander verglichen. Dialyse und Zentrifugation.

2.6.4.1 Dialyse zur schonenden DMSO-Entfernung; in vitro- Versuche

Da bei der Reduzierung des DMSO-Gehaltes möglichst wenige Spermien geschädigt werden sollen und Dialyse weit verbreitete Anwendung zur schonenden Entfernung von chemischen Substanzen aus Zellsuspensionen findet, wurde dieses Verfahren untersucht. Das grundsätzliche Ziel war es, eine Methode zu finden, die erstens, wie schon erwähnt möglichst schonend ist, zweitens effektiv den DMSO-Gehalt reduziert und drittens möglichst anwenderfreundlich in das Kryokonservierungsprotokoll integriert werden kann.

Um den Reinigungserfolg bewerten und die Reduzierung des DMSO-Gehaltes mit verfolgen zu können, wurden die Osmolalitäten von BSS+ und Harbo-Proben mit unterschiedlichen DMSO-Konzentrationen bestimmt. Die Trendlinien der Messwerte beweisen einen linearen Zusammenhang und können deshalb als Kalibriergerade verwendet werden (siehe Abb. 78).

Zunächst wurden gewöhnliche Dialyseschläuche mit einer Ausschlussgrenze von 14000 MWCO verwendet. Die Idee war, sie nach Auftauen der Probe einfach auf die Probenschläuche zu stecken und dadurch ein weitgehend verlustfreies Befüllen des Dialyseschlauches bzw. Entleeren des Kryoschlauches zu gewährleisten. Der theoretische Ablauf ist in Abb. 21 dargestellt.

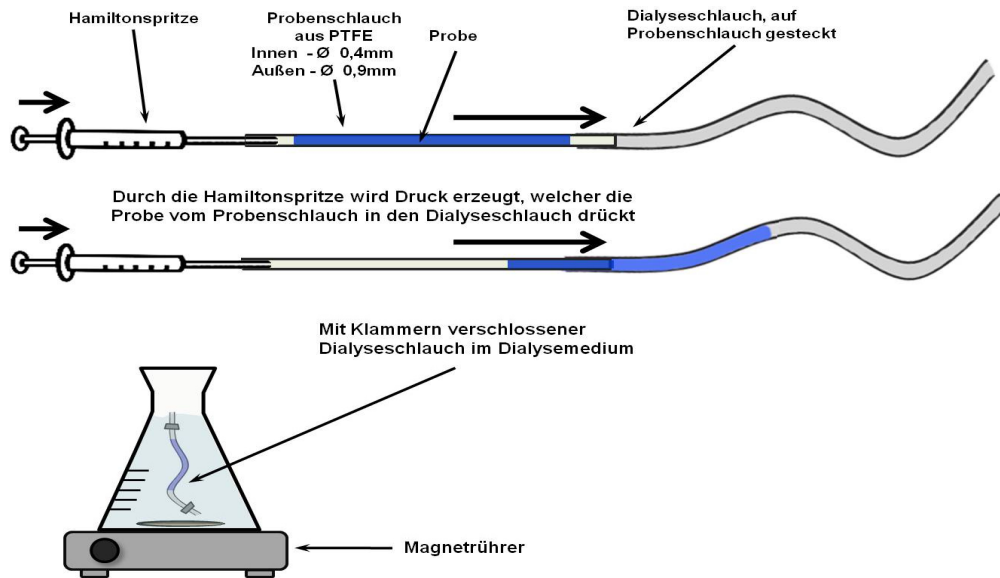


Abb.21: Schema zur theoretischen Probenbehandlung nach Auftauen zur DMSO-Entfernung mittels Dialyse.

Allerdings waren die verwendeten Dialyseschläuche (Carl Roth GmbH 1780.1) mit einem $\varnothing = 6,3\text{mm}$ für dieses Vorgehen ungeeignet (siehe 3.4.4.1). Deshalb wurden für die weiteren Versuche Mikrodialysierkammern, wie sie in Abb. 22 dargestellt sind, verwendet. Sie eignen sich zur Dialyse von wenigen μl (10-100 μl) und sind mittels Standardpipette weitgehendst verlustfrei befüll- und entleerbar. Ihr Aufbau macht sie zudem extrem anwenderfreundlich, da sie durch einfaches Umsetzen von einem Behältnis in ein anderes einen schnellen und einfachen Pufferwechsel ermöglichen. Die Kammern sind mit Hilfe von Klebeband reversibel verschließbar und gehen mittels spezieller Schwimmhilfe in anderen Flüssigkeiten nicht unter. Damit werden Verunreinigungen während des Dialysevorganges verhindert.

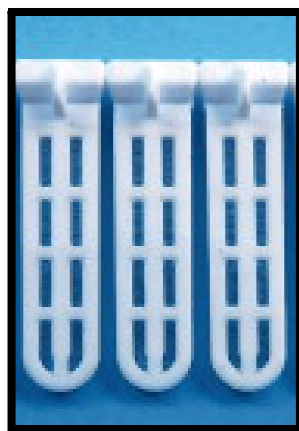


Abb.22:
Mikrodialysierkammer
bezogen von der Firma
Carl Roth GmbH,
Artikelnr. NH90.1

2.6.4.1.1 Zeitlicher Reinigungsverlauf

Um den Reinigungsverlauf zu untersuchen wurden Mikrodialysierkammern mit einer Ausschlussgrenze von 3500 MWCO mit 20µl einer 1,4M DMSO Lösung gefüllt. Verdünnt wurde das DMSO mit BSS+ bzw. Harbo-Puffer. Zuvor wurden die Osmolalitäten des Puffers mit und ohne DMSO bestimmt. Die befüllten Mikrodialysierkammern wurden dann je in ein Plastikröhrchen mit 3ml des entsprechenden Puffers ohne DMSO gesetzt. Die Dialyse fand bei Raumtemperatur statt, durch einen Rührfisch am Boden des Röhrchens konnte für ständiges Durchmischen des Puffers gesorgt werden. Nach unterschiedlichen Dialysezeiten (10min, 15min, 30min, 45min, (50min), 60min) wurden die Kammern mittels Standardpipette entleert und sowohl der Inhalt als auch der Dialysepuffer wurden am Osmometer untersucht. Mit Hilfe der Geradengleichung der Kalibriergerade, die an jedem Versuchstag neu erstellt wurde, ließen sich die DMSO-Konzentrationen berechnen. Dieser Versuch wurde dann in geringerem Umfang, also nur für einige Dialysezeiten, mit DMSO-haltigen Bienenspermien suspensionen (1:4 Verdünnungen) für beide Pufferarten wiederholt. Das sollte zeigen, ob und wie sich die Präsenz der Spermien auf den Dialyseverlauf auswirkt.

2.6.4.1.2 Einfluss der Dialyse auf die Spermiovitalität

Auch der Einfluss der Dialysenmethode auf die Vitalität der Bienenspermien, genaue gesagt auf die Integrität der Plasmamembranen, wurde untersucht. Dafür wurden je 3 Bienenspermienproben mit DMSO-haltigen BSS+ oder Harbo-Puffer 1:4 verdünnt und der Anteil membrangeschädigter Spermien mittels GPI-Aktivitätsmessung vor der Dialyse ermittelt. Anschließend wurden die Proben in Mikrodialysierkammern bei Raumtemperatur 30 min lang gegen den entsprechenden Puffer ohne DMSO dialysiert und danach nochmals mit dem GPI-Test untersucht. Da mit beiden Puffern gearbeitet wurde, war gleichzeitig auch ein Vergleich dieser möglich.

Es war davon auszugehen, dass auch die Dialysendauer den Grad der Schädigungen beeinflusst, deshalb wurde auch dieser Faktor eruiert. Dafür wurde der Anteil membrangeschädigter Spermien einer Bienenspermienprobe vor, nach unterschiedlich langen (zwischen 10-90 min) Dialysen, z.T. auch in Harbo-Puffer ermittelt. Gezeigt werden in Abb. 81 nur die Werte für 30 und 60 minütige Dialysen in BSS+, alle weiteren Werte bestätigen die dort gezeigten Ergebnisse, liefern darüber hinaus aber keine Informationen. Ermittelt wurde stets per GPI-Test der Anteil membrangeschädigter Spermien.

Zur Minimierung oxidativen Stresses während der Dialyse wurden das Antioxidans Glutathion und das Enzym Katalase als mögliche Zusätze für den Dialysepuffer getestet. Zusätzlich wurde auch ein Trypsinhemmer aus der Sojabohne, der die enzymatische Zersetzung von Proteinen unterbindet, als Pufferzusatz untersucht. Für jede Art des Zusatzes wurden die Membranintegritäten von 3 Proben vor und nach 30 minütiger Dialyse, sowie nach 30 minütiger Lagerung bestimmt. Dies geschah, wie auch bei den vorherigen Proben per GPI-Aktivitätsmessung. Die Konzentrationen der Zusätze betragen 10µg/ml für Trypsinhemmer, 1mM für reduziertes Glutathion und 20µg/ml für Katalase.

2.6.4.2 Zentrifugation zur schonenden DMSO-Entfernung

Die Zentrifugation ist die zweite Technik zur Entfernung von DMSO aus kryokonservierten Bienenspermaproben vor der Versammlung, die auf ihre Eignung hin untersucht wurde. In diesen Experimenten wurden verschiedene Zentrifugationsmedien, Geschwindigkeiten und Zusätze genauer betrachtet und miteinander verglichen.

Die verwendeten Drohnen waren 14-21 Tage alt und stammten aus Völkern ohne Königin. Es wurden Spermaportionen von je 28-40µl (23-42Drohnen) gebildet. Für jede Wiederholung der *in vitro* Experimente wurde je eine Spermaportion von Drohnen nicht verwandter Königinnen benutzt.

Die Überprüfung der Vitalität wurde mit Hilfe einer H342-PI-Fluoreszenzdoppelmarkierung durchgeführt und der Grad der Motilität wurde manuell durch Zählen beweglicher und immotiler Spermien ermittelt.

Zunächst wurden 5 verschiedene Zentrifugationsmedien miteinander verglichen, diese sind unter 2.2.2.2. Tab. 18 aufgelistet. Für jedes der 5 zu testenden Zentrifugationsmedien wurden 2 Spermaproben à 2µl zu je 38µl des entsprechenden Zentrifugationspuffers gegeben und mit einem spitz zulaufenden Glasstab verrührt. Anschließend wurde jede Probe (40µl) mit einer Standard-Verdrängungspipette in eine passende Pipettenspitze gezogen. Da die Pipette auf ein Volumen von 45µl gestellt war, wurde die Probe in einen etwas höheren Spitzenbereich gezogen und auch zur Öffnung durch Luft begrenzt. Im Anschluss wurde die Spitzenöffnung durch Hitzeeinwirkung vorsichtig verschweißt und die Probe ca. 10 min bei Raumtemperatur inkubiert.

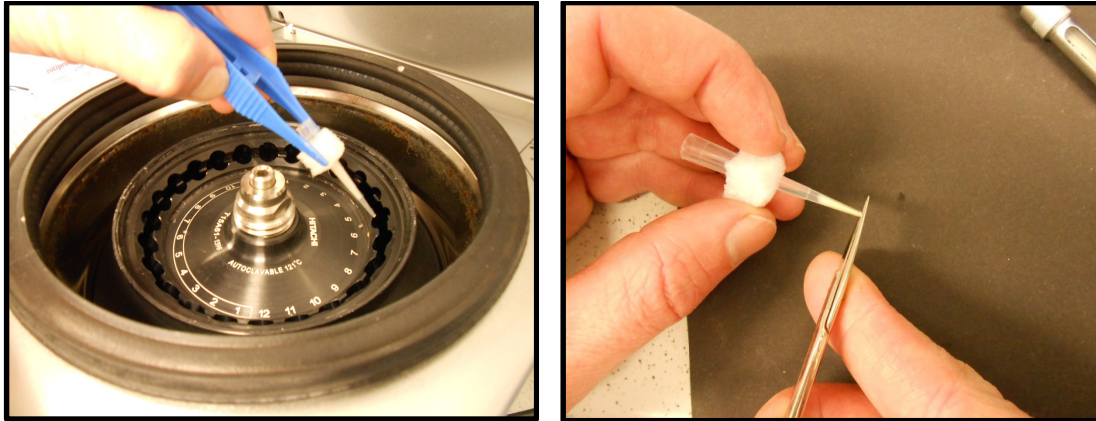


Abb.23: Zentrifugation von Bienenspermaproben in zugeschweißten Pipettenspitzen (A) und anschließende Öffnung dieser Kunststoffspitzen (B). Die Bienenspermien suspensionen wurden mittels Pipette in entsprechende Pipettenspitzen gezogen, die anschließend durch Hitzeeinwirkung (Feuerzeug und Pinzette) am spitzen Ende verschweißt wurden. Nach der Zentrifugation konnten die Pipettenspitzen durch vorsichtiges Aufschneiden wieder geöffnet werden.

Dann fand eine 12 minütige Zentrifugation der in Pipettenspitzen vorliegenden Spermienproben bei 1000 x g statt (siehe Abb. 23A). Die Überstände der Proben wurden anschließend entfernt und die sedimentierten Spermien für die Motilitätsprüfung und Vitalitätsuntersuchung in 1800µl K⁺-Puffer resuspendiert. Dafür wurden, wie in Abb. 23B gezeigt, die Pipettenspitzen am verschweißten zulaufenden Ende vorsichtig abgeschnitten möglichst ohne Probe zu verlieren. Um Kontrollwerte zu erhalten, wurden auch 2 x je 2µl der gepoolten Bienenspermien ohne Zentrifugation direkt mit 1800µl K⁺-Puffer gemischt. Das Experiment wurde 5-mal mit gleicher Durchführung wiederholt.

Auch verschiedene Zentrifugationsgeschwindigkeiten wurden vergleichend untersucht. Dafür wurden pro Geschwindigkeit je 2 Bienenspermaproben 1:20 mit BSS verdünnt und 12 Minuten lang mit 1000xg, 1300xg, 1600xg oder gar nicht zentrifugiert. Wie im Experiment zuvor wurden anschließend die Membranintegrität und die Motilität der Proben ermittelt. Dieser Versuch wurde 4-mal wiederholt.

Es wurde auch untersucht, ob sich unterschiedliche Zusätze zum Zentrifugationsmedium positiv auf die Spermiovitalität auswirken. Getestet wurden Eigelb (2% v/v), Aprotinin (2% und 0,2% v/v) und Katalase aus Rinderleber (6% und 0,6% v/v). Um den Effekt der Zusätze ermitteln zu können, wurden auch Proben ohne Zusatz, sowie nicht zentrifugierte Kontrollen untersucht. Wie bei den vorherigen Experimenten wurden die Membranintegrität und die Motilität zur Beurteilung der Spermiovitalität betrachtet. Pro Behandlung wurden je 2 Aliquots 1:20 mit additivhaltigem oder reinem BSS verdünnt und anschließend in einer verschweißten Pipettenspitze 12 Minuten lang bei 1000xg

zentrifugiert. Danach wurden die Proben dann, wie schon zuvor beschrieben, untersucht. Dieses Experiment wurde 4-mal wiederholt, wodurch insgesamt 56 Proben untersucht wurden.

Da die durch Zentrifugation gereinigten Spermienproben anschließend für die Besamung von Königinnen verwendet werden soll und diese maximal ca. 14µl aufnehmen können, wurde geprüft, ob und wie stark sich die Dichte von Bienensperma verändert. Dafür wurden zunächst je 37µl große Bienenspermaportionen von drei Kolonien gewogen und über den Mittelwert der Resultate die Dichte des Spermas (0,99mg/µl) errechnet. Anschließend wurden die Bienenspermapools in 8µl-Portionen aufgeteilt und jeweils 1:20 mit BSS verdünnt. Danach fand die 12 minütige Zentrifugation bei 1000xg, 1300xg oder 1600xg in zuvor gewogenen Pipettenspitzen statt. Nach Entfernung des Überstandes wurden die Spitzen mitsamt den Bienensperma-Pellets nochmals gewogen. Aus den entstandenen Differenzen ließen sich dann für jede Zentrifugationsgeschwindigkeit mit Hilfe der zuvor errechneten Dichte die Volumina der gereinigten Spermaproben ermitteln.

2.6.4.3 Besamungsversuche mit gereinigtem Bienensperma

Nachdem die *in vitro* Untersuchungen abgeschlossen waren, wurde die Reinigungsmethode der Zentrifugation in einem Besamungsversuch mit zwei Wiederholungen verwendet. Für diese Analyse wurden zwei unabhängige Gruppen von Schwesterköniginnen verwendet. Die Königinnen wurden bis zur Besamung (nach ca. 10-11 Tagen) in Kleinvölker mit ca. 2000 Arbeiterinnen gesetzt. Zunächst wurde frisches Drohnensperma gepoolt und durch vorsichtiges Verrühren gemischt. Pro Wiederholung wurden 5-mal je 7µl des Spermas 1:20 mit BSS verdünnt und 12 Minuten lang mit 1300xg zentrifugiert. Anschließend wurden die nach Entfernung der Überstände rekonzentrierten Spermienproben versamt. Zur Kontrolle wurden je Durchgang 5 Königinnen mit jeweils 7µl nicht zentrifugierten Spermas besamt. Ca. 18 Tage nach der ersten Eiablage wurden die Brutnester auf Drohnenbrut hin untersucht, die Königinnen wurden getötet und die Anzahl von Spermien in den Spermatheken ermittelt.

Nach diesem Experiment wurden in einem weiteren Besamungsversuch die Reinigungsmethoden der Zentrifugation und Dialyse vergleichend betrachtet. Hierfür wurden Bienenspermaproben verwendet, die zuvor mit 10% DMSO verdünnt, mit 3°C/min bis -50°C eingefroren, anschließend in N₂ kurzzeitig gelagert und in 35°C warmen Wasser aufgetaut wurden. Insgesamt wurden 39 Königinnen besamt, dabei fanden 5 verschiedene

Behandlungen, bzw. Reinigungsmethoden Anwendung. Es wurden Proben ohne DMSO-Entfernung, sowie Proben nach 30 minütiger Dialyse ohne Additiv im Dialysepuffer, nach 30 min Dialyse mit Katalase im Dialysenpuffer, nach 12minütiger Zentrifugation mit 1000xg und nach 12 minütiger Zentrifugation mit 1300xg versamt und miteinander verglichen. Zu jeder besamten Königin wurde die Brut kontrolliert und der Anteil weiblicher Nachkommen ermittelt.

2.7. Eiskristallbildung während des Slow Freezing

2.7.1. Multiphotonen Laserscanning-Mikroskopie des Gefriervorganges

Um die Geschehnisse in einer Bienenspermaprobe während des Gefriervorganges besser zu verstehen, wurden DMSO-haltige Bienenspermaproben während der Abkühlung mittels Multiphotonen Laserscanning-Mikroskopie am Fraunhofer Institut für biomedizinische Technik (IBMT) in St. Ingbert untersucht. Diese Methode ermöglichte eine direkte fluoreszenzmikroskopische Betrachtung der Probe während des Gefriervorganges, der mit exakten Abkühlraten stattfand.

Bienenspermaproben wurden 1:100 mit BSS verdünnt und mit 10% DMSO sowie den Fluoreszenzfarbstoffen H342 (5 μ M) und Fluorescein (0,1M) versetzt. Während H342 alle Spermienköpfe blau markiert, färbt Fluorescein das extrazelluläre grün Medium an. Weil Eiskristalle aus reinem Wasser bestehen und das Fluorescein im restlichen flüssigen Volumen verbleibt, ermöglicht diese kombinierte Färbung eine klare Unterteilung von Eis, eisfreiem Volumen und Spermienzellen. Die Probe wurde auf einem Quarzglas Objektträger mit Deckglas von 20°C auf -20°C mit 3°C/min herunter gekühlt und dabei mit einem Multiphotonen Laserscanning-Mikroskop beobachtet. Die Kühlung geschah von oben durch N₂-Dampf. Bei verschiedenen Temperaturen und in verschiedenen Fokustiefen wurden Fluoreszenzbilder erstellt.

2.7.2. Erfassung der Nukleationstemperatur und manuelles Seeding

Da auch die Temperatur der einsetzenden Kristallisation (Nukleation) die Vorgänge der Kryokonservierung durch Grad der Unterkühlung und Geschwindigkeit des Eiskristallwachstums beeinflusst, sollte diese anfangs in reinen Pufferproben und anschließend in Eber- und Bienenspermaproben ermittelt werden. Da während der Nukleation Wärme in Form von Kristallisationswärme frei wird, ist der Zeitpunkt bzw. die Temperatur der einsetzenden Eiskristallbildung mittels Temperaturmessung innerhalb der Probe anhand einer sprunghaften Temperaturerhöhung erkennbar.

Für diese Untersuchungen musste die Temperatur innerhalb des Probenschlauchs ($\varnothing=0,4\text{mm}$) gemessen werden, weshalb mit einem sehr feinen Temperaturfühler ($\varnothing=0,2\text{mm}$) gearbeitet wurde. Die Konstruktion, mit der die Temperatur während des Gefriervorganges gemessen wurde, ist in Abb.24 schematisch dargestellt.

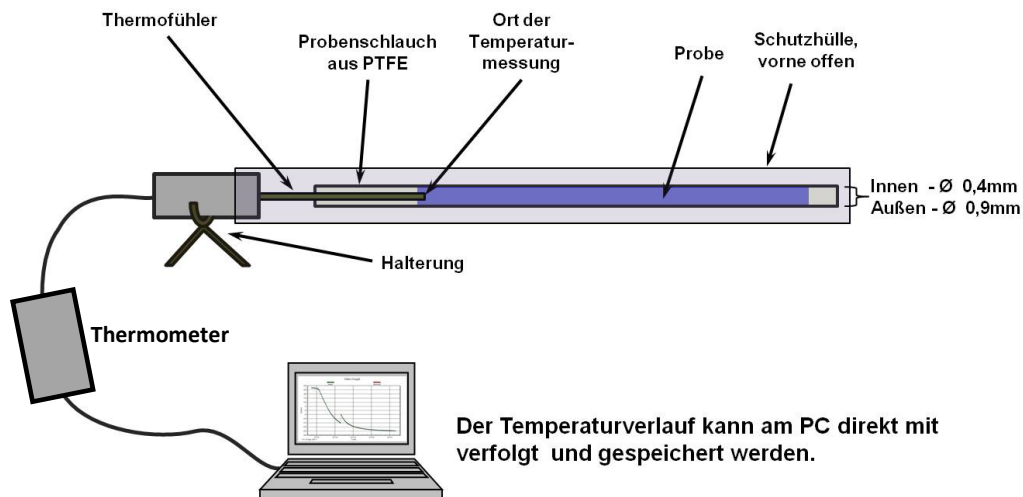


Abb.24: Temperaturmessung innerhalb eines Probenschlauchs während des Abkühl- und Gefriervorganges. Gezeigt wird ein Schema zum Aufbau der permanenten Temperaturüberwachung innerhalb eines Probenschlauchs während des Gefriervorganges. Die Temperatur der Probe wird von einem sehr feinen Temperaturfühler ($\varnothing=0,2\text{mm}$) an der Spitze erfasst und über ein digitales Thermometer an einen angeschlossenen PC mit speziellem Programm übertragen. So kann die Temperatur jeder Zeit mit verfolgt und gespeichert werden.

Zunächst wurde der Temperaturverlauf von BSS+ mit 10% (v/v) DMSO während einer Abkühlung im Eisschrank aufgenommen. Um kostbares und in geringen Mengen beschaffbares Bienensperma zu sparen und saisonal unabhängig zu sein, wurden anschließend Eberspermaproben, 1:10 mit DMSO-haltigem (10% v/v) BSS+ verdünnt, verwendet. Aus diesen Gründen wurden auch nur zwei Messungen mit 1:4 verdünnten Bienenspermaproben durchgeführt. Versuche zum manuellen Seeding, also der vorzeitig herbeigeführten Nukleation, wurden ausschließlich an Puffer und Eberspermienproben durchgeführt. Generell kann man die Nukleation mittels verschiedener Verfahren manuell einleiten und somit den Grad der Unterkühlung verringern. So wurde versucht durch Vibrationen mittels eines ferngesteuerten Vibrationsgerätes eine Eiskristallbildung bei niedrigeren Temperaturen zu erreichen. Auch durch Berühren des Probenschlauchs mit einer stark unterkühlten, zuvor in N_2L gehaltenen Pinzettenspitze wurde probiert die Nukleationstemperatur zu erhöhen. Parallel zu diesen Versuchen wurden am LIB in Hohen Neuendorf ähnliche Experimente durchgeführt. Statt einer unterkühlten Pinzettenspitze

wurde eine für den automatischen Freezer entwickelte Vorrichtung für manuelles Seeding verwendet, die jedoch nach dem gleichen Prinzip funktionierte.

2.8. DMSO-Zusatz mittels Dialyse zur Erhaltung der natürlichen Spermienbündelung und zum Schutz der extrazellulären Spermamatrix

Bislang wurden alle Versuche mit verdünnten und meist durchmischten Bienenspermaproben durchgeführt. Um sich ein besseres Bild vom Zustand natürlichen Bienenspermas zu machen, wurden unverdünnte Proben, z.T. mit nachträglicher und vorsichtiger Pufferzugabe mikroskopisch untersucht und fotografiert (siehe Abb. 89). Veränderungen der Spermienlage, -form und -bewegung mit zunehmender Verdünnung wurden genau beobachtet. Z.T. wurden die Mikroskopieaufnahmen nachträglich am PC neu eingefärbt um die verschiedenen Bereiche deutlicher unterscheiden zu können.

Es wurde nach einer zur Verdünnung und Durchmischung alternativen Möglichkeit gesucht, das Kryoprotektivum DMSO möglichst schonend zuzusetzen, ohne den in unbehandeltem Bienensperma vorgefundenen natürlichen Zustand der Spermien zu zerstören. Deshalb wurde DMSO per Dialyse zugesetzt.

In einem Besamungsversuch wurden drei verschiedene Dialysemethoden für die DMSO-Zugabe verwendet und mit einander verglichen. Als Vorbereitung für alle Dialysen wurden pro Verfahren zwei Mikro-Dialysekammern in doppelt-destilliertem Wasser für 30 min inkubiert. Anschließend wurden 70-80µl Bienensperma in jede Kammer gegeben und gegen 20 ml DMSO-haltigen BSS+ dialysiert. Die DMSO-Konzentration, die Temperatur und die Dialysedauer variierten zwischen den Verfahren. Das Einfrieren wurde dagegen immer gleich durchgeführt. Für jedes der drei Verfahren wurde eine Probenportion so in je einen Kryoschlauch (PE) gefüllt, das an beiden Enden min. 1cm Luft war. Im Folgenden wurden die Enden unter Hitzeeinwirkung verschweißt. Die Probenschläuche wurden dann, gesammelt in perforierten Plastikröhrchen, um ein schnelles Überführen in N₂l zu ermöglichen, in den programmierbaren Freezer (IceCube, SyLab, Österreich) gesetzt. Dort inkubierten die Proben für 5 min bei 20°C und konnten anschließend mit 3°C/min bis -40°C abgekühlt werden. Sofort nach Erreichen der -40°C fand die Überführung der Proben in N₂l statt.

Tab.23 : Beschreibung der verschiedenen Behandlungsverfahren.

<u>Protokoll A:</u> Dialyse gegen 13,5% DMSO
Bei dieser Methode wurden die Bienenspermaproben gegen BSS mit 13,5% (v/v) DMSO 150 min bei 34,5°C dialysiert. Ein weiterer Unterschied zu den anderen Methoden ist das Auftauverfahren nach der Kryokonservierung. Die Proben zu Protokoll A wurden 10sec. in 35°C warmes Wasser statt Paraffinöl gehalten. Es wurden 6 Königinnen mit je 6-7µl der Probe besamt.
<u>Protokoll B:</u> Dialyse gegen 21% DMSO
In diesem Verfahren wurden die Bienenspermaproben 32min lang gegen 21% (v/v) DMSO in BSS bei 22,5°C dialysiert. Eine Rüttelplatte sorgte dabei für vorsichtige Bewegung. Zum Auftauen nach der Kryokonservierung wurden die Proben 15 sec. in 35°C warmes Paraffinöl gehalten. Es wurden 6 Königinnen mit je 6-7µl der Probe besamt.
<u>Protokoll C:</u> Dialyse gegen 21% DMSO mit Verdünnung vor Besamung
Bei dieser Methode wurde wie unter Protokoll B beschrieben dialysiert und aufgetaut, doch vor der Versamung der Proben wurden diese 1:2 mit BSS verdünnt, um die DMSO-Konzentration zu reduzieren. Der verwendete BSS enthielt gegen Bakterien 0,01% Penicillin und 0,02% Streptomycin. Um die Spermienbündel nicht zu zerstören wurde nur minimal durchmischt. Für die Besamung wurde mit 10µl pro Königin etwas mehr Spermaprobe eingesetzt, als bei den anderen Verfahren, allerdings wurden nur 3 Königinnen besamt.

Für die Bestimmung der Motilität nach der Kryokonservierung, wurde von jeder Probe ein kleines Aliquot direkt nach dem Auftauen 1:1500 mit K+-Puffer (Zusammensetzung siehe 2.2.2.1.) verdünnt und mikroskopisch untersucht.

Anzahl und Motilität der Spermien in den Spermatheken wurde 39 Tage nach Besamung ermittelt. Die Königinnen wurden dafür getötet und sezirt. Ihre Spermatheken wurden in je 20µl K+-Puffer überführt und der Inhalt jeder Theka wurde mit insgesamt 100µl desselben Puffers ausgespült. Mit Aliquots dieser Suspensionen wurden dann die Spermienanzahl pro Spermatheka sowie die Beweglichkeit der gefundenen Spermien ermittelt.

Die Anteile weiblicher Brut in den entstandenen Brutnestern wurden 18-19 Tage nach Beginn der Eiablage untersucht. Dafür wurde die gesamte verdeckelte Brut entfernt und das Geschlecht aller Nachkommen anhand der Deckelform bestimmt.

2.9. Abschließende vergleichende Untersuchungen zur Beurteilung des optimierten Kryoprotokolles

In einem weiteren Experiment wurden die bislang erstellten Protokolle für die Kryokonservierung von Bienensperma verwendet und in einem Besamungsversuch mit einander verglichen. Zusätzlich zu den 3 verschiedenen Kryoproben wurde auch Frischsperma versamt, um eine bessere Vergleichsgrundlage zu schaffen. Die drei Kontrollköniginnen wurden zwei Tage früher besamt, als alle Kryoköniginnen, um die Lagerungszeit des Spermas gleich zu halten. Die drei Kryomethoden werden im Folgenden aufgelistet.

Tab. 24: Beschreibung der verschiedenen Kryokonservierungsmethoden.

<u>Methode 1: DMSO-Zusatz durch Verdünnung</u>
<p>Gepooltes Bienensperma von Drohnen zweier Königinnen wurde 1:1,25 mit 50%igem DMSO (v/v) in doppelt-destilliertem Wasser versetzt. Die resultierende DMSO-Konzentration betrug 10% (v/v). Um einen osmotischen Schock durch die DMSO-Zugabe zu vermeiden, wurde das Kryoprotektivum mit Hilfe einer sehr feinen Kapillare (Innen-$\varnothing=0,32\text{mm}$, Außen-$\varnothing=0,4\text{mm}$; Hilgenberg) langsam zugesetzt und währenddessen vorsichtig verrührt. Nach einer 10 minütigen Equilibrierung wurden 9μl-Portionen der Spermien suspension so in dünne Polyethylen-Schlauchstücke (Innen-$\varnothing= 1\text{mm}$, Außen-$\varnothing= 1,8\text{mm}$; Karl Roth;) gefüllt, dass an beiden Enden min. 1cm Luft verblieb. Anschließend wurden die Schlauchenden unter Hitzeeinwirkung durch Verschweißen geschlossen. Das weitere Vorgehen, also der Behandlungsschritt des Einfrierens, entsprach der unter 2.8.2. beschriebenen Kryomethode.</p> <p>Die Proben wurden 48Std. in N_{21} gelagert und durch direktes Überführen in 35°C warmes Wasser (10sek. lang) aufgetaut. Anschließend wurden die Proben sofort in eine Besamungsspritze überführt und für die Besamung von 14 Bienenköniginnen verwendet.</p>
<u>Methode 2: DMSO-Zusatz durch Dialyse (entspricht Protokoll B in 2.8.2.;)</u>
<p>Methode 2 entspricht Protokoll B in Tab. 22. Ein wichtiger Unterschied ist jedoch, dass bei diesem Versuch Besamungsaliquots von 9μl einzeln in Schläuche abgefüllt und eingefroren wurden (siehe Methode 1) und nicht wie unter 2.8.2. beschrieben eine einzige große Portion für alle Besamungen. Das Einfrieren der Proben geschah, wie oben beschrieben. Das Auftauen geschah durch Überführung in 35°C warmen Paraffinöl (15 sek.). Mit diesen Proben wurden 13 Bienenköniginnen besamt.</p>

Methode 3: DMSO-Zusatz durch Dialyse + Zentrifugation nach Auftauen

Die Proben wurden, wie unter Methode 2 beschrieben per Dialyse mit DMSO versetzt, mit 3°C/min bis -40°C eingefroren, in N₂ überführt und in 35°C warmem Paraffinöl aufgetaut. Vor Versamung fand jedoch ein Reinigungsschritt statt um den DMSO-Gehalt zu mindern. Dafür wurden die Proben jeweils 1:20 mit BSS verdünnt und in 200µl-Pipettenspitzen gefüllt, die anschließend durch Verschweißen verschlossen wurden. Es folgte eine 12 minütige Zentrifugation bei 1300xg. Der Überstand wurde verworfen und die an der Spitze abgesetzten Spermien wurden für die Besamungen verwendet. Insgesamt wurden 14 Königinnen mit nach dieser Methode behandelten Spermien besamt.

Die Bestimmung der Anzahl und Motilität der Spermien in den Spermatheken sowie der Anteil weiblicher Brut wurde, wie unter 2.8. beschrieben, durchgeführt. Zusätzlich wurde auch die Membranintegrität der Spermien in den Spermatheken untersucht. Dafür wurden die aus den Spermatheken entnommenen Spermien mit den Fluoreszenzfarbstoffen Hoechst 33342 (5µM) und Propidium Jodid (150µg/ml) angefärbt. Wie unter 2.3.3. beschrieben, kann man mit dieser Fluoreszenz-Doppelmarkierung membrangeschädigte Spermien von Spermien mit intakten Membranen unterscheiden.

Da DMSO im Verdacht steht Genmaterial zu schädigen, wurden für drei Spermienpools je zwei Aliquot unbehandelt, kryokonserviert nach Methode 1, sowie nach Methode 2 auf DNA-Schäden hin untersucht. Zuvor beschriebene Versuche zeigten, dass der TUNEL-Test zuverlässig DNA-Fragmentierungen erkennen lässt, weshalb er für diese Untersuchung angewendet wurde. Die Durchführung erfolgte, wie unter 2.3.8.3. beschrieben.

3. Ergebnisse

3.1. Entwicklung eines schnellen *in vitro* Vitalitätstests

3.1.1. Zellkonzentrationsbestimmung

Die Spermienkonzentration im Ejakulat ist ein wichtiges Fertilitätsmerkmal nicht nur für Säugetiere. Die automatisierten Zählverfahren mittels Phasenkontrastmikroskopie und Spermienkopferkennung, die für Säugerspermien entwickelt wurden (CASA = Computer Assisted Sperm Analysis), können nicht auf Bienenspermien übertragen werden, da Bienenspermien fadenförmig sind, ohne morphologisch abgrenzbare Kopfstruktur. Abbildung 25A zeigt Bienenspermien in einer Neubauer-Zählkammer im Phasenkontrast. Die Anzahl der Spermien kann manuell in mehreren Kleinquadraten (farbig markiert mit 16 Kleinstquadraten) ausgezählt werden, eine automatisierte Zählung ist aber nicht möglich.

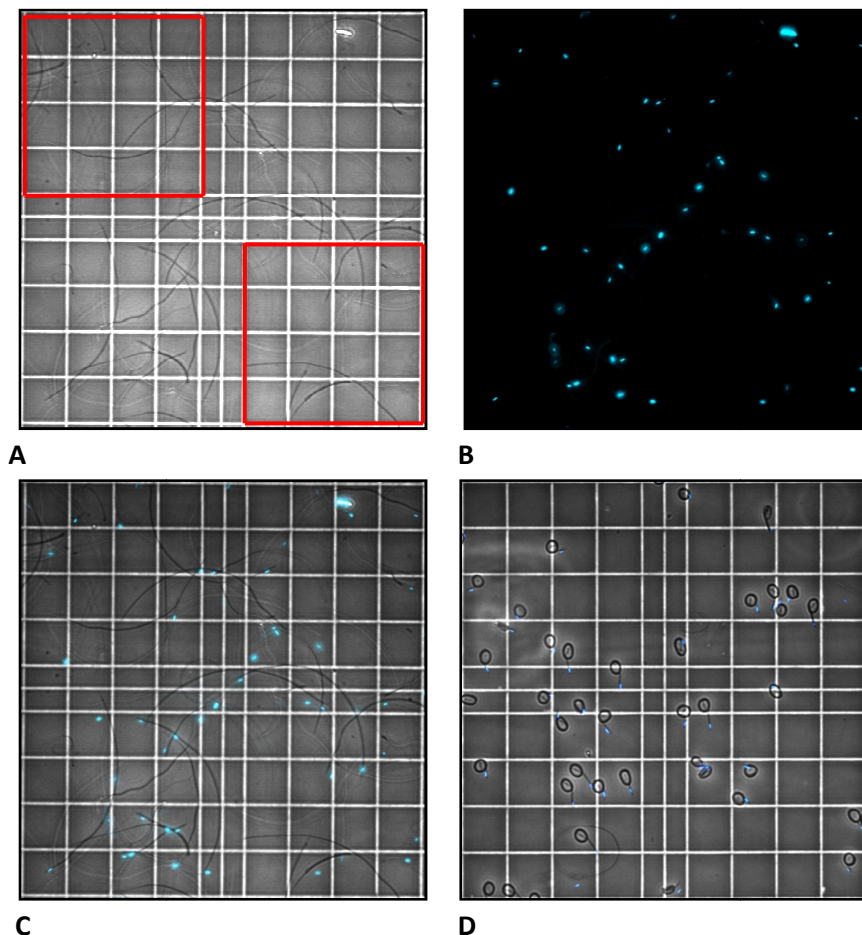


Abb.25: Phasenkontrast- und Fluoreszenzaufnahmen von Bienenspermien in einer Neubauer-Zählkammer.

Die Bienenspermien wurden 1:1000 verdünnt. Bei A-C fand die Verdünnung ausnahmslos mit BSS statt, während bei D) die letzte Verdünnung (1:10) mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$ durchgeführt wurde. In A) werden die Bienenspermien im Phasenkontrast dargestellt, B) zeigt die zugehörige H342-Fluoreszenzaufnahme des gleichen Bereichs und C) die Übereinanderlagerung aus A) und B). In D) wird eine Kombination

aus Fluoreszenzbild und Phasenkontrastaufnahme von 1:100 in BSS und anschließend 1:10 in H₂O_{dest.} verdünnten Bienenspermien gezeigt.

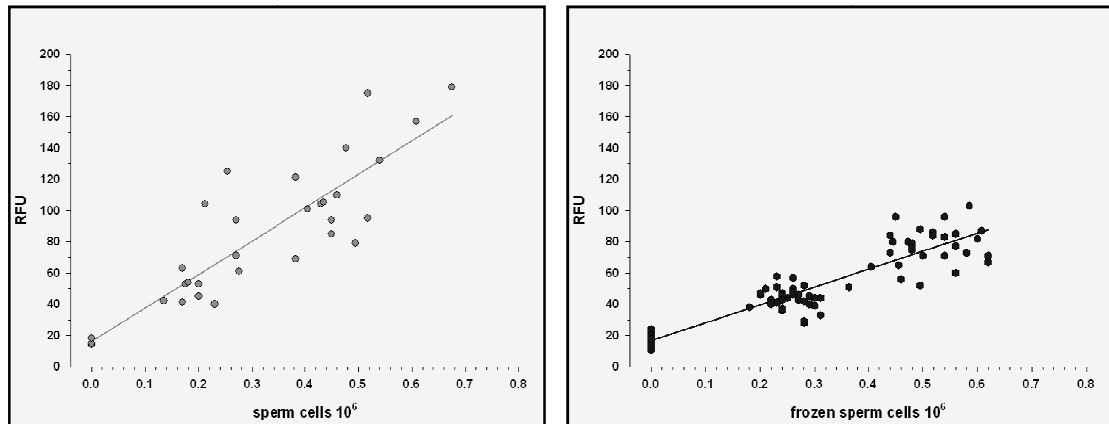
Alle Proben wurden vor Untersuchung mit 5µM H342 20 min bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Die Aufnahmen wurden mit einem 20-fach Objektiv erstellt. Die Integrationszeiten betragen 40ms für die Phasenkontrastbilder und 120-200ms für die Fluoreszenzaufnahmen. Die farbigen Linien zeigen die Größe eines Kleinquadrates an. Bei der Zählung werden nur die Spermien, die innerhalb des Quadrates und auf zwei der Außenlinien liegen, gezählt. Die Auswahl der mitzuzählenden Linien wird im Vorhinein zufällig getroffen.

Die manuelle Zählung wird erleichtert, wenn die Motilität der Spermien durch Probenverdünnung mit destilliertem Wasser unterbunden wird. Während in iso- oder hyperosmotischen Puffern die Spermien gestreckt bis gebogen vorliegen, zeigten die mit H₂O_{dest.} verdünnten Spermaproben stark eingerollte Spermien (Abb. 25D). Eine computerunterstützte Auswertung wird möglich, wenn die stark kondensierten Kerne mit H342 angefärbt werden (Abb. 25B-D). Diese Fluoreszenzpunkte können nun durch Bildverarbeitungsprogramme gezählt werden.

Das SSIQ- (**S**oftware **S**upported **I**mage **Q**uantification) Verfahren wurde auf Bienenspermien angepasst und mit der manuellen Zählmethode verglichen. Als Fluoreszenzfarbstoff wurden sowohl H342 (Gesamtzahl der Spermien) als auch Propidiumiodid (Spermien mit Membranschäden) eingesetzt. Wie Tabelle 25 belegt, differieren die Zählungen beider Quantifizierungen nur geringfügig (<5%; n= 22). Bei nachfolgenden SSIQ-Auswertungen wurden stichprobenartig weitere manuelle Zählungen durchgeführt. Sie bestätigten, dass eine computergestützte Zählung nicht signifikant von der manuellen Zählung abweicht. Die Fluoreszenzanfärbung mit H342 wurde zudem auch für die manuelle Zählung angewendet, da sie hilft die Spermien zu erkennen und zu differenzieren.

Tab. 25: Ergebnisse der vergleichenden Spermienquantifizierung mittels manueller und PC-gestützter Verfahren. Insgesamt wurden 22 Zählungen durchgeführt und 578 Spermien gezählt.

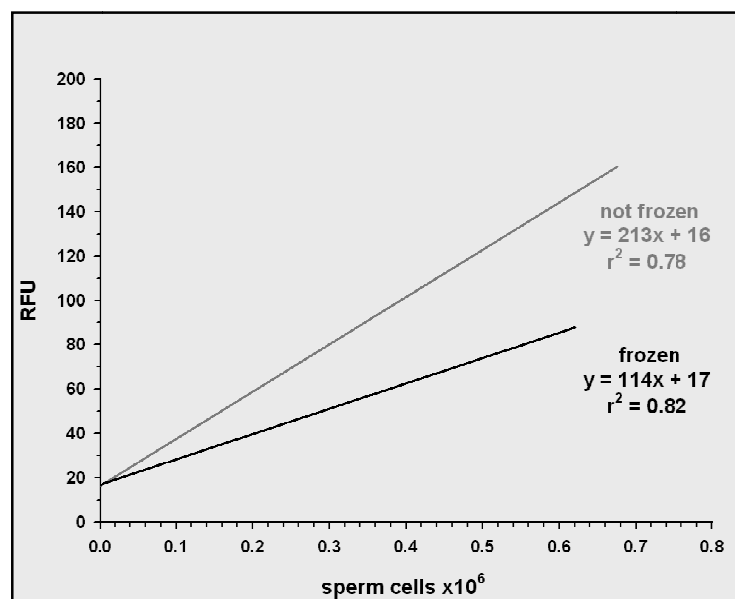
	PC-Auswertung	Hand-Auswertung	Stabw. der Differenz
Prozentanteil H342-markierter Spermien	100%	99%	0,17%
Prozentanteil PI-markierter Spermien	17,5%	17,1%	0,70%



A

B

Abb. 26: Fluoreszenzwerte H342-markierter unbehalteter (A) und zuvor gefrorener (B) Bienenspermasuspensionen mit verschiedenen Spermienkonzentrationen, dargestellt in Streudiagrammen mit entsprechender Trendlinie. Es wurden die Fluoreszenzintensitäten von H342 (5 μ M) versetzten Bienenspermaproben am Ascent Fluoroskan bestimmt. Die Exzitation fand bei einer Wellenlänge von 340nm statt, während die Emission bei 460nm gemessen wurde. Parallel zu den Fluoreszenzmessungen wurden manuelle Zählungen am Mikroskop durchgeführt um die Zellkonzentrationen zu ermitteln. Die Fluoreszenzwerte, angegeben in relative Fluoreszenz-Einheiten, wurden dann gegen die manuell ermittelten Spermienkonzentrationen in Form eines Streudiagramms aufgetragen und die Trendlinien erstellt



C

Abb. 27: Kalibriergeraden zu den Fluoreszenzen H342-markierter Bienenspermaproben Dargestellt sind die aus Abb.26A) und B) resultierenden Trendlinien mit Geradengleichungen und Bestimmtheitsmaßen. Diese Geraden können für H342-markierte Spermienproben unbekannter Zelldichte als Eichgeraden fungieren, wodurch es möglich ist, über die Fluoreszenzintensität mit Hilfe der Geradengleichung die Zelldichte zu ermitteln. Dabei muss für unbehaltene Bienenspermien die Geradengleichung der steileren (hell grau) Gerade und für zuvor gefrorene Bienenspermien die Gleichung der flacheren (dunkel grau) Gerade verwendet werden.

In einem weiteren Versuch wurde geprüft, ob die Fluoreszenzintensität auch spektrometrisch gemessen werden kann und über eine Kalibrierung Auskunft über die Spermienzahl einer Probe Auskunft gibt. In Abb. 26 ist die Spermienkonzentration gegen die relative Fluoreszenzintensität aufgetragen, zum einen für unbehandelte Bienenspermien (Abb. 26A), zum anderen für zuvor gefrorene und wieder aufgetaute Bienenspermien (Abb. 26B). Es bestätigt sich für beide Zellsorten ein linearer Zusammenhang zwischen Zellkonzentration und Fluoreszenzintensität, jedoch steigt die Fluoreszenz in unbehandelten Spermienproben mit zunehmender Konzentration stärker (Steigungswert 213) als in gefrorenen Proben (Steigungswert 114). Die Korrelationskoeffizienten der Geraden betragen $r^2 = 0,78$ und $0,82$ (siehe Abb 27).

3.1.2. Hypoosmotischer (HOS)-Test

Ein wichtiges und häufig untersuchtes Qualitätsmerkmal von Spermien ist die Integrität der Zellmembran. Um diese Integrität zu testen, wurden verschiedene Verfahren insbesondere an Spermien von Säugetieren entwickelt. Die folgenden Abschnitte zeigen, wie weit diese Tests auch für die Prüfung der Membranintegrität von Bienenspermien geeignet sind.

Der HOS-Test ist bei Säugerspermien eine bekannte und bewährte Prüfung zur Integrität der Plasmamembran, die Aussagen über den Anteil funktionstüchtiger und auf Außenreize reagierender Spermien zulässt. Bei Insekten, speziell bei Honigbienen ist dieser Test jedoch noch nicht angewendet worden. Deshalb musste zunächst geprüft werden, ob und wie Bienenspermien auf ein hypoosmotisches Außenmedium reagieren.

Vergleicht man die Kontrolle (Abb. 28A) mit den zunehmend hypoosmotischen Spermiesuspensionen (28B bis D), so erkennt man deutliche Reaktionen der Bienenspermien auf Hypoosmose. Während in der Kontrolle die Spermien geschlängelt bzw. leicht gebogen vorliegen und häufig starke Motilität zeigen (beobachtetes Ergebnis), sind sie in hypoosmotischem Medium meist immotil und weisen eingerollte Flagellen-Enden (siehe 28B) auf. Bei höherer Verdünnung mit $H_2O_{dest.}$ rollen sich intakte Bienenspermien stärker ein (siehe 28C), bis sie bei einer 1:20 Verdünnung mit $H_2O_{dest.}$ als vollständig eingerollte Kreise zu erkennen sind (Abb. 28D). Neben den mehr oder wenig eingerollten Zellen sind auch langgestreckte Bienenspermien erkennbar, die offenbar nicht auf die osmotischen Bedingungen reagieren konnten (siehe Pfeile in 28C/D). Diese Spermien dürften aufgrund von Membrandefekten unempfindlich sein im HOS-Test (vgl. 3.1.3).

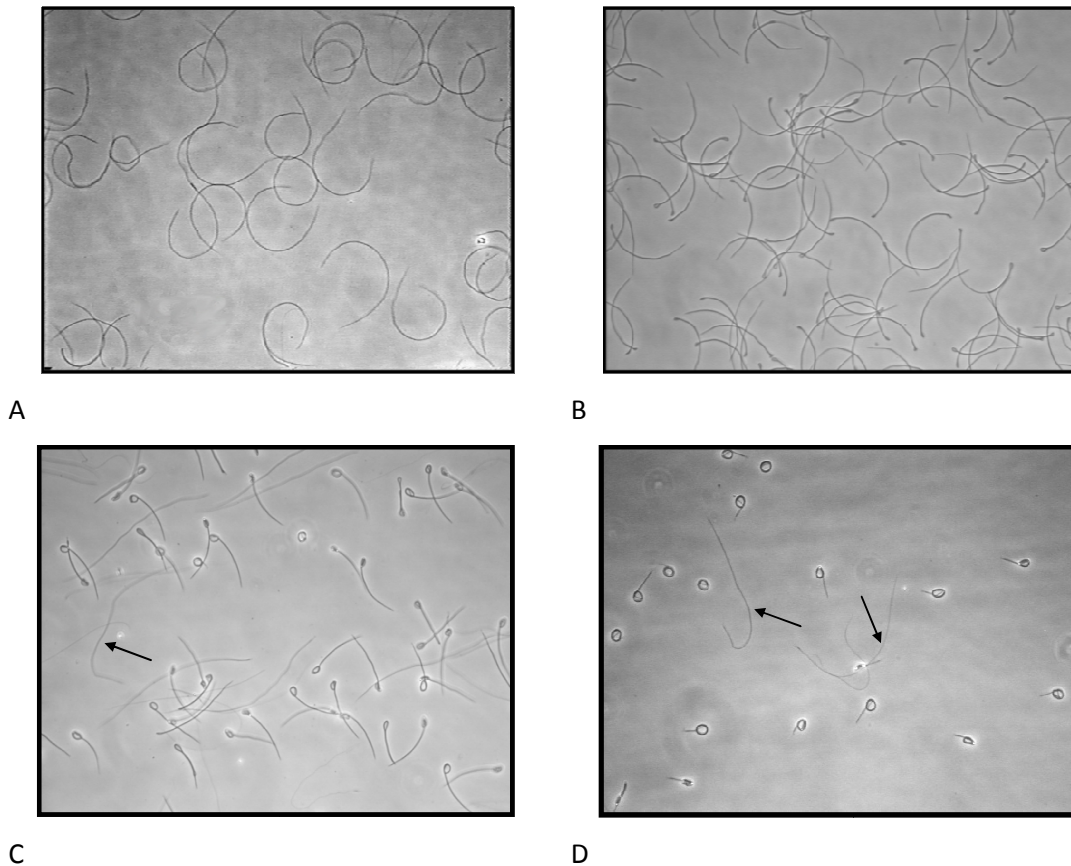


Abb. 28: Phasenkontrastaufnahmen von Bienenspermien verdünnt in BSS (A) und in H₂O dest. (B-D). Die Spermproben wurden zunächst 1:100 mit BSS Puffer zu einer homogenen Zellsuspension verdünnt. Ein Teil der Suspension wurde anschließend mit BSS nochmals 1:10 verdünnt (Gesamtverdünnung 1:1000, A). Weitere Aliquots wurden mit H₂O_{dest.} 1:5 (B), 1:10 (C) und 1:20 (D) verdünnt. Alle Aufnahmen wurden mit einem 20-fach Objektiv erstellt, die Belichtungszeit betrug immer 40ms

3.1.3. Lebend-tot-Färbung mittels Hoechst 33342 (H342) und Propidium-iodid (PI)

Bei den hier vorgestellten Versuchen wurde der Zustand der Plasmamembran durch eine Doppelmarkierung mit H342 und PI untersucht. Beide Substanzen binden an das Chromatin, H342 ist aber im Gegensatz zu PI membrangängig, markiert also alle Kerne, während PI nur Kerne von den Spermien markiert, die defekte Plasmamembranen besitzen.

Da die Köpfe von Bienenspermien im Vergleich zu den Spermien anderer Spezies klein ausfallen und sich nur wenig von den Flagellen unterscheiden, wurden relativ hohe Farbstoffkonzentrationen gewählt, um ein starkes Signal zu erhalten. Mit 5 μ M H342 und 150 μ g/ml PI konnten deutliche Signale erzeugt werden (siehe Abb. 29A). In frischen Spermproben (bis 3Tagen in Kapillaren bei 17°C aufbewahrt) wurden jedoch meist nur wenige Spermien durch PI angefärbt. Der prozentuale Anteil betrug 9-23% (n= 13). Da eine

vorrausgegangene Studie an Eberspermien zeigte, dass hohe PI-Konzentrationen toxisch auf Spermien wirken und den Anteil an PI-positiven Zellen erhöhen, wurde dieser Versuch an Bienenspermien wiederholt. Bienenspermien wurden mit 0,75µg/ml, 75µg/ml oder 150µg/ml PI angefärbt und nach 15, 30 und 45 min Inkubation untersucht.

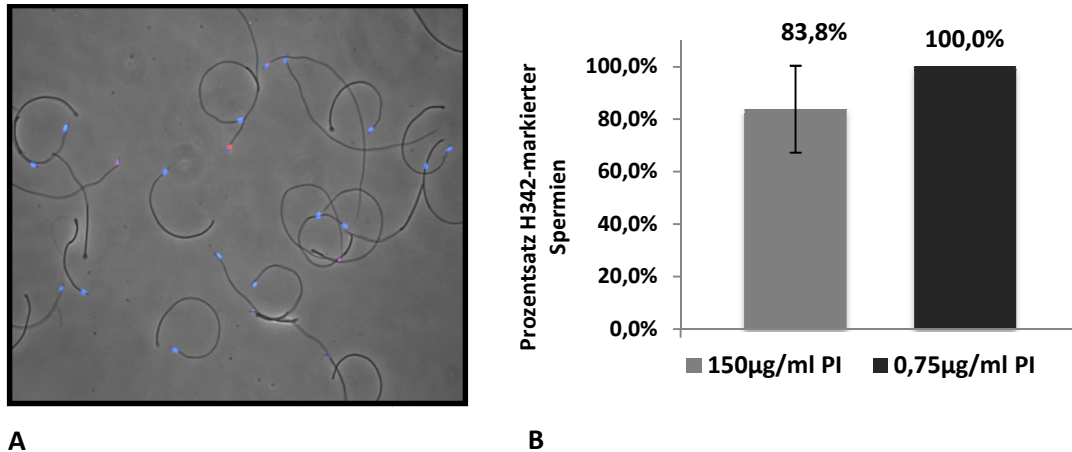
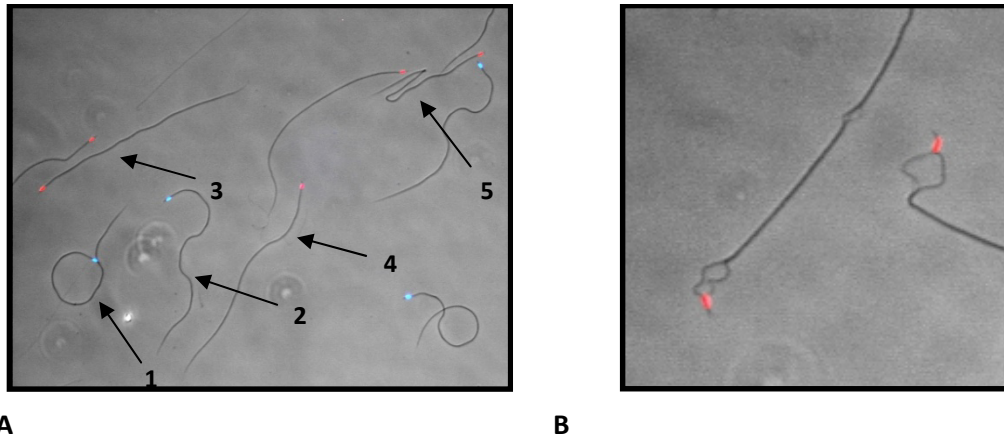


Abb. 29A: Durch H342 und PI markierte Bienenspermien. Bienenspermien wurden für diesen Versuch mit 5µM H342 und 150µg/ml PI versetzt. Der Fluoreszenzfarbstoff H342 wurde 30min lang mit der Probe inkubiert, während die Inkubationszeit für PI nur 15 min betrug. Abb. 29A resultiert aus der Überlagerung des Phasenkontrastbildes und der zwei Fluoreszenzaufnahmen, wobei die roten Fluoreszenzsignale von der PI-Markierung und die blauen Signale von der H342-Markierung stammen. Die Belichtungszeiten wurden für jeden Versuch neu eingestellt, dann aber während eines Versuches konstant gehalten. Es wurden Belichtungszeiten gewählt, die ein möglichst gutes Signal-Rausch-Verhältnis bewirkten. Für H342-Fluoreszenzaufnahmen wurden Belichtungszeiten von 120-200ms und für die PI-Fluoreszenzbilder 800-2000ms gewählt.

Abb. 29B: Einfluss der PI-Konzentration auf die H342-Markierung. In der Graphik sind die Prozentanteile H342-markierter Bienenspermien von zwei Spermaproben mit unterschiedlich hoher PI-Konzentration dargestellt.

Die PI-Signale bei einer Farbstoffkonzentration von 0,75µg/ml waren recht schwach, dagegen waren sie in der Probe mit 150µg/ml sehr deutlich zu erkennen. Der Anteil PI-positiver Zellen war in den untersuchten Proben sehr unterschiedlich, ließ aber keinen konzentrationsbedingten Effekt von PI erkennen. Auch konnte keine Korrelation zwischen den Anteilen PI-positiver Zellen und den Inkubationszeiten festgestellt werden. Allerdings fällt auf, dass in Anwesenheit hoher PI-Konzentrationen nicht alle PI-positive Spermien durch H342 markiert wurden (Abb. 29B). Hier scheint die H342 Fluoreszenz durch PI gequenchst zu sein.



A

B

Abb. 30: Durch H342 und PI markierte Bienenspermien. Mit 5 μ M H342 und 150 μ g/ml PI versetzte Bienenspermien. H342 wurde 30min lang mit der Probe inkubiert, die Inkubationszeit für PI betrug dagegen 15 min. Abb. 30A resultiert aus der Überlagerung des Phasenkontrastbildes und der zwei Fluoreszenzaufnahmen. Die Belichtungszeit für H342 betrug 120ms, die für PI 800ms und die für das Phasenkontrastbild lag bei 40ms. Die nummerierten Pfeile deuten auf Beispiele typischer Formen, in denen die Bienenspermien vorliegen. So deuten die Pfeile 1 und 2 auf reine H342-markierte Spermien, die gebogen oder geschlängelt vorlagen. Die Pfeile 3-5 markieren PI-positive Spermien, die eine gestreckte, geknickte oder leicht geschlängelte Form aufwiesen. In Abb. 30B sind in Vergrößerung zwei ebenfalls PI-positive Bienenspermien mit gespaltenen Flagellen erkennbar.

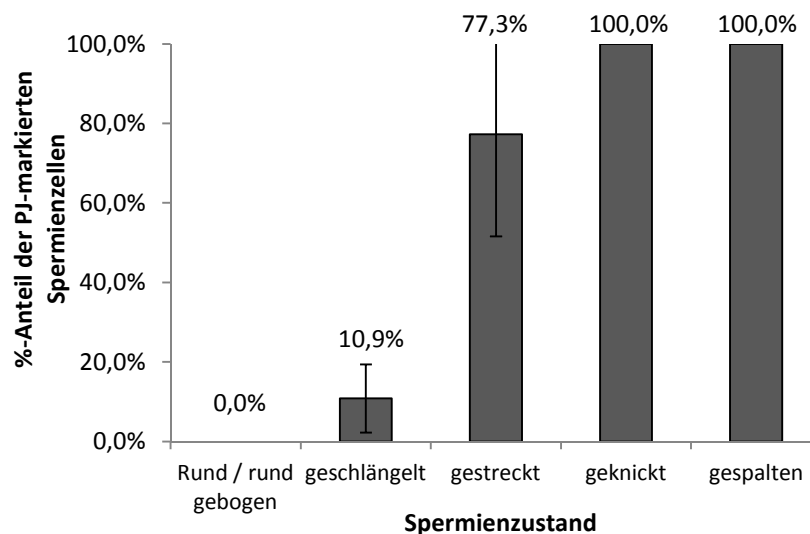


Abb. 31: PI Markierung von Bienenspermien mit verschiedenen Zellformen. Es wurden 5 verschiedene Spermienzustände betrachtet (siehe Abb. 30A und B) und der jeweilige Anteil PI-positiver Zellen ermittelt. Dafür wurden 8 verschiedene Bienenspermaproben untersucht und insgesamt 826 Spermien ausgezählt. Die Spermien wurden mit 150 μ g/ml PI und 5 μ M H342 angefärbt. Die Inkubation dauerte für PI betrug 15 min, die für H342 30min. Sie fand im Dunkeln bei 35°C statt.

Bienenspermien können verschiedene Formen annehmen, sie sehen gebogen, geschlängelt, gestreckt oder geknickt aus. Abb. 30A und B zeigen diese unterschiedlichen Zustände, in denen die Bienenspermien vorliegen können. Bei den Untersuchungen fiel schnell auf, dass

Spermien bestimmter Formen häufiger PI-markiert oder immotil zu sein scheinen als Zellen anderer Formen. Um dieser Beobachtung auf den Grund zu gehen, wurden die Spermien von mehreren Bienenspermaproben mit PI versetzt und anschließend ausgewertet. Es wurden die Spermien der verschiedenen Formen gezählt und der jeweilige Anteil PI-positiver Zellen ermittelt (siehe Abb. 31). Während durchweg alle geknickten und gespaltenen und ca. 77% aller gestreckten Spermien auch PI-positiv waren, wurde kein einziges rund gebogenes Spermium durch PI markiert. Auch die meisten geschlängelt vorliegenden Zellen wurden durch PI nicht angefärbt, nur ca. 11% zeigten eine rote Fluoreszenz. Während der Untersuchungen wurde beobachtet, dass meist nur die geschlängelten oder gebogenen Spermien motil waren, gestreckte, geknickte oder gespaltene zeigten nie eine Bewegung. Bei manchen Bienenspermien konnte man eine Längsspaltung des Flagellums erkennen, wie sie in Abb. 30B zu sehen ist, sie begann meistens direkt hinter dem Kopf.

Die PI-/H342-Doppelmarkierung konnte durch wenige Änderungen des Versuchsprotokoll mit dem HOS-Test kombiniert werden. Die letzte 1:10 Verdünnung der Spermaprobe wurde dazu einfach statt mit Puffer mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$ vorgenommen. Abb. 32A und B sind übereinandergelegte Phasenkontrast- und Fluoreszenzaufnahmen einer solchen Probe, die mit einem 63-fachen Objektiv betrachtet wurde.

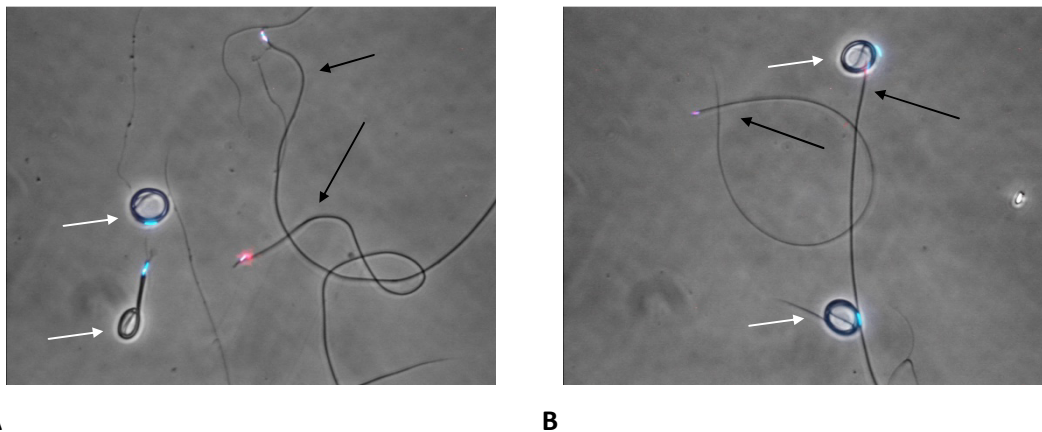


Abb. 32: Durch H342 und PI markierte Bienenspermien in hypoosmotischem Medium. Mit $5\mu\text{M}$ H342 und $150\mu\text{g/ml}$ PI versetzte Bienenspermien, die 1:10 mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$ verdünnt wurden. H342 wurde 30min lang mit der Probe inkubiert, die Inkubationszeit für PI betrug dagegen 15 min. A und B resultierten aus der Übereinanderlegung des Phasenkontrastbildes und der zwei Fluoreszenzaufnahmen. Die Belichtungszeit für H342 betrug 120ms, die für PI 800ms und die für das Phasenkontrastbild lag bei 40ms. Die weißen Pfeile deuten auf Spermien, die auf den osmotischen Stress reagierten. Die schwarzen Pfeile deuten auf nicht reagierende Spermien. Die Aufnahmen wurden mit einem 63-fachen Objektiv erstellt.

Die in den Abbildungen gezeigten Spermien geben das Ergebnis exemplarisch wider. Spermien, die auf das hypoosmotische Medium mit Einrollen reagierten (osmotisch sensitive Spermien, weiße Pfeile in Abb. 32 waren nur H342 aber nicht PI markiert. Osmotisch insensitive Spermien (keine Formveränderung, schwarze Pfeile Abb. 32A und B) waren überwiegend PI-positiv.

In Abb. 33A sind die Ergebnisse einer PI/H342-Markierung von unterschiedlich behandelten Bienenspermaproben dargestellt. Alle Spermaproben stammten von Drohnen der gleichen Völker und wurden am selben Tag entnommen.

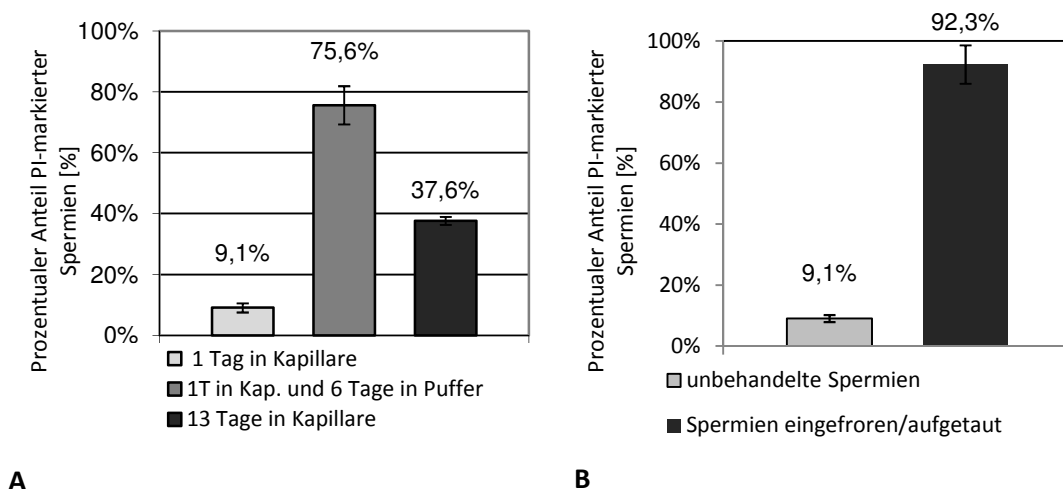


Abb. 33: Prozentuale Anteile PI-markierter Bienenspermien in unterschiedlich alten (A) bzw. eingefrorenen (B) Spermaproben. Die PI-Konz. in allen Proben betrug 150µg/ml, die Konz. von H342 lag immer bei 5µM. Es wurden je Probe min. 200 Spermien ausgezählt. **A:** Vergleich je dreier Bienenspermiensproben unterschiedlichen Alters und Lagerung. Drei Proben (Bienenspermapool aus mehreren Bienenejakulaten) wurden vor dem Versuch nur 1 Tag lang unverdünnt in einer Kapillare bei 17°C gelagert, dieselben Proben wurden nochmals nach weiteren 6 Tagen Lagerung bei 17°C in einer 1:100 Verdünnung untersucht. Drei weitere Spermaaliquots von Drohnen der gleichen Völker wurden nach 13 Tagen bei 17°C und unverdünnt in einer Kapillare gelagert und erst dann mit PI und H342 doppelmarkiert. n=3; **B:** PI-H342-Markierung von eingefrorenen und aufgetauten Bienenspermien. Die eingefrorenen Bienenspermien wurden ohne jeglichen Zusatz in einem Eppendorfgefäß in flüssigen Stickstoff überführt und kurz danach in ein 35°C warmes Wasserbad aufgetaut. n=3

Drei Proben wurden nur einen Tag unverdünnt in einer Kapillare bei 17°C gelagert. Diese Proben enthielten durchschnittlich 9,1% PI-positive Spermien. Dieselben Proben wurde weitere 6 Tage verdünnt (1:100 mit BSS) bei 17°C gelagert. Die Doppelmarkierungen ergaben einen durchschnittlichen Prozentsatz von 75,6% PI-positiver Spermien. Dieser Unterschied kann auf die längere Lagerungsdauer in Verdünnung zurückgeführt werden. Drei weitere Bienenspermaaliquots wurden 13 Tage unverdünnt in einer Kapillare bei 17°C gelagert. Diese Proben wiesen einen Anteil PI-markierter Zellen von durchschnittlich 37,6%

auf, was deutlich unter dem Prozentsatz PI-positiver Zellen der insgesamt 7 Tage alten Proben liegt. Die Differenz muss im unterschiedlichen Grad der Verdünnung begründet sein. Einfrieren und Auftauen von frischem und unbehandeltem Bienensperma bewirkte, dass über 90% der Spermien durch PI markiert wurden, also deren Membranen beschädigt waren (vgl. Abb. 33B). Auch für diesen Versuch wurden je drei Aliquots der Bienenspermienprobe im unbehandelten Zustand und nach Einfrieren untersucht.

Im Rahmen der Auswahl eines geeigneten Schnelltests wurden auch erste Versuche zur Kryokonservierung durchgeführt. An drei Spermienpools wurden 8 verschiedene Konzentrationen des Kryoprotektivums DMSO auf die Vermeidung von Membranschäden durch das Einfrieren getestet (Methode siehe 2.3). Die Proben wurden dann mehreren *in vitro* Tests (vgl. Abb.34 in diesem Abschnitt; Abb. 36 in 3.1.4., Abb. 38 in 3.1.5 und 3.1.7) unterzogen, unter anderem auch der PI/H342-Doppelmarkierung. Parallel durchgeführte Besamungsversuche sollten zeigen, ob die *in vitro* Tests Aussagen über die Befruchtungsfähigkeit der Bienenspermien zulassen.

In Abb. 34 sind die Prozentanteile PI-positiver Spermien in den unbehandelten Kontrollen (ohne DMSO und Einfrieren) und in Proben, die mit unterschiedlichen DMSO-Konzentrationen eingefroren wurden, angegeben. Die unbehandelten Spermienproben enthielten den geringsten Anteil PI-markierter Zellen und stellen die Situation vor DMSO-Zugabe und Einfrieren dar. Alle anderen Proben wurden nach Einfrieren und anschließendem Auftauen untersucht. Ohne bzw. mit nur geringem DMSO-Zusatz (bis 3%) liegt der Anteil PI-positiver Spermien bei fast 100%, Eine weitere Erhöhung der DMSO-Konz. führte tendenziell zu einer Erniedrigung des Anteils an PI-Markierungen. Bei DMSO-Konz. zwischen 4,5 % und 9% differieren die Werte der drei Spermienpools zum Teil deutlich. So sind in Pool 3 mit 7,5% DMSO über 90% der Spermien PI-positiv, während in der gleichen Probe von Pool Nr. 1 nur knapp über 60% der Spermien PI-Markierungen aufweisen. Mit einem DMSO-Anteil von 10,5% liegen dagegen die Werte aller 3 Pools bei knapp über 50%.

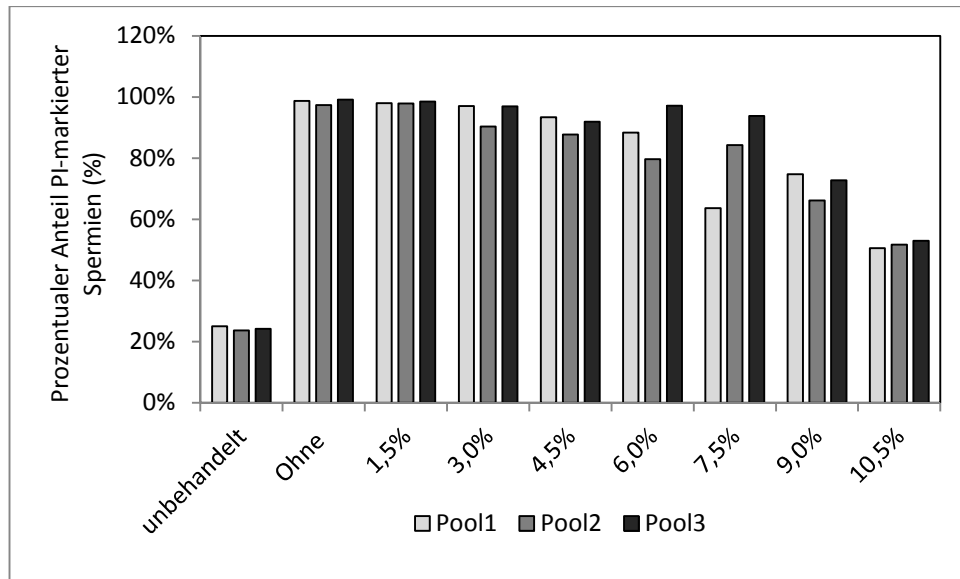


Abb. 34: Prozentuale Anteile PI-markierter Bienenspermien in eingefrorenen und wieder aufgetauten Spermaproben mit unterschiedlichen DMSO-Konzentrationen. Es wurden eingefrorene und wieder aufgetaute Bienenspermaproben mit 8 unterschiedlichen DMSO-Konz. (0%; 1,5%; 3%; 4,5%; 6%; 7,5%; 9%; 10,5% jeweils v/v) aus je 3 Spermapools mittels Doppelmarkierung untersucht. Zusätzlich wurde auch zu jedem Pool ein frisches unbehandeltes Aliquot betrachtet.

3.1.4. Vergleichende Aktivitätsmessung der Glukose-Phosphat-Isomerase (GPI)

Die dargestellten mikroskopischen *in vitro* Tests zur Beurteilung der Membranintegrität erfordern Bildauswerteverfahren, die zumindest zur Zeit noch sehr zeitaufwändig sind. Ein wesentlich schnellere Auswertung sollte durch Messung der Freisetzung eines cytoplasmatischen Enzyms möglich sein. Die Aktivitätsmessung der Glukose-Phosphat-Isomerase (GPI), die aus Bienenspermien leicht extrahierbar ist, könnte hierzu genutzt werden. In einem Aliquot einer Probe wird zunächst die maximal extrahierbare Aktivität der GPI gemessen. Hierzu werden die Plasmamembranen der Bienenspermien durch Ultraschall zerstört. Die Messung erfolgt ohne weitere Fraktionierung des Spermienhomogenates. Aus einem weiteren Aliquot derselben Probe ohne Ultraschallbehandlung wird ebenfalls die GPI-Aktivität gemessen. Der Koeffizienten aus beiden GPI-Aktivitäten sollte ein Maß für den Anteil membrangeschädigter Spermien sein. In einem ersten Versuch konnte in einer unbehandelten Probe etwa $1 \text{ U}/10^6$ Spermien bestimmt werden und nach Ultraschallbehandlung $3,7 \text{ U}/10^6$ Spermien (siehe Abb. 35).

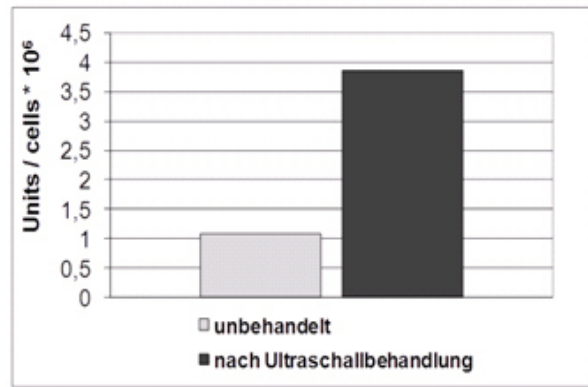


Abb. 35: Glucose-Phosphat-Isomerase-Aktivitäten (GPI) einer Bienenspermienprobe vor und nach Ultraschallbehandlung. Die GPI-Aktivität einer 1:1000 mit BSS verdünnten Bienenspermprobe wurde vor und nach Sonifikation (5x5sec.; ges. 2000KJ) fluorimetrisch mit λ_{exc} 340nm und λ_{em} 538nm ermittelt. Weitere Details zur Durchführung sind unter 2.3.4. angegeben. Die Enzymaktivität wird in Units/10⁶x Zellen angegeben.

Auch die in unterschiedlichen DMSO-Konzentrationen eingefrorenen Bienenspermproben (vgl. Abb. 34) wurden mittels GPI-Aktivitätsmessung untersucht, die Ergebnisse dieser Messungen sind in Abb. 36 dargestellt.

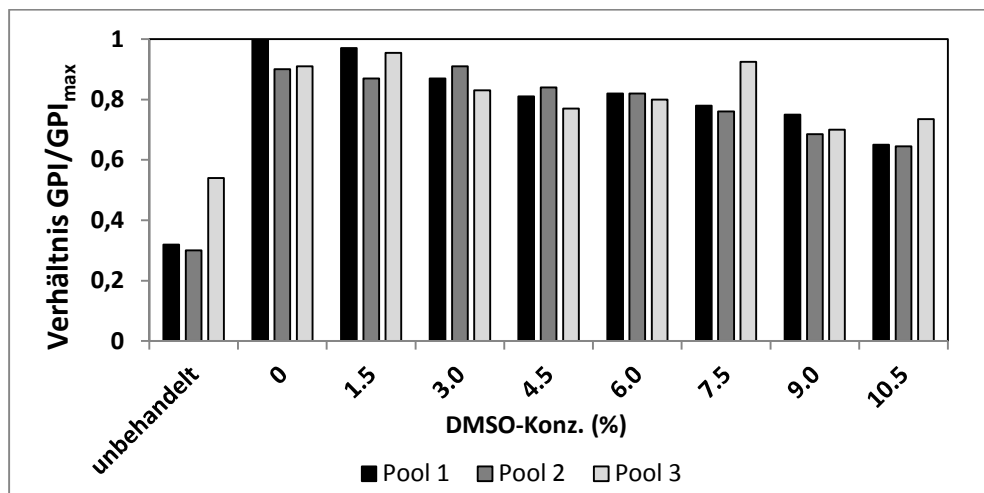


Abb. 36: Relative Glucose-Phosphat-Isomerase-Aktivitäten (GPI) von eingefrorenen und wieder aufgetauten Bienenspermienproben mit unterschiedlichen DMSO-Konzentrationen. Es wurden eingefrorene und wieder aufgetaute Bienenspermproben mit 8 unterschiedlichen DMSO-Konz. (0%; 1,5%; 3%; 4,5%; 6%; 7,5%; 9%; 10,5% jeweils v/v) aus je 3 Spermepools mittels des GPI-Tests untersucht. Zusätzlich wurde auch zu jedem Pool ein frisches unbehandeltes Aliquot analysiert. Angaben zum GPI-Test sind unter 2.3.4. zu finden, während Details zur Probenbehandlung unter 2.3. beschrieben werden.

Die frischen und unbehandelten Aliquots der 3 Spermienpools wiesen GPI-Koeffizienten von ca. 0,3 für Pool 1 und 2, bzw. über 0,5 für Pool Nr. 3 auf. Damit ist das Verhältnis von gemessener GPI zur maximalen GPI für diese Proben deutlich geringer, als für die eingefrorenen und wieder aufgetauten Bienenspermasuspensionen. Tendenziell ist eine Reduzierung des GPI-Koeffizienten mit steigender DMSO-Konzentration bis 10,5% zu erkennen.

3.1.5. Vergleichende Aktivitätsmessung der Isocitrat-Dehydrogenase (ICDH-Test)

Ein weiterer fluorimetrischer Enzymtest, der das gleiche Messprinzip wie der GPI-Test nutzt, ist der ICDH-Test. Im Gegensatz zur cytoplasmatischen GPI kommt die NADP⁺-abhängigen Isocitrat-Dehydrogenase (EC 1.1.1.42) sowohl im Cytoplasma als auch in den Mitochondrien vor. Somit würde ein ICDH Test auch die Zerstörung der mitochondrialen Membranen einschliessen. Die Durchführung des ICDH-Testes ist unter 2.3.5. beschrieben. Abb. 37 zeigt beispielhaft das Ergebnis einer ICDH-Messung. Die ermittelte Aktivität der Isocitrat-Dehydrogenase vor Sonifikation war mit ca. 0,03 Units/10⁶x Zellen sehr niedrig und betrug nach Sonifikation mit ca. 0,38 Units/10⁶x Zellen mehr als das 10-fache. Da es sich, genauso wie der GPI-Test um ein relatives Messverfahren handelt, sind nicht die Absolutwerte entscheidend, sondern der Koeffizient aus gemessener ICDH-Aktivität vor und nach Sonifikation, letztere wird auch als maximale ICDH-Aktivität bezeichnet.

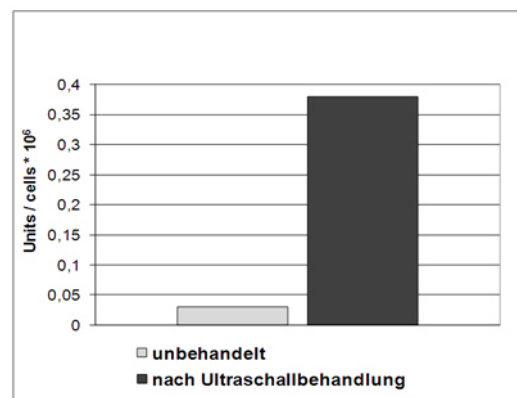


Abb. 37: Isocitrat-Dehydrogenase-Aktivitäten (ICDH) einer Bienenspermienprobe vor und nach Ultraschallbehandlung. Die ICDH-Aktivität einer 1:1000 mit BSS verdünnten Bienenspermaprobe wurde vor und nach Sonifikation (5x5sec.; ges. 2000KJ) fluorimetrisch mit λ_{exc} 340nm und λ_{em} 538nm ermittelt. Weitere Details zur Durchführung sind unter 2.3.5. angegeben. Die Enzymaktivität wird in Units/10⁶x Zellen angegeben.

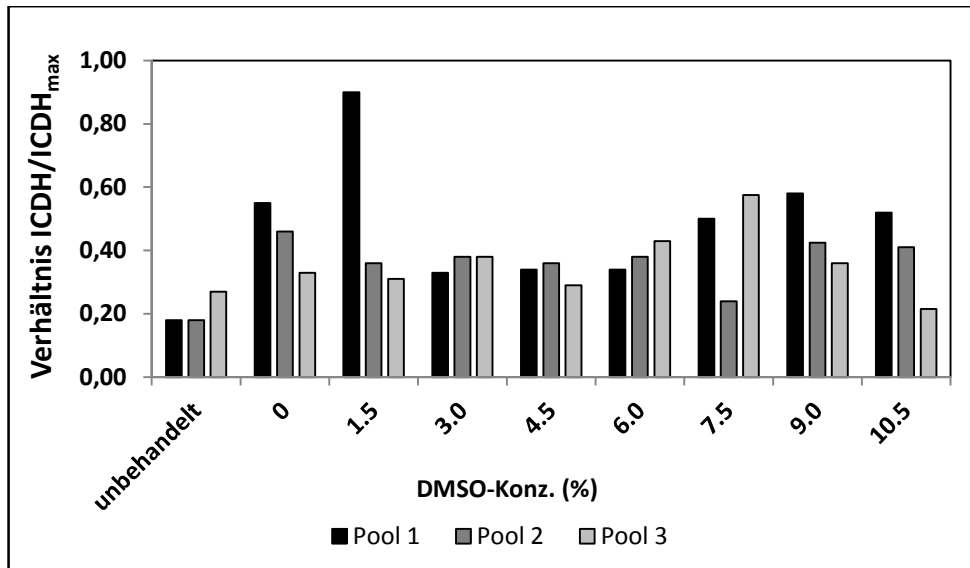


Abb.38: Relative Isocitrat-Dehydrogenase-Aktivitäten (ICDH) von eingefrorenen und wieder aufgetauten Bienenspermienproben mit unterschiedlichen DMSO-Konzentrationen. Es wurden eingefrorene und wieder aufgetaute Bienenspermaproben mit 8 unterschiedlichen DMSO-Konz. (0%; 1,5%; 3%; 4,5%; 6%; 7,5%; 9%; 10,5% jeweils v/v) aus je 3 Spermapools mittels des ICDH-Tests untersucht. Zusätzlich wurde auch zu jedem Pool ein frisches unbehandeltes Aliquot analysiert. Angaben zum ICDH-Test sind unter 2.3.5. zu finden, während die Probenbehandlung unter 2.3. beschrieben wird.

An den Bienenspermaproben, die mit unterschiedlichen DMSO Konzentrationen eingefroren wurden, zeigte sich ein deutlich anderes Bild der ICDH-Freisetzung (Abb. 38) als für die GPI. Mit steigender DMSO-Konzentration ist keine klare Tendenz in der ICDH-Freisetzung erkennbar. Warum der ICDH-Koeffizient von Pool 1 mit 1,5% DMSO deutlich höher liegt (ca. 0,9) als der in den anderen Proben 0,2-0,6 ist nicht bekannt.

3.1.6. Motilitätsanalyse

Die Motilität ist ein wichtiges physiologisches Qualitätsmerkmal, welches für die Beurteilung von Spermaproben unterschiedlicher Tierspezies häufig herangezogen wird. Es existieren grundsätzlich zwei unterschiedliche Methoden sowohl die Qualität als auch die Quantität der Motilität in Bienenspermiensuspensionen zu ermitteln. Die Ergebnisse dieser verschiedenen Verfahren werden im Folgenden vorgestellt.

3.1.6.1 Manuelle Auszählung z.T. mit Hilfe von Langzeitbelichtungs-aufnahmen

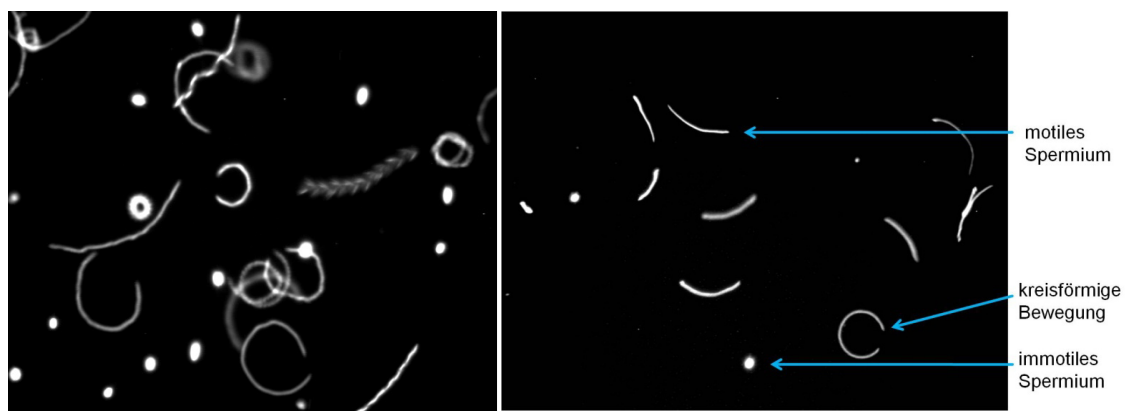


Abb. 39: Fluoreszenzaufnahmen, aufgenommen mit langer Integrationszeit, von H342-markierten Eberspermien (A) und Bienenspermien (B). Beider Spermienarten wurden vor mikroskopischer Untersuchung mit 5 μ M H342 versetzt und 30 min bei 37°C inkubiert. Die Aufnahme wurde mit einem 20-fach Objektiv und dem Leica Filtercube A erstellt. Die Integrationszeit betrug 4000ms für A und 6000ms für B.

Da die bekannten CASA-Systeme nicht auf Bienenspermien anwendbar sind, weil diese keine morphologisch abgrenzbaren Köpfe im Phasenkontrastbild zeigen, mussten die motilen Spermien zunächst manuell ausgezählt werden. Diese Methode ist allerdings recht zeitaufwändig und vor allem setzt sie einen objektiven Betrachter voraus. Eine weitere Möglichkeit der Bewegungsanalyse stellen Fluoreszenzaufnahmen von H342-markierten Bienenspermien mit langer Integrationszeit dar. Auf diesen Bildern, wie es Abb. 39A es für Eberspermien und Abb. 39B es für Bienenspermien zeigen, erscheinen immotile Spermien als Lichtpunkte, während motile Spermien Lichtbahnen erzeugen. Durch die Form und Länge der Lichtbahnen lassen sich sogar unterschiedliche Bewegungsformen und Geschwindigkeiten differenzieren. Diese Art der Bewegungsanalyse funktionierte auch mit den Spermien anderer Spezies, so z.B. mit Hausschweinspermien und humanen Spermienzellen (nicht gezeigt). Es war auch möglich die Beweglichkeit in

Bienenspermienproben zu beurteilen, allerdings fiel sowohl bei der rein manuellen Auszählung als auch bei der fluoreszenzgestützten Quantifizierung auf, dass viele Spermien ihre Beweglichkeit während des Versuches stoppten bzw. begannen oder unterbrachen. Das heißt, immotile Spermien wurden plötzlich zu motilen und umgekehrt. Eine weitere Beobachtung ist, dass Bienenspermien auf das UV-Licht während der fluoreszenzmikroskopischen Untersuchung mit erhöhter Motilität reagieren. Diese Anregung hält für wenige Minuten an und endet anschließend in Unbeweglichkeit.

3.1.6.2 CASAnova

Das während des Projektes neu entwickelte Bewegungsanalyse-System CASAnova konnte erst für die Bienenspermienproben des letzten Projektteiles verwendet werden, da bis dahin programmbezogene Fehler ausgebessert werden mussten. Es wurden viele Versuche zunächst mit Eberspermien durchgeführt, erstens um Ressourcen zu sparen und zweitens die saisonalen Engpässe zu überbrücken. Später wurden dann mit dem neuen Programm Motilitätsanalysen von Bienenspermien durchgeführt. In Abb. 40 ist eine CASAnova offline-Auswertung an Bienenspermien zu sehen. Bei dieser Art der Auswertung werden zuvor erstellte Filmaufnahmen für eine Bewegungsanalyse herangezogen. Wie in Abb. 40 gezeigt, erhält der Analytiker eine Reihe wichtiger Ergebnisse, so errechnet das Programm die Spermienkonzentration in der Probe und im unverdünnten Ejakulat. Desweiteren gibt es Auskunft über den Anteil an motilen Spermien und klassifiziert diese dann weiter in progressiv, linear motil, nicht linear motil, kreislaufend und hyperaktiv. CASAnova kann auch Agglutinate in den Proben erkennen und errechnet den prozentualen Anteil dieser. Es gibt zum einen die Gesamtergebnisse einer Probe, die sich aus mehreren Einzelanalysen zusammensetzen kann, an. Zum anderen werden auch, wenn erwünscht, genauere Motilitätsdaten des letzten analysierten Filmes angegeben. Es ist sogar möglich sich die genauen Bewegungsdaten, wie VCL, VAP, VSL, ALH, WOB% usw. (vgl. 2.3.6. Abb. 15), jedes einzelnen Spermiums einer Analyse anzeigen zu lassen.

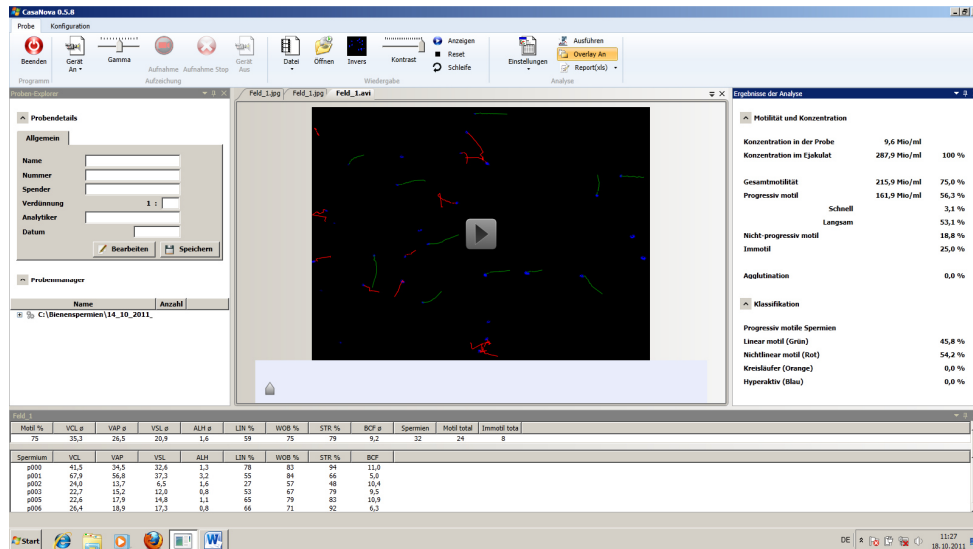


Abb.40: Bewegungsanalyse einer Bienenspermienprobe mittels CASanova. Screenshot einer offline-Bewegungsanalyse des CASanova Programmes. Ausgewertet wird zu diesem Zeitpunkt ein zuvor mit CASanova erstellter AVI-Film von H342-markierten Bienenspermien. Die farbigen Bahnen zeigen den Weg, den die Bienen während des Filmes zurücklegen. Das rechte Ergebnisfenster fasst die Ergebnisse aller bis dahin gemessenen Aufnahmen zusammen. Das linke Fenster kann zur Speicherung aller Probendetails verwendet werden. Die Tabelle unterhalb des Film-Fensters gibt genauere Messdaten des zuletzt untersuchten Filmes und aller darauf gezählter Spermien aus.

3.1.7. Vergleich der *in vitro*-Tests

Um festzustellen, welche der oben beschriebenen *in vitro* Analysen besonders geeignet ist, verlässliche Daten über den Zustand der Bienenspermien zu liefern, wurden die Verfahren miteinander verglichen. In Abb. 41 sind die Ergebnisse der PI/H342-Markierungen, GPI-Messungen und ICDH-Tests aller Vorversuche und der 3 Spermienpools aus dem Hauptversuch zusammengestellt. Die Proben aus den Vorversuchen hatten im Durchschnitt einen Anteil PI-markierter Spermien von ca. 10%, in den Pools aus dem Hauptversuch konnten dagegen über 20% PI-Markierungen ermittelt werden. Der Unterschied dieser Proben zueinander ist signifikant. Die GPI-Werte dieser Proben streuen dagegen deutlich stärker, weshalb sie sich auch nicht signifikant unterscheiden. Auch die Ergebnisse des ICDH-Tests liegen nahe bei einander und differieren deshalb ebenfalls nicht signifikant. Insgesamt liegen aber alle Analysenergebnisse der Hauptversuchspools über denen der Vorversuche.

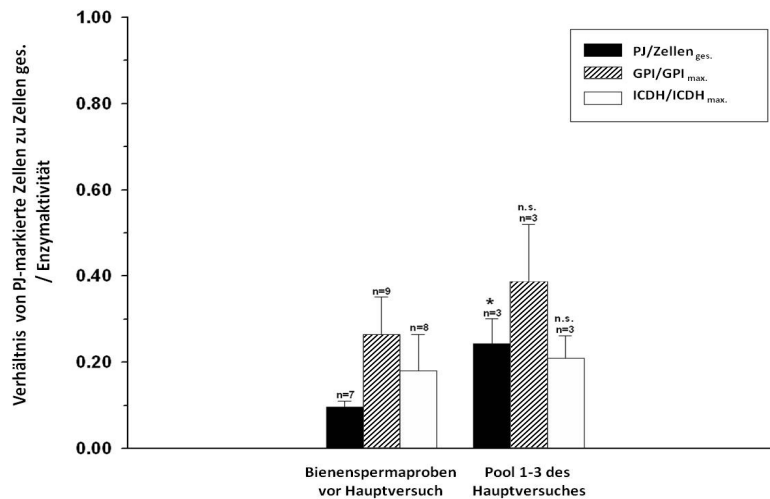


Abb. 41: Vergleich der in vitro Tests. Aufgetragen sind die Ergebnisse der PI/H342-Markierungen, der GPI-Tests und der ICDH-Messungen von zwei Sorten unbehandelter Bienenspermiensproben. Dazu wurden einerseits die Ergebnisse aller Proben der Vorversuche und andererseits der drei Pools des Hauptversuches zusammengefasst. Die Ergebnisse aller drei Analysen werden stets im Verhältnis zu den jeweiligen Maximalwerten (100% PI-positiv, Enzymaktivität in Ultraschall-behandelter Probe) als Dezimalwert angegeben.

Eine ähnliche Zusammenstellung findet man in Abb. 42. Hier sind alle Ergebnisse der PI/H342-Markierungen, GPI-Messungen, ICDH-Tests und Motilitätsbewertungen des Hauptversuches zusammengefasst. Alle Ergebnisse werden, wie schon in den Abbildungen zuvor, als zu den Maximalwerten relative Dezimalwerte angegeben. Je näher der Wert an 1 heranrückt, desto höher ist der Anteil PI-positiver Zellen, umso größer ist das Verhältnis von GPI oder ICDH zu GPI_{max.} oder ICDH_{max.} und umso mehr geschädigte Spermien befinden sich in der Probe. Nur mit der Motilität verhält es sich anders, je näher der Wert an 1 rückt, desto höher ist der Prozentsatz an motilen Spermien.

In den nicht-gefrorenen Proben waren ca. 36% der Spermien motil und ca. 25% wurden durch PI markiert. Es konnte ein GPI/GPI_{max.}-Verhältnis von knapp unter 0,4 gemessen werden und ein ICDH/ICDH_{max.}-Verhältnis von ca. 0,22. Die eingefrorenen und aufgetauten Aliquots der 3 Pools ohne DMSO-Zusatz zeigten über 90% PI markierte Spermien. Das GPI/GPI_{max.}-Verhältnis lag bei über 0,9. Nahezu alle Spermien waren immotil. Alle Werte das außer dem ICDH/ICDH_{max.}-Verhältnis differierten damit deutlich von den Werten der nicht-gefrorenen Pools.

Auch in den Proben mit geringem DMSO-Gehalt zwischen 1,5% und 7,5% konnten nur sehr wenige motile Spermien gezählt werden. Sowohl das GPI/GPI_{max.}-Verhältnis (0,86), der

Anteil PI-markierter Spermien von 90% als auch das ICDH/ICDH_{max.}-Verhältnis (ca. 0,42) lagen nur wenig unter den Werten der DMSO-freien Proben. Eine markante Veränderung war erst bei den Proben mit höherer DMSO-Konzentration zu erkennen. Die relative GPI-Aktivität lag deutlich niedriger bei ca. 0,68, genauso verhielt es sich mit dem Anteil PI-positiver Spermien, dieser verringerte sich um 30%. Auch das ICDH/ICDH_{max.}-Verhältnis verschob sich auf ca. 0,35. Der Anteil motiler Spermien nahm aber nur geringfügig zu (ca. 7,5%).

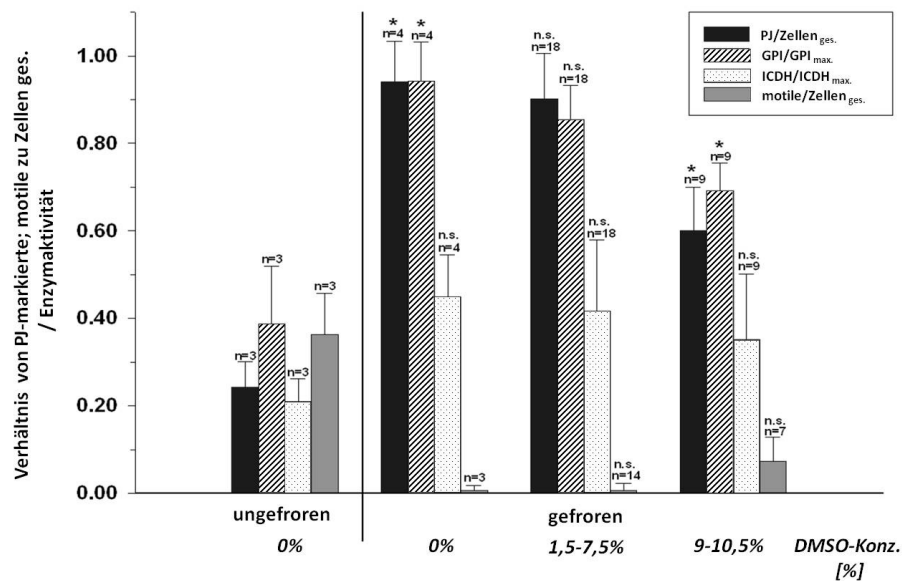


Abb. 42: Ergebnisse verschiedener Vitalitätsanalysen des Hauptversuches. Aufgetragen sind die Ergebnisse der PI/H342-Markierungen, der GPI-Tests, der ICDH-Messungen und Motilitätsbewertungen von den Bienenspermienproben des Hauptversuches. Es wurden die Werte der 3 unbehandelten und ungefrorenen Bienenspermienpools zusammengefasst, diese sind links, rechtsseitig durch einen senkrechten Strich von den anderen Daten abgetrennt, dargestellt. Alle Daten rechtsseitig des Striches stammen von gefrorenen Proben, wobei die Werte aller DMSO-freien Proben zusammengefasst wurden, genauso wie die der Proben mit 1,5%-7,5% DMSO und die der Proben mit 9% und 10,5% DMSO-Gehalt. Die Ergebnisse aller Analysen werden stets im Verhältnis zu den jeweiligen Maximalwerten (100% PI-positiv, Enzymaktivität in Ultraschall-behandelter Probe) als Dezimalwert angegeben. Die Anzahl untersuchter Proben ist oberhalb jeder Standardabweichungsangabe gezeigt.

Um mögliche Abhängigkeitsstrukturen zwischen den Merkmalen bzw. Analyseergebnissen aufzuzeigen, bietet es sich an, die Daten zweier Vitalitätsprüfungen gegeneinander in Form eines Streudiagrammes aufzutragen. Die Lage und Form der entstandenen Punktwolke kann dann Informationen über die Existenz und Art des Zusammenhangs liefern. Da bei den vorliegenden Daten nur mit einem linearen Zusammenhang zu rechnen ist, wurden in den

Ergebnisse

Diagrammen das Bestimmtheitsmaß und die Signifikanz für die Regressionsgerade berechnet und angegeben.

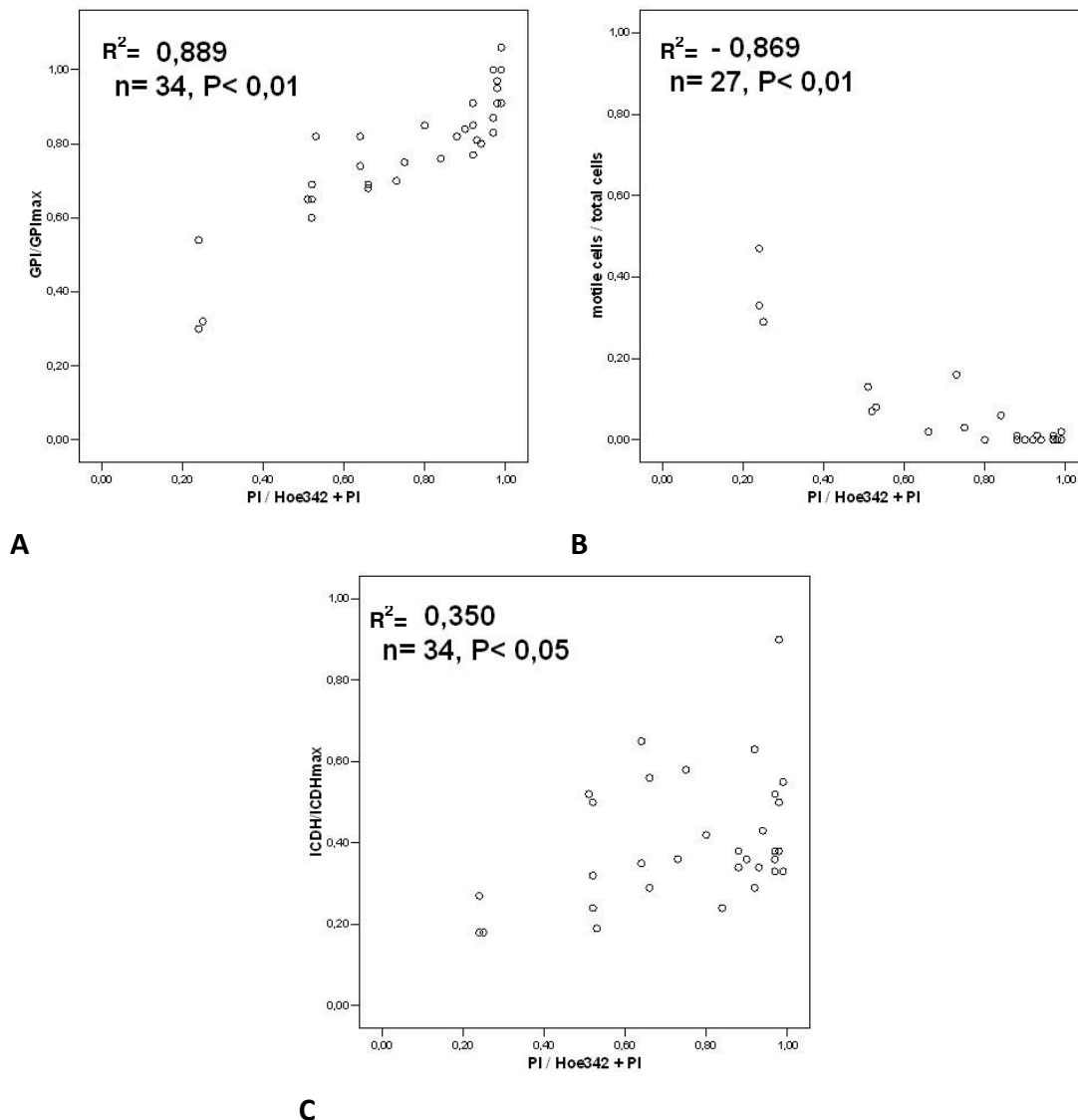
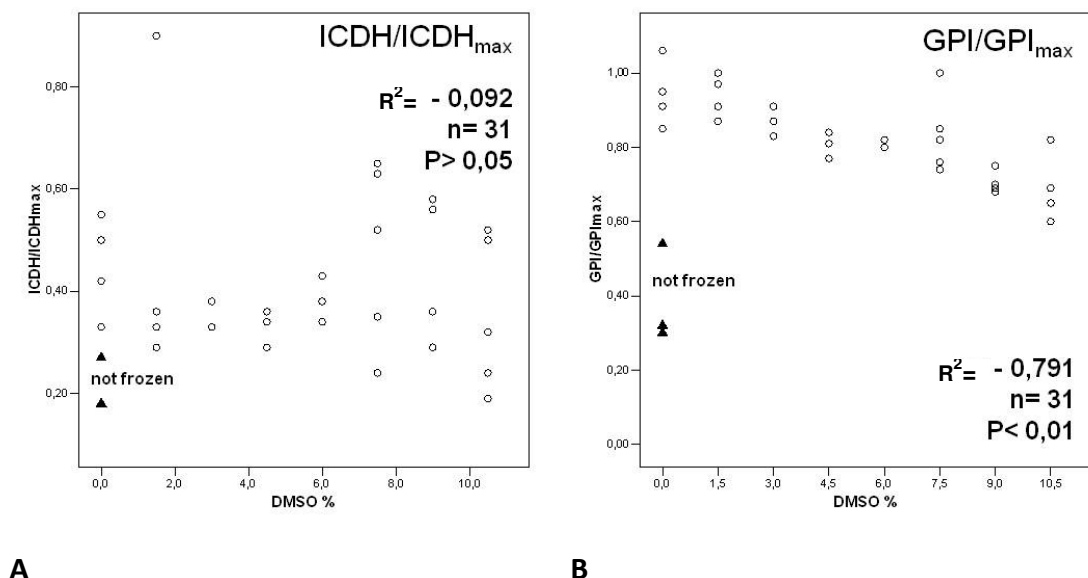


Abb. 43: Ergebnisse der PI/H342-Markierungen, aufgetragen gegen Daten der GPI-Messungen (A), Bewegungsanalysen (B) und ICDH-Messungen (C). Dargestellt sind die Ergebnisse der PI/H342-Doppelmarkierungen aller Proben des Hauptversuchs, aufgetragen gegen die entsprechenden Ergebnisse einer anderen Analyse in Form eines Streudiagrammes. Zusätzlich sind in diesen Diagrammen der Datenumfang (n), das Bestimmtheitsmaß (R^2) und die Signifikanz (p) eines linearen Zusammenhangs angegeben. In A sind die PI/H342-Daten gegen die Daten der GPI-Messung aufgetragen. In B sind die PI/H342-Daten gegen die Ergebnisse der Bewegungsanalyse aufgetragen und in C resultiert die Punktwolke aus den PI/H342- und ICDH-Ergebnissen.

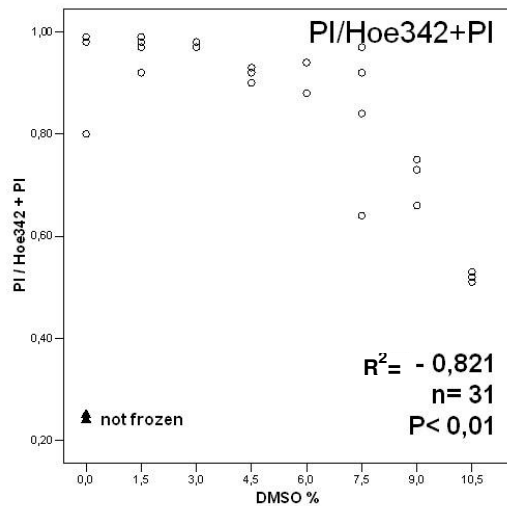
In Abb. 43A-C sind die Ergebnisse der PI/H342-Markierungen gegen die Daten anderer Analysen aufgetragen, in A z.B. gegen die ermittelten GPI/GPI_{max}-Verhältnisse derselben Proben. Sowohl das Aussehen der Punktwolke als auch das Bestimmtheitsmaß nahe 1 deuten auf einen proportionalen Zusammenhang hin. Auch in Diagramm B lässt sich ein

lineares, doch antiproportionales Verhältnis zwischen den Ergebnissen der PI/H342-Markierungen und Bewegungsanalysen erkennen. Anders sieht die Punktwolke, die die Daten der PI/H342-Markierungen und ICDH-Ergebnisse wiedergibt, in Diagramm C aus. Sie besitzt eine sehr verteilte Struktur und lässt keinen linearen Zusammenhang erkennen. Auch das Bestimmtheitsmaß von $R^2 = 0,350$ bestätigt diese Annahme.

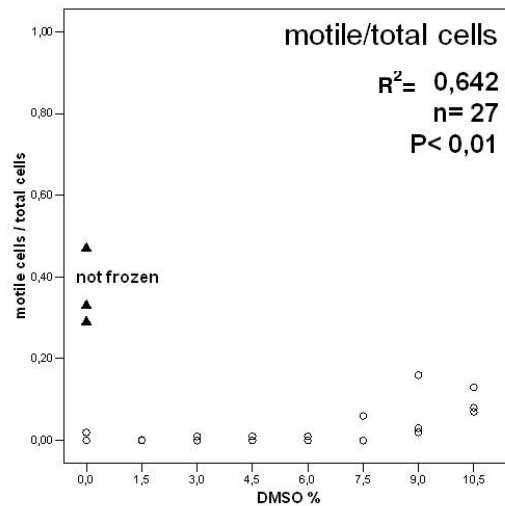
In Abb. 44A-D sind die Ergebnisse der verschiedenen Analysen gegen die DMSO-Konzentration der jeweiligen Probe in Streudiagrammen mit Bestimmtheitsmaß und Signifikanz der Regressionsgeraden aufgetragen. Zwischen dem ICDH/ICDH_{max}-Verhältnis und der DMSO-Konzentration, dargestellt in A, lässt sich kein Zusammenhang erkennen, die Punktwolke ist stark verteilt und nur an wenigen Stellen konzentrierter. Das Bestimmtheitsmaß von $R^2 = -0,092$ und ein p-Wert von $> 0,05$ bekräftigen die Annahme, dass keine signifikante Abhängigkeit der zwei Merkmale besteht. Ein anderes Bild ergibt sich aus Diagramm B. Die Punktwolke, die sich aus der DMSO-Konzentration und den zugehörigen GPI/GPI_{max}-Verhältnissen ergibt, liegt langgezogen nahe einer gedachten Gerade. Das Bestimmtheitsmaß der Regressionsgeraden beträgt $R^2 = -0,791$ und $p < 0,01$, wodurch ein linearer Zusammenhang bestätigt wird. Auch zwischen dem Anteil PI-markierter Spermien und der DMSO-Konzentration besteht ein lineares Verhältnis, das wird sowohl durch die Punktwolke in Diagramm C als auch durch das zugehörige Bestimmtheitsmaß ($R^2 = -0,821$) und den Signifikanzwert ($p < 0,01$) deutlich. In Diagramm D ist die Punktwolke aus DMSO-Konzentration und Anteil motiler Spermien zu sehen, auch zwischen diesen Merkmalen scheint es einen Zusammenhang zu geben, das wird aus der Form der Punktwolke, Bestimmtheitsmaß ($R^2 = 0,642$) und Signifikanzwert ($p < 0,01$) ersichtlich.



Ergebnisse



C



D

Abb. 44: Ergebnisse aller PI/H342-Markierungen (A), GPI-Messungen (B), ICDH-Messungen (C) und Bewegungsanalysen (D) des Hauptversuches, aufgetragen gegen die DMSO-Konzentration der jeweiligen Probe. Zusätzlich sind in diesen Diagrammen der Datenumfang (n), das Bestimmtheitsmaß (R^2) und die Signifikanz (p) eines linearen Zusammenhangs angegeben. In A sind die ICDH-Ergebnisse, in B Daten der GPI-Messungen, in C die Ergebnisse der PI/H342-Doppelmarkierung und in D die Ergebnisse der Bewegungsanalyse aufgetragen.

Tab. 26: Rangkorrelationskoeffizienten (Spearman) und Signifikanzwerte der *in vitro*-Tests mit dem Füllungsgrad der Spermatheka (Wegner et al., 2012).

		Motilität	H342/PI-Färbung	HOS-Test	ICDH-Test	GPI-Test
Anzahl	r	0.671*	0.539*	0.606*	0.143	-0.611*
Spermien in Spermatheka	P	<0.001	0.004	0.001	0.253	0.001
	n	23	23	22	24	24

* signifikant ab $\alpha < 0,017$ (α korrigiert mittels Bonferroni-Korrektur)

Eine Spearman-Rangkorrelationsberechnung zeigt, welche *in vitro* Test signifikant mit dem etablierten *in vivo*-Qualitätsmerkmal (Spermienanzahl in der Spermatheka) korrelieren (siehe Tab. 26). Danach scheint der Motilitätstest die beste Vorhersage über die Spermaeignung für die künstliche Inseminierung zu liefern, gefolgt vom HOS-, GPI- und H342/PI Test. Der ICDH-Test, der auch schon zuvor keinerlei Korrelation weder zur DMSO-Konzentration noch zur H342/PI-Doppelmarkierung aufzeigte, lässt keinen Zusammenhang erkennen.

3.1.8. DNA-Integritätstests

Zur Untersuchung des DNA-Zustandes der Bienenspermien wurden 3 verschiedene Methoden angewendet. Alle 3 DNA-Tests wurden an und für Säugerspermien, insbesondere Humanspermien, entwickelt, deshalb wurden sie zunächst an Eberspermien getestet. Nur bei erfolgreichen und vielversprechenden Vorversuchen wurden die Methoden mit Bienenspermien wiederholt. Während der TUNEL-Test ein gut dokumentiertes und schon lang etabliertes Verfahren ist, wird der SCD-Test als relativ neue aber sehr vielversprechende Methode gesehen (Chohan et al., 2006). Manche Untersuchungen konnten beweisen, dass der TUNEL-Test, der SCD-Assay und der SCSA gut miteinander korrelieren. Der SCSA wird, wie auch der TUNEL-Test häufig angewendet und zählt zu den statistisch robusten Verfahren. Da der SCSA aber ein Flusszytometer benötigt und kein entsprechendes Gerät zur Verfügung stand, wurde stattdessen der AOT verwendet. Dieser funktioniert zwar nach demselben Prinzip wie der SCSA, allerdings benötigt er nur ein Fluoreszenzmikroskop.

3.1.8.1 Acridin Orange Test (AOT)

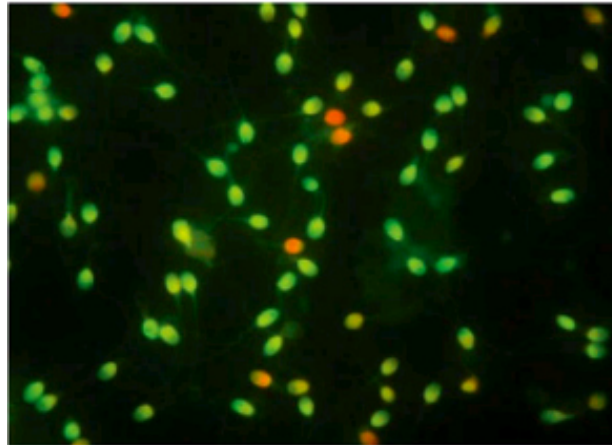


Abb. 45: Mit Acridinorange gefärbte humane Spermien.

Quelle: Andrologie: Krankheiten der männlichen Geschlechtsorgane; von Herbert Sperling et al. 2011.

Da nur Schwarz-Weiß-Aufnahmen erstellt werden konnten, ist es nicht möglich die Ergebnisse dieses Tests in Form einer Abbildung darzustellen. Stattdessen werden in Abb.45 durch Acridinorange gefärbte Humanspermien gezeigt, um den vorgefundenen Sachverhalt besser erklären zu können. Wie in der Abbildung zu sehen, weisen durch Acridinorange gefärbte Spermien verschiedenste Grün-, Gelb-, Orange- und Rotfluoreszenzen auf. Dieser Effekt konnte auch an Eberspermien gezeigt werden. Eine

einheitliche Differenzierung und Quantifizierung der verschiedenen Farbtöne war ohne Flussszytometer mit festgelegten Wellenlängen für die unterschiedlichen Kategorien nicht möglich. Selbst in der Positivkontrolle nach DNase-Einwirkung fluoreszierten nicht alle Spermien einheitlich rot, sondern wiesen unterschiedliche Farbtöne im grünen, gelben und roten Farbbereich auf.

3.1.8.2 Sperm Chromatin Dispersion Assay (SCD)

Nach Durchführung des SCDs mit Eberspermien (siehe Abb. 46A-C) waren keine deutlichen Unterschiede erkennbar. Die Hintergrundfluoreszenz war bei allen Proben sehr stark und die möglicherweise auf DNA-Schäden hinweisenden Lichthöfe („Halos“) waren häufig erst nach der Bildbearbeitung zu erkennen. Außerdem schienen zwar manche Eberspermien größere und manche kleinere „Halos“ zu besitzen, jedoch handelte es sich meistens um fokusbedingte Artefakte.

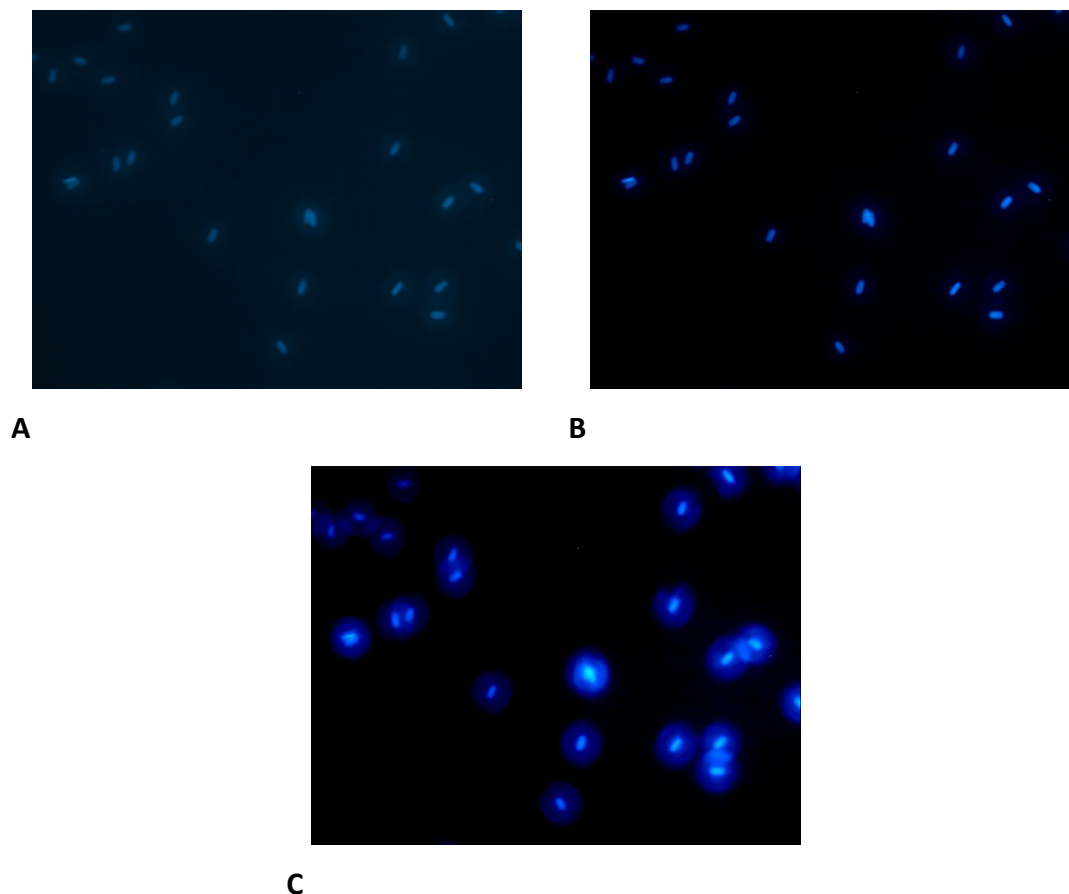


Abb. 46: SCD-Test an Eberspermien, durch H342 angefärbt. Mit H342-markierte Eberspermien nach durchgeführtem SCD-Protokoll. A zeigt einen Bildausschnitt vor Durchführung der Tonwertkorrektur, Spermien liegen weitgehend im Fokus. In B ist der gleiche Bildausschnitt zu sehen, jedoch nach durchgeführter Tonwertkorrektur. Derselbe Bildbereich nach Tonwertkorrektur wird auch in C dargestellt, jedoch wurde hier nicht auf die Spermien scharfgestellt, d.h. die Zellen lagen nicht im Fokus. Die Interaktionszeit betrug 120-200ms

Im Fokus liegende Spermien besaßen scheinbar kleinere „Halos“, während nicht fokussierte Spermien vermeintlich größere „Halos“ aufwiesen. Um diesen Umstand zu verdeutlichen wurde eine Aufnahme vor Scharfstellung erstellt (siehe Abb. 46C). Die „Halos“ erscheinen in dieser Abbildung viel größer und stärker ausgeprägt, dabei handelt es sich um den gleichen Bildausschnitt wie bei Abb. 46A und B. Diese zeigen fokussierte Aufnahmen des gleichen Bildausschnitts vor (A) und nach (B) der Tonwertkorrektur, durch die die Hintergrundfluoreszenz verringert und die Spermisignale verstärkt werden können. Da keine klare Differenzierung der „Halo“-Größen möglich war, wurde nach den Vorversuchen mit Eberspermien nur eine Bienenspermienprobe mittels SCD untersucht.

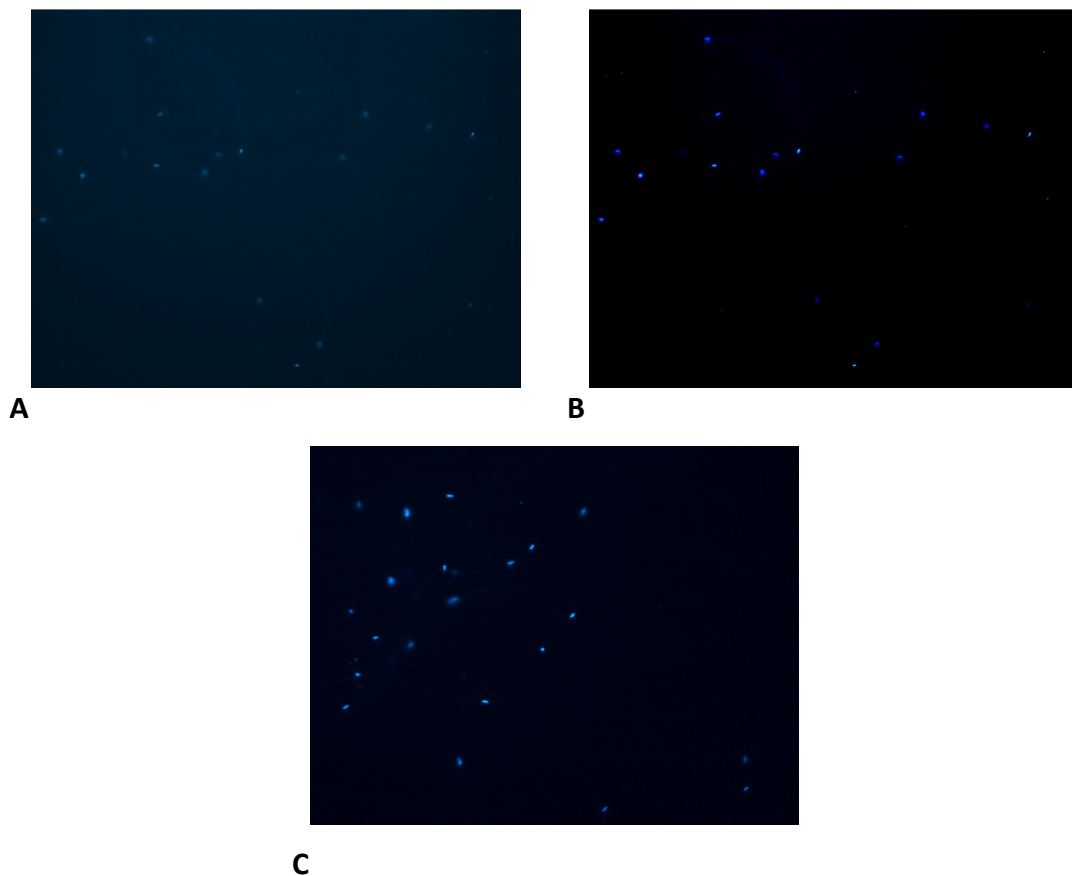


Abb.47: SCD-Test an Bienenspermien, durch H342 angefärbt. Mit H342-markierte Bienenspermien nach durchgeführtem SCD-Protokoll. A zeigt einen Bildausschnitt vor Durchführung der Tonwertkorrektur, Spermien liegen zum Teil im Fokus. In B ist der gleiche Bildausschnitt zu sehen, jedoch nach durchgeführter Tonwertkorrektur. In C wird ein Bildausschnitt dargestellt, für den nicht auf die Spermien scharfgestellt wurde, d.h. die Zellen lagen nicht im Fokus. Die Integrationszeit betrug 120-200ms.

Das Ergebnis war jedoch das gleiche. Die Hintergrundfluoreszenz war wieder sehr stark (siehe Abb. 47A), und auch fokusbedingte Artefakte traten wieder auf (siehe Abb. 47B). Ohne eine Fokussierung auf die Spermienköpfe erschienen diese viel größere „Halos“ zu besitzen. Dieser Umstand, der auch schon bei den Eberspermienproben gefunden wurde, bestätigte sich somit auch bei Bienenspermien. Eine Auswertung wurde durch die kleinen

Kerne der Bienenspermien zusätzlich erschwert, so dass eine klare Unterscheidung der „Halo“-Größen unmöglich war. Selbst in der zuvor mit DNase behandelten Positivkontrolle waren unterschiedliche „Halo“-Größen erkennbar (nicht gezeigt).

3.1.8.3 *Terminal deoxynucleotidyl transferase – mediated deoxyUridine-triphosphate – Nick End Labeling (TUNEL)*

Der TUNEL-Test wurde wie alle anderen DNA-Integritätstests zunächst an Eberspermien ausprobiert und erst im Falle vielversprechender Ergebnisse an Bienenspermien angewendet. Da es sich bei dem TUNEL-Test um eine für Säugerspermien gut etablierte Methode handelt und ein häufig verwendetes Kit der Firma Roche für die Untersuchungen benutzt wurde, gelang die Detektierung von Eberspermien mit fragmentierter DNA problemlos. Deshalb wurde die Methode recht schnell auf Bienenspermien angewendet.

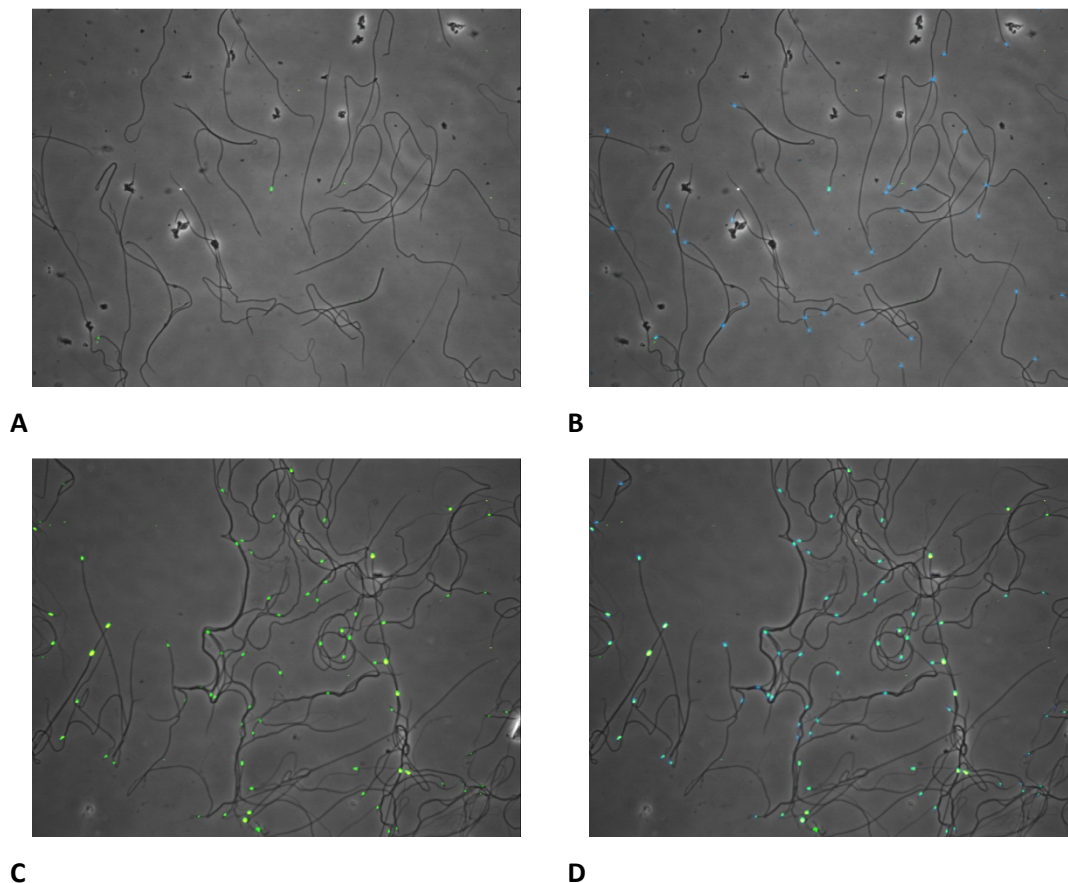


Abb. 48: TUNEL-Test an Bienenspermien, zusätzlich mit H342 markiert. Mit 5µM H342 markierte Bienenspermien nach durchgeführtem TUNEL-Protokoll, betrachtet an einem Fluoreszenzmikroskop mit einem 20-fach Objektiv. Es wurde ein TUNEL-Fluorescein-Kit der Firma Roche verwendet. A und C zeigen übereinandergelegte Phasenkontrast und Fluorescein-Aufnahmen. In B und D ist zusätzlich die H342-Fluoreszenz eingeblendet. A und B sowie C und D zeigen jeweils denselben Bildausschnitt. Während in A und B unbehandelte Bienenspermien zu sehen sind, handelt es sich bei der Bienenspermienprobe in C und D um eine Positivkontrolle, also Bienenspermien, deren DNA vor

TUNEL- und H342-Markierung mittels DNase fragmentiert wurden. Die Integrationszeiten waren für die Phasenkontrastbilder 40ms, für die H342-Fluoreszenzaufnahmen 120-200ms und für die TUNEL-Fluoresceinbilder 800-2000ms.

In unbehandelten Bienenspermienproben wurden nur wenige Spermien durch das TUNEL-Kit mit Fluorescein markiert (Abb. 48A und B). In dem gezeigten Bildausschnitt sind ca. 32 Spermien zu sehen, deren DNA alle durch H342 markiert wurden (Abb. 48B). Aber nur der Kopf eines Spermiums weist parallel auch eine Fluoresceinmarkierung und damit fragmentierte DNA auf (Abb. 48A). Fand vor dem TUNEL-Test eine DNA-Fragmentierung mittels DNase-Behandlung statt, so wurden in dieser Positivkontrolle nahezu alle Spermien durch Fluorescein markiert (siehe Abb. 48C). Da sowohl die H342- als auch die Fluoresceinmarkierungen recht stark ausfielen und die Hintergrundfluoreszenz dagegen gering war, konnten für die Proben Quantifizierungen durchgeführt werden.

So wurden mit dem TUNEL-Kit zum Beispiel die Bienenspermien aus 15 verschiedenen Herkunftten auf ihre DNA-Integrität hin untersucht, um die generelle Variabilität von frischen unbehandelten Bienenproben zu erfassen (siehe Tab. 27).

Tab. 27: Ergebnisse der TUNEL-Tests 15 verschiedener Bienenspermien-Proben

Probe	Gezählte Spermien	TUNEL pos. [%]
1	437	0,92%
2	579	1,04%
4	435	0,92%
5	503	0,80%
6	437	1,14%
7	475	1,05%
8	479	0,84%
9	436	0,92%
10	441	0,91%
11	433	0,69%
12	432	0,93%
13	431	0,93%
14	430	1,16%
15	536	5,97%

In 14 der 15 Proben wurden nur 0,8 – 1,2% der Spermien markiert, enthielten also geschädigte DNA. In einer Probe konnten mit ca. 6% deutlich mehr Spermien mit fragmentierter DNA nachgewiesen werden.

3.1.9. Akrosomenintegritätstests

Ein intaktes Akrosom mit der Befähigung zur Akrosomenreaktion ist für die Befruchtung einer Eizelle essentiell. Starkes Abkühlen oder Einfrieren von Spermien kann zu Schäden der Akrosomen führen und somit die Fertilität der Samenzellen negativ beeinflussen. Deshalb ist es sinnvoll auch den Akrosomenzustand in die Vitalitätsbeurteilung von Bienenspermien mit einzubeziehen. Es wurden verschiedene Markierungsmethoden, die größtenteils bei Säugerspermien gut etabliert sind, angewendet und ihre Eignung als Bienenvitalitätstests geprüft.

3.1.9.1 Fluoreszenzmarkierung mit PSA und PNA

Es wurden Bienenspermien und zur Kontrolle der Methode auch Eberspermien mit PNA-FITC und PSA-FITC angefärbt. Bei PNA-FITC handelt es sich um ein Lektin aus der Erdnuss, das an den grün fluoreszierenden Farbstoff Fluorescein (FITC) gekoppelt wurde. PNA ist ein 110kDa großes Protein, das aus vier gleichen Untereinheiten besteht und an terminales Gal β -1,3-GalNAc (Galaktose-1,3- N-Acetylgalaktosamin) und Gal β -1,3-Gal bindet. Durch diese Eigenschaften bindet es spezifisch an die Innenseite der äußeren Akrosomenmembran und markiert diese mittels FITC. Da PNA-FITC nicht membrangängig ist, färbt es nur die Akrosomen von geschädigten oder permeabilisierten Spermien an. PSA ist auch ein Lektin, stammt jedoch aus der Erbse und bindet an die Akrosomenmatrix. Es hat eine Bindungsaffinität für α -D-gucosyl- und α -D-mannosyl-Reste. Durch die Kopplung an FITC markiert es den Akrosomeninhalt membrangeschädigter oder permeabilisierter Spermien. Die Ergebnisse der Anfärbungen mit PNA-FITC und PSA-FITC in Spermiesuspension sind in Abb. 49 A-C, Abb. 50 A und B und Abb. 51 A-C dargestellt.

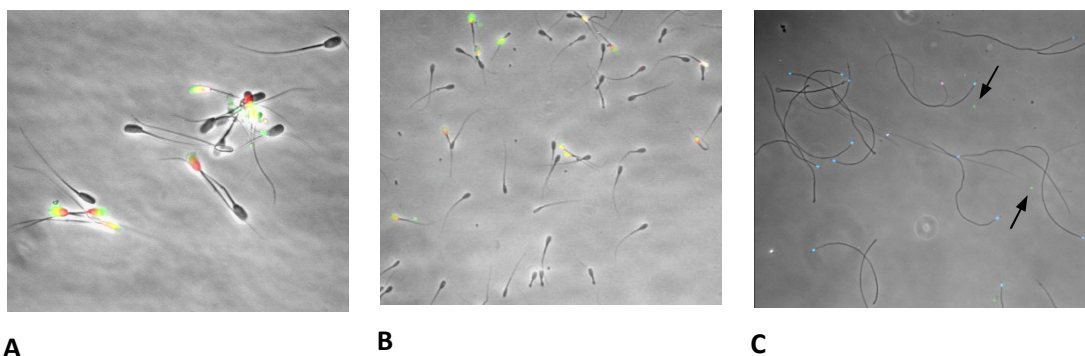
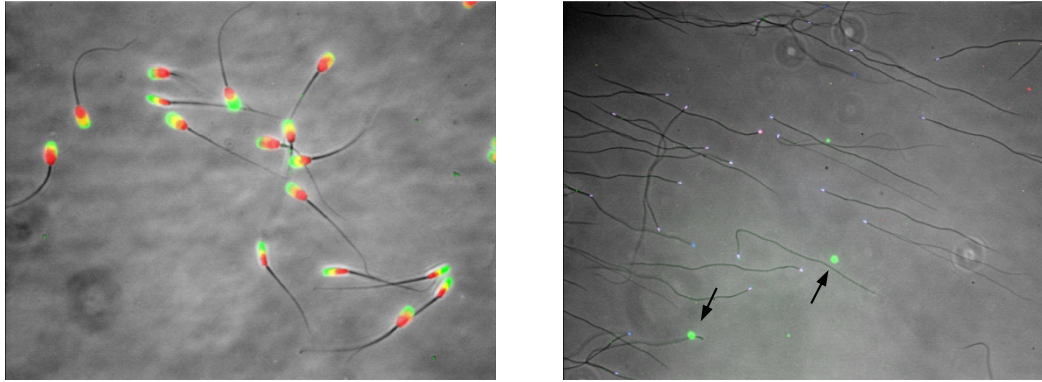


Abb. 49: Markierung von unbehandelten Eber- und Bienenspermien durch die FITC- gekoppelten Lektine PNA und PSA in Suspension. A: Durch PNA-FITC und PI markierte Eberspermien in Suspension. B: Durch PSA-FITC und PI markierte Eberspermien in Suspension. C: Durch PNA-FITC und PI markierte Bienenspermien in Suspension. Die Farbstoffkonzentrationen betragen für PNA-FITC/PSA-FITC 12,5 μ g/ml, für PI in den Eberspermienproben 7,5 μ g/ml und in den Bienenspermienproben 150 μ g/ml. Die Integrationszeiten waren für die Phasenkontrastbilder 40ms,

für die H342-Fluoreszenzaufnahmen 120-200ms und für die FITC-Bilder 800-2000ms. Die Aufnahmen wurden mit einem 20-fach Objektiv erstellt.

Setzte man einer Eberspermien suspension PNA-FITC oder PSA-FITC zu, so wurde ein kleiner Teil der Spermien durch diese Lektine markiert und zeigte infolge des gekoppelten FITCs eine deutliche grüne Fluoreszenz. Kombinierte man diese Markierung mit der Zugabe von PI, so fluoreszierten die PNA- bzw. PSA-markierten Spermien zusätzlich rot. Nur sehr selten trat eine Fluoreszenzart ohne die andere auf. Da die Farbstoffe an verschiedenen Stellen binden, ergab sich ein charakteristisches Fluoreszenzmuster. Das Akrosom wurde durch die Lektine markiert, wenn diese durch die Membranen treten konnten und wies dementsprechend eine Grünfluoreszenz auf. PI bindet dagegen an die DNA der Zellen und markierte somit die Spermienköpfe membrangeschädigter Eberspermien. An Stellen, an denen sich die Rot- und Grünfluoreszenzen der Aufnahmen überlagern, erscheint eine gelbe Färbung (Siehe Abb. 49A und 50A). PNA-FITC und PSA-FITC ließen kaum Unterschiede in der Markierungsstärke, -muster und -verteilung erkennen. PSA-FITC färbte allerdings häufiger Fremdpartikel an als PNA-FITC (nicht gezeigtes Resultat), weshalb PNA ein klareres und übersichtlicheres Ergebnis lieferte und favorisiert wurde. In Bienenspermien suspensionen ergab die Zugabe von PNA-FITC oder PSA-FITC und PI ein ganz anderes Bild. Während manche Spermien deutlich durch PI rot markiert wurden, zeigte kein einziges Bienenspermium eine Grünfluoreszenz. Es wurden nur wenige Fremdpartikel durch die Lektine markiert (siehe Pfeile Abb. 49C). Die zusätzliche H342-Anfärbung ließ besser erkennen, wo die Köpfe und damit auch die Akrosomen, also die potenziellen Bindestellen der Lektine, der Bienenspermien lagen. Auch eine Erhöhung der Lektinkonzentration änderte das Ergebnis nicht (nicht gezeigtes Ergebnis).

Als Positivkontrolle wurden die Spermien beider Spezies vor Fluoreszenzfärbung mittels Triton x100 permeabilisiert. Die Ergebnisse werden in Abb. 50A und B veranschaulicht.



A

B

Abb. 50: Markierung von permeabilisierten Eber- und Bienenspermien durch PNA-FITC, PI und z. T. H342 in Suspension. A: Durch PNA-FITC und PI markierte Eberspermien in Suspension B: Durch PNA-FITC, PI und H342 markierte Bienenspermien in Suspension. Die Farbstoffkonzentrationen betragen für PNA-FITC 12,5µg/ml, für PI in den Eberspermienproben 7,5µg/ml und in den Bienenspermienproben 150µg/ml und für H342 5µM. Die Integrationszeiten waren für die Phasenkontrastbilder 40ms, für die H342-Fluoreszenzaufnahmen 120-200ms und für die FITC-Fluoreszenzen 800-2000ms. Die Aufnahmen wurden mit einem Objektiv mit 63-facher (A), bzw. 20-facher (B) Vergrößerung erstellt.

In der permeabilisierten Eberspermien suspension wurden nahezu alle Spermien durch PI und PNA-FITC oder PSA-FITC (nicht gezeigt) markiert, wie es in Abb. 50A beispielhaft dargestellt wird. Das charakteristische Markierungsmuster, bedingt durch die rote Kopffluoreszenz und die grüne Akrosomenmarkierung, ist bei allen Eberspermien erkennbar. Anders verhält es sich mit den permeabilisierten Bienenspermien. Zwar wurden nahezu alle Spermien durch H342 und PI markiert, erkennbar an der violetten Färbung der Bienenspermienköpfe in Abb. 50B, jedoch konnten keine Grünfluoreszenzen an den Akrosomen gefunden werden. Dieses Ergebnis gilt sowohl für PNA-FITC als auch für PSA-FITC (nicht gezeigt). Wie schon für die unpermeabilisierten Proben berichtet, wiesen nur einige Fremdpartikel ohne ersichtlichen Spermienzusammenhang eine grüne FITC-Fluoreszenz auf (siehe Pfeile in Abb. 50B). Wurden die Eberspermien nicht permeabilisiert, jedoch vor der Markierung in N₂L eingefroren und wieder aufgetaut, so wiesen fast alle Spermien sowohl eine PI- als auch PNA-FITC-Fluoreszenz auf (siehe Abb. 51 A). Auch mit PSA-FITC war das Ergebnis das Gleiche. Die Fluoreszenzsignale fielen genauso stark und deutlich aus wie nach einer Permeabilisierung der Spermien. Wie auch in den unbehandelten oder permeabilisierten Bienenspermienproben wurden in der eingefrorenen Bienenprobe durch PNA-FITC oder PSA-FITC keine Spermienakrosomen markiert. Beide Lektinen markierten einige Fremdpartikel und durch PSA-FITC wurden manche Spermien teilweise am Flagellum gefärbt, wie es in Abb. 51C durch einen Pfeil gekennzeichnet wird. Diese Fluoreszenzsignale traten recht selten und meist in Bereichen mit mehreren angefärbten Fremdpartikeln auf, zudem waren immer nur kurze Stücke des

Flagellums betroffen. Fast alle Zellen waren PI-positiv und wurden gleichzeitig durch H342 markiert. Eine Überschneidung dieser beiden Fluoreszenzsignale resultiert in einer violetten Markierung der Spermienköpfe (siehe Abb. 51B und C).

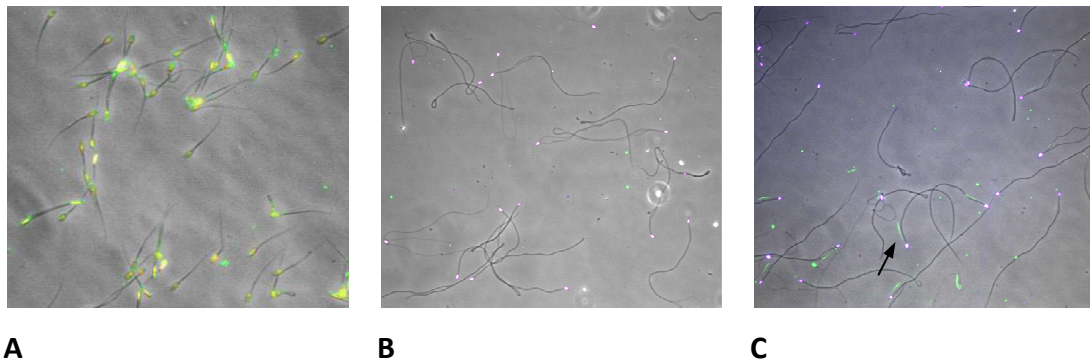


Abb. 51: Markierung von gefrorenen Eber- und Bienenspermien durch PNA-FITC oder PSA-FITC, PI und z. T. H342 in Suspension. A: Durch PNA-FITC und PI markierte Eberspermien in Suspension. B: Durch PNA-FITC, PI und H342 markierte Bienenspermien in Suspension. C: Durch PSA-FITC, PI und H342 markierte Bienenspermien in Suspension. Die Spermien wurden vor Markierung in N_2L eingefroren und bei Raumtemperatur wieder aufgetaut. Die Farbstoffkonzentrationen betragen für PNA-FITC $12,5\mu\text{g/ml}$, für PI in den Eberspermienproben $7,5\mu\text{g/ml}$ und in den Bienenspermienproben $150\mu\text{g/ml}$ und für H342 $5\mu\text{M}$. Die Integrationszeiten waren für die Phasenkontrastbilder 40ms, für die H342-Fluoreszenzaufnahmen 120-200ms, für die PI-Fluoreszenzbilder 800ms und für die FITC-Fluoreszenzen 800-2000ms. Die Aufnahmen wurden mit einem Objektiv mit 20-facher Vergrößerung erstellt.

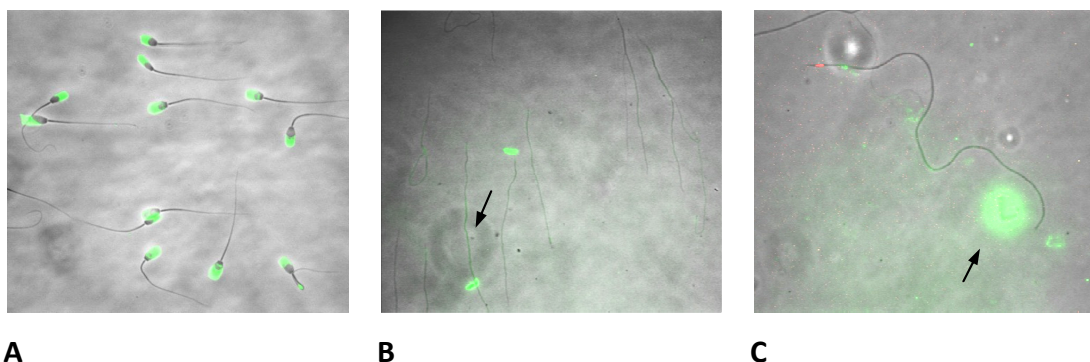


Abb. 52: Anfärbung von Eber- und Bienenspermienausstrichen durch PNA-FITC. A: Durch PNA-FITC markierte Eberspermien. Die Spermien wurden vor der Markierung durch PNA-FITC auf einem Deckglas ausgestrichen, angetrocknet und mittels PFA fixiert. B: Auf einem Deckglas ausgestrichene, angetrocknete und durch PFA fixierte Bienenspermien nach Einwirkung von PNA-FITC. C: Auf einem Deckglas ausgestrichene, angetrocknete, durch PFA fixierte und mittels Triton x100 permeabilisierte Bienenspermien nach Einwirkung von PNA-FITC. Die Farbstoffkonzentrationen betragen für PNA-FITC $12,5\mu\text{g/ml}$ und für PI $150\mu\text{g/ml}$. Die Integrationszeiten waren für die Phasenkontrastbilder 40ms, für die PI-Fluoreszenzaufnahmen 800ms und für die FITC-Fluoreszenzen 800-2000ms. Die Aufnahmen wurden mit einem Objektiv mit 63-facher (A), bzw. 20-facher (B und C) Vergrößerung erstellt.

Die Fluoreszenzmarkierungen durch FITC-gekoppelte Lektine wurden auch an Spermienausstrichen durchgeführt um zu prüfen, ob und in welchem Ausmaß die Methode

einen Einfluss auf die Anfärbung ausübt. Die Akrosomen von Eberspermien wurden wie in Suspension auch durch die fluoreszierenden Lektine deutlich markiert. Einziger Unterschied war, dass alle Spermien auf den Ausstrichen fluoreszierten, auch wenn die Probe zuvor weder permeabilisiert noch gefroren wurde (siehe Abb. 52A). Bei Bienenspermienausstrichen verhielt es sich dagegen völlig anders. Wie auch in den Suspensionen wurden die Akrosomen der Spermien weder durch PNA-FITC noch durch PSA-FITC markiert. Nur Fremdpartikel (siehe Pfeil in Abb. 52C) und bei manchen Spermien Teile des Flagellums (siehe Pfeil in Abb. 52B) wiesen eine grüne Fluoreszenz auf. Allerdings sahen die Fluoreszenzsignale an den Flagellen häufig so aus, als ob nicht die Flagellen selbst, sondern Partikel um sie herum markiert worden wären (siehe Abb. 52C). Auch eine Permeabilisierung änderte an diesem Ergebnis nichts (Abb. 52C). Insgesamt wurden auf den Ausstrichen mehr Fremdpartikel markiert, außerdem war die Hintergrundfluoreszenz deutlich stärker, wie in Abb. 52B und C zu erkennen ist.

3.1.9.2 Antikörpervermittelte Fluoreszenzmarkierung gegen Akrosin

Da eine Akrosomenmarkierung mit FITC-gekoppelten Lektinen nicht funktionierte, wurde eine antikörpervermittelte Fluoreszenzfärbung des Akrosins durchgeführt. Akrosin ist eine für die Befruchtung wichtige Serinprotease, welche in der Akrosomenmatrix intakter und noch nicht reagierter Akrosomen von Säugerspermien zu finden ist. Der Versuch wurde parallel an Ausstrichen von Eber- und Bienenspermien durchgeführt.

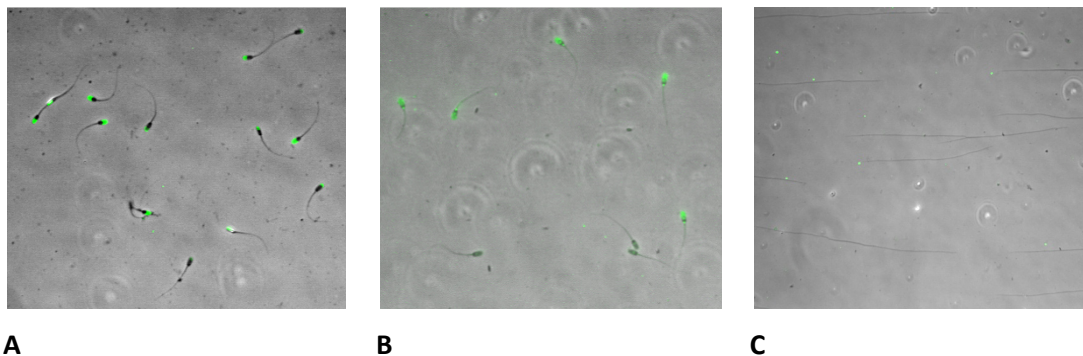


Abb. 53: Indirekte antikörpervermittelte Fluoreszenzmarkierung von Akrosin an Eber- und Bienenspermienausstrichen. A: Angetrocknete Eberspermien, markiert mittels indirekter antikörpervermittelter Fluoreszenzmarkierung von Akrosin mit vorhergehender Fixierung. B: Angetrocknete Eberspermien, markiert mittels indirekter antikörpervermittelter Fluoreszenzmarkierung von Akrosin ohne vorhergehende Fixierung. C: Angetrocknete Bienenspermien, markiert mittels indirekter antikörpervermittelter Fluoreszenzmarkierung von Akrosin mit vorhergehender Fixierung. Die Integrationszeiten waren für die Phasenkontrastbilder 40ms und für die Alexa Fluor488-Fluoreszenzen 800-2000ms. Die Aufnahmen wurden mit einem Objektiv mit 20-facher Vergrößerung erstellt.

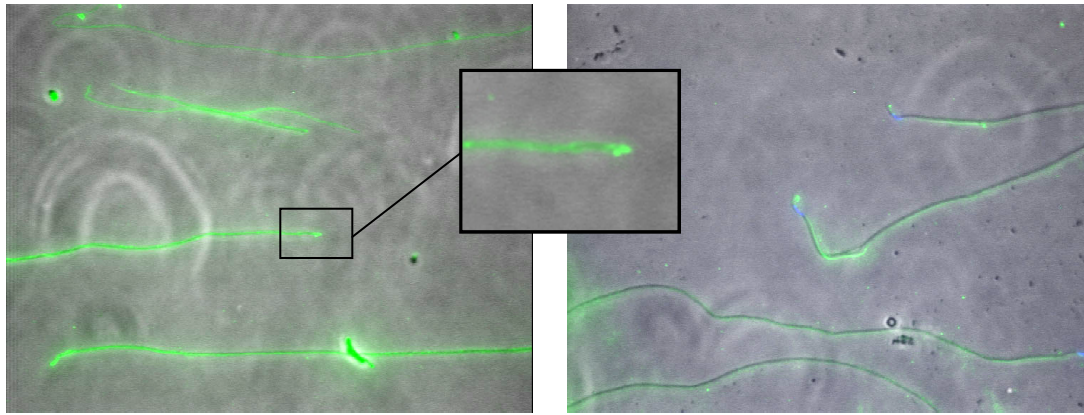
Die auf Deckgläsern angetrockneten Eberspermien zeigten nach der indirekten Antikörpermarkierung fast alle deutliche Fluoreszenzsignale im akrosomalen Bereich. Bei manchen Spermien war das gesamte Akrosom markiert, bei anderen nur ein Teil bis hin zu kleinen Punktmarkierungen, jedoch wurden niemals andere Spermienbereiche angefärbt. Die Fluoreszenzen waren in der fixierten Probe sehr klar erkennbar (Abb. 53A) und recht stark. In der unfixierten Eberprobe, siehe Abb. 53B, waren die Signale verschwommener und weniger differenzierbar. Generell waren in beiden Proben so gut wie keine Fremdpartikel markiert.

Die Akrosomen von Bienenspermien konnten durch diese Methode weder mit noch ohne Fixierung markiert werden. Wie in Abb. 53C zu sehen, wurden stets nur wenige Fremdpartikel angefärbt, die jedoch keinen Zusammenhang mit den Spermien erkennen ließen.

3.1.9.3 Antikörpervermittelte Fluoreszenzmarkierung gegen Hexokinase

Da auch die Markierung des Akrosins an Bienenspermien nicht funktionierte, wurde versucht lokale Plasmamembrandefekte im Akrosomenbereich durch den Nachweis eines cytoplasmatischen Enzyms zu erreichen. Ausgewählt wurde die Hexokinase, die die Eingangsreaktion der Glykolyse katalysiert.

Zuerst wurde eine klassische Immunofluoreszenzanfärbung an Ausstrichen von Bienenspermien durchgeführt. Weil mit einem sekundären Antikörper gearbeitet wurde, der an Alexa Fluor 488 gekoppelt war, erzeugten Antikörperbindungen eine grüne Fluoreszenz. Wie in Abb. 54A erkennbar, zeigten alle Bienenspermien eine starke Grün-Fluoreszenz. Die Fluoreszenzsignale waren relativ stark und verliefen gleichmäßig über das gesamte Spermium, nur manchmal war das Signal an einem Ende des Spermiums erst etwas schwächer um dann apikal besonders stark zu enden (siehe Einblendung zu Abb. 54A).

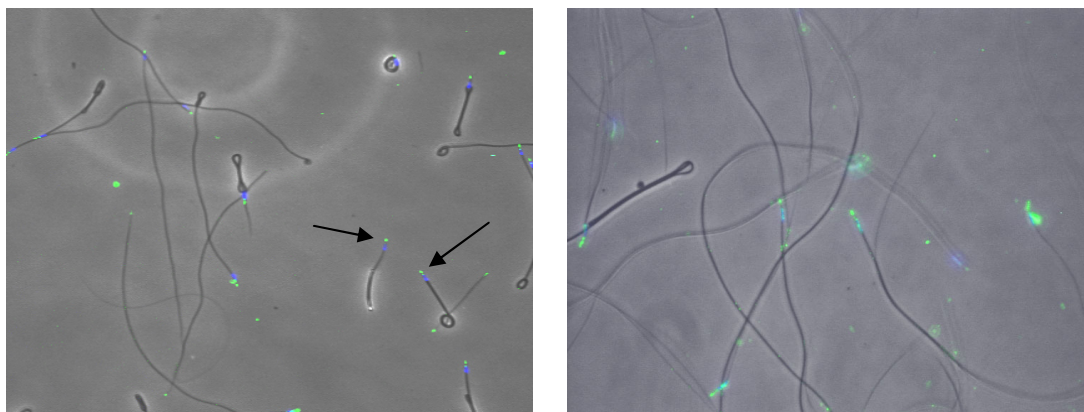


A

B

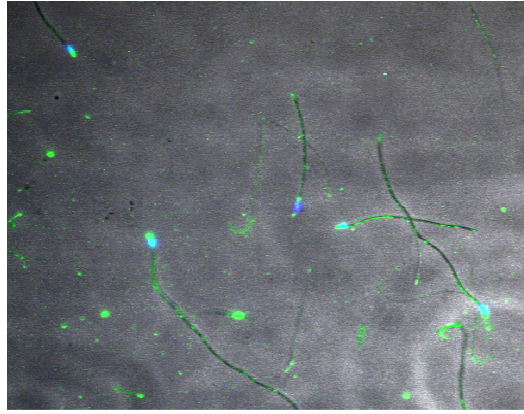
Abb. 54: Antikörpervermittelte Fluoreszenzmarkierung (Anti-HK/AF488) von Hexokinase an Bienenspermienausstrichen. Angetrocknete Bienenspermien, ohne Fixierung oder Permeabilisierung, markiert durch den primären Antikörper Anti-Hefe-Hexokinase aus Kaninchen (1:25 Verdünnung), an den wiederum der sekundäre Antikörper Anti-Kaninchen IgG, gekoppelt an Alexa Fluor 488 (1:400 Verdünnung) gebunden wurde. Die Integrationszeiten waren für die Phasenkontrastbilder 40ms und für die Alexa Fluor488-Fluoreszenzen 3200ms. Die Aufnahmen wurden mit einem 63-fachen Objektiv erstellt. A zeigt nur die antikörpervermittelten Fluoreszenzsignale, während B zusätzlich H342-Markierungen darstellt.

Kombiniert man die antikörpervermittelte Fluoreszenzmarkierung von Hexokinase mit einer DNA-Fluoreszenzfärbung durch H342 (siehe Abb. 54B), so fällt die Orientierung leichter, und man kann das Kopfende des Spermiums vom Schwanzende unterscheiden. Es fällt dann auf, dass, obwohl die gesamten Spermien relativ gleichmäßig durch Anti-HK/AF488 markiert sind, die Akrosomenbereiche mancher Spermien eine etwas stärkere Fluoreszenz aufweisen als der Rest. Der Kopf fluoresziert dagegen bei diesen Spermien etwas schwächer. Wie schon erwähnt, wiesen alle Bienenspermien der Ausstriche eine starke Fluoreszenz auf unabhängig von einer Permeabilisierung durch Triton X100. Die Negativkontrolle, bei der der prim. AK durch Puffer ersetzt wurde, zeigte keine Fluoreszenzsignale (nicht gezeigt), was eine Kreuzreaktion zwischen dem sek. AK und Oberflächenproteinen ausschließt.



A

B



C

Abb. 55: Antikörpervermittelte Fluoreszenzmarkierung (Anti-HK/AF488) von Hexokinase in Bienenspermien suspensionen. A und B: Bienenspermien in Suspension wurden ohne Permeabilisierung nach der Langzeitmethode (2.3.9.3) behandelt. Sie wurden durch den primären Antikörper Anti-Hefe-Hexokinase aus Kaninchen (8mg/ml), an den wiederum der sekundäre Antikörper Anti-Kaninchen IgG, gekoppelt an Alexa Fluor 488 (1:100 Verdünnung) gebunden wurde, markiert. Die Integrationszeiten waren für die Phasenkontrastbilder 40ms, 120ms für die H342-Aufnahmen und für die Alexa Fluor488-Fluoreszenzen 3200ms. A: Die Aufnahmen wurden mit einem 20-fachen Objektiv erstellt. B: Die Aufnahmen wurden mit einem 63-fachen Objektiv erstellt. C: Positivkontrolle; Spermien wurden vor Markierung permeabilisiert. Die Aufnahmen wurden mit einem 20-fachen Objektiv erstellt.

Die Anti-HK/AF488-Markierung wurde im Anschluss mit der Langzeitmethode (vgl. 2.3.9.3) an unbehandelten Bienenspermien in Suspension wiederholt. In Suspension zeigten zwar weiterhin viele Spermien ein grünes Fluoreszenzsignal, jedoch war dieses meist auf den akrosomalen Bereich oder Kopf beschränkt. Nur selten fluoreszierten Teile der Flagellen. Meistens war die Fluoreszenzintensität so gering, dass die Signale während der Bildbearbeitung verloren gingen. Wie in Abb. 55A zu sehen ist, wiesen fast alle Spermien eine punktförmige Markierung am Akrosom auf (siehe Pfeile in Abb. 55A), außerdem waren auch einige Fremdpartikel angefärbt. Insgesamt war die Leuchtstärke der Fluoreszenzsignale in den Suspensionen wesentlich schwächer als auf den Ausstrichen. Die intensivste Markierung war jedoch bei beiden Probenarten am Akrosom zu finden, das wird auch in Abb. 55B deutlich, die mit einem 63-fachen Objektiv aufgenommen wurde. In der Positivkontrolle, einer permeabilisierten Probe, wurden alle Bienenspermien angefärbt, wobei sich die Markierungen meist über die gesamten Spermien erstreckten. Insgesamt waren die Fluoreszenzen der Spermien aber nicht so stark und gleichmäßig wie bei den Ausstrichen. Außerdem wurden, wie in Abb. 55C zu erkennen ist, auch relativ viele Fremdpartikel durch Anti-HK/AF488 angefärbt.

Tab. 28: Zählung der durch Anti-HK/AF488, H342 und PI markierten Spermien in Suspension.

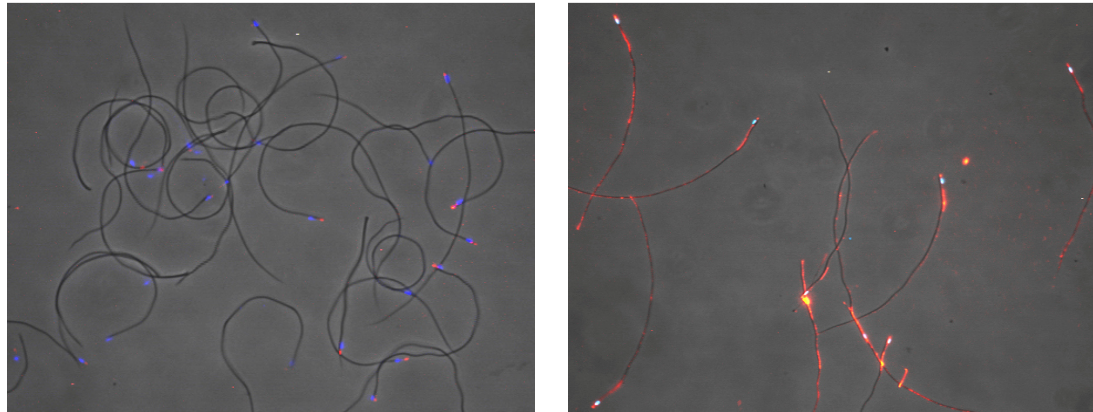
Markierungsart	Anzahl	Prozentanteil [%]
Spermien insgesamt	277	100%
nur H342 markiert	50	18%
H342 und Anti-HK/AF488	227	82%
H342 und Anti-HK/AF488 und PI	18	6,5%

Für eine unbehandelte frische Probe, die man mit Anti-HK/AF488, H342 und PI versetzte, wurden die Spermien mit verschiedenen Markierungstypen gezählt und ihr prozentualer Anteil ausgerechnet. Das Ergebnis dieser Quantifizierung wird in Tab.28 angegeben. Auffallend ist, dass in dieser relativ frischen und unbehandelten Probe 82% der Spermien Grünfluoreszenz aufwiesen, also durch Anti-HK/AF488 markiert wurden, aber nur 6,5% der Spermien durch PI rot angefärbt waren.

Die hier angewendete Methode war vergleichsweise zeitaufwendig (Langzeitmethode) und enthielt mehrere Reinigungs- und Inkubationsschritte. Das Verfahren wurde schrittweise verkürzt und an die Eigenschaften der verschiedenen Spermienarten (Eber und Biene) angepasst. So zeigte sich z.B., dass für Eberspermien geringere Inkubationszeiten der Antikörper ausreichten. Dennoch konnte auch für Bienenspermien der Zeitaufwand dieser Untersuchung um ein Vielfaches reduziert werden. Eine weitere Modifikation betrifft den eingesetzten Antikörper, dieser wurde von der Firma Antibodies online bezogen und enthielt standardmäßig Azid zur Konservierung. Vor Gebrauch wurde das Azid aus der Antikörperlösung entfernt (s. 2.3.9.3). Diese Veränderungen machte die Methode als Schnelltest praktikabler und für die Spermien schonender. Der Prozentsatz markierter Spermien wurde durch diese Änderungen deutlich reduziert (ca. 44% statt 82%).

Abb. 56A zeigt durch das verkürzte Verfahren markierte Bienenspermien in Suspension. Außer der Anti-HK/AF546-Markierung wurde der Probe auch H342 zugesetzt. Da der sek. AK. mit Alexa Fluor 546 statt mit Alexa Fluor 488 gekoppelt war, fluoreszierten Anti-HK markierte Spermien orange/rot statt grün. Es stellte sich heraus, dass dieser Fluoreszenzfarbstoff für eine Quantifizierung besser geeignet ist, da sie sich farblich besser vom blauen H342 absetzt. Wie schon erwähnt, wurden mit der modifizierten Methode deutlich weniger Bienenspermien angefärbt, dennoch zeigten ca. 44% aller Spermien eine orangene Fluoreszenz. Diese war meistens punktförmig und klein und außerdem auf den akrosomalen Bereich beschränkt. Wie auch bei den Versuchen zuvor waren nur selten Fluoreszenzsignale an den Flagellen der Spermien zu beobachten oder diese waren so

schwach, dass sie bei der Bildbearbeitung wegfielen. In den Positivkontrollen, die durch Triton x100 oder N₂L – Einwirkung permeabilisiert wurden, wiesen alle Spermien eine intensive orange-rote Fluoreszenz auf. Diese waren, wie in Abb. 56B zu sehen, am Akrosom und Kopf zu finden und häufig erstreckten sie sich auf weite Teile des Flagellums.



A

B

Abb. 56: Fluoreszenzmarkierung (Anti-HK/AF546) in Bienenspermien suspensionen. Antikörpervermittelte Fluoreszenzmarkierung von Bienenspermien in Suspension nach der Kurzzeitmethode (prim. AK: Anti-Hefe-Hexokinase aus Kaninchen (8mg/ml), sek. AK: Anti-Kaninchen IgG, gekoppelt an Alexa Fluor 546 (vgl. 2.3.9.3.) Die Integrationszeiten waren für die Phasenkontrastbilder 40ms, 120ms für die H342-Aufnahmen und für die Alexa Fluor546-Fluoreszenzen 3200ms. Die Aufnahmen wurden mit einem 20-fachen Objektiv erstellt. A: Unbehandelte Probe; B: Positivkontrolle, die Spermien wurden vor Markierung in N₂L gefroren und bei Raumtemperatur wieder aufgetaut.

Interessant ist, dass mit zunehmendem Spermienalter und schädigender Behandlung die Fluoreszenzsignale intensiver und über das Spermium ausgedehnter auftraten. Auch der Anteil markierter Spermien nimmt zu, eine Quantifizierung dieser Beobachtung erfolgte später (siehe Abb. 60-62). In frischen Proben, die möglichst schonend behandelt wurden, findet man meist nur die schon erwähnten punktförmigen Fluoreszenzen am Akrosom (Abb. 57A und B). Nach längerer Inkubation der Proben sind mehr Spermien markiert, außerdem dehnen sich die Signale aus und werden stärker. Oft sind dann Spermien zu beobachten, deren komplettes Akrosom fluoresziert (Abb. 57C).

Wurden die Bienenspermien ohne DMSO in N₂L eingefroren, so fluoreszierten alle Spermienköpfen, Akrosomen und die meisten Flagellen intensiv (Abb. 57D und E). Die stärksten Signale waren wie auch bei allen anderen Versuchen an den Akrosomen bzw. im gesamten Kopfbereich. Spermien, die mit DMSO eingefroren wurden, fluoreszierten nach Auftauen weniger ausgedehnt und leuchtstark. Die Markierungen an den Flagellen gingen dann häufig durch die Bildbearbeitung verloren, weil sie sich zu wenig vom Hintergrund abhoben.

Ergebnisse

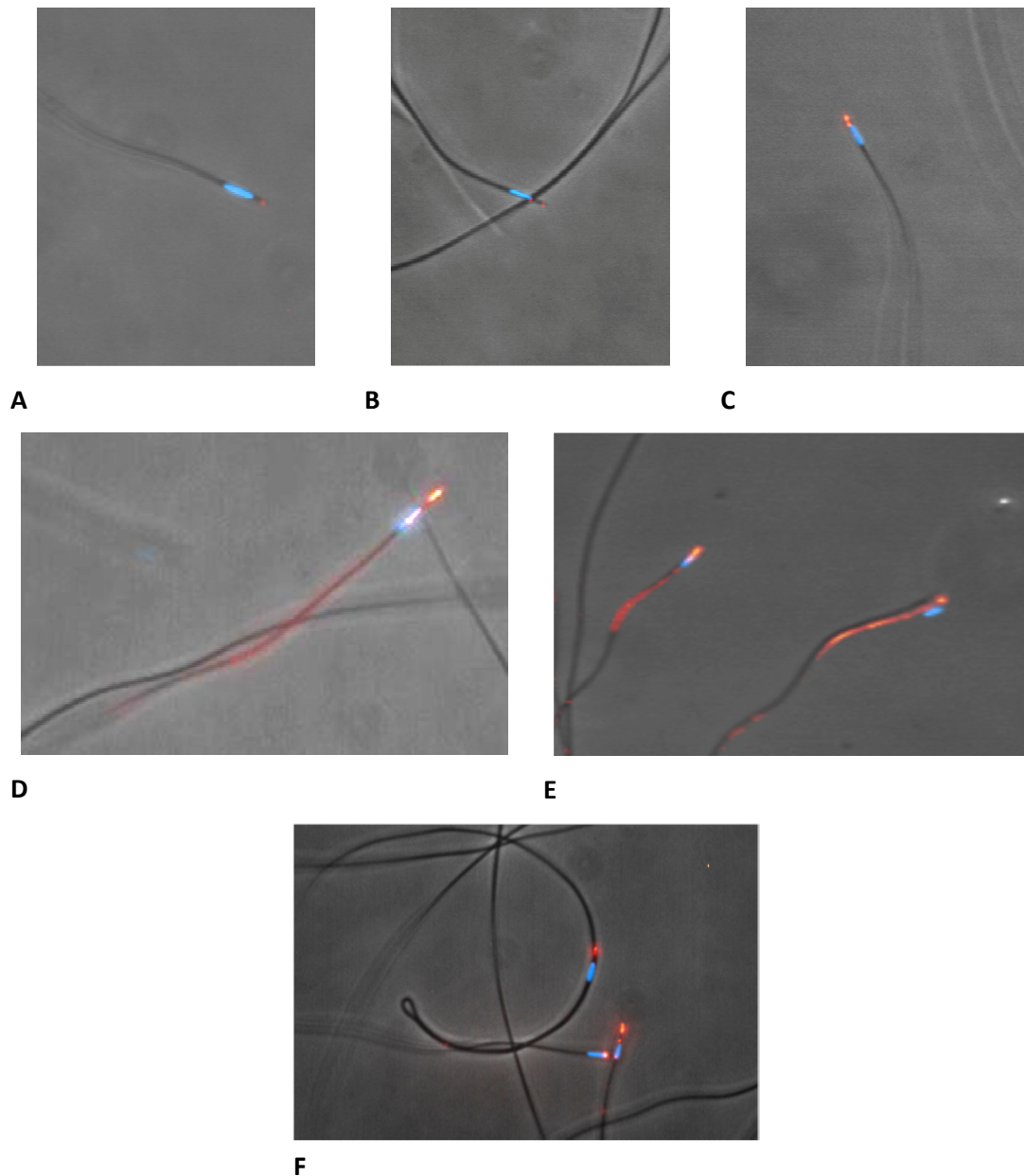


Abb.57: Fluoreszenzmarkierung (Anti-HK/AF546) an Bienenspermien suspensionen. Antikörpervermittelte Fluoreszenzmarkierung von Bienenspermien in Suspension nach der Kurzzeitmethode (prim. AK: Anti-Hefe-Hexokinase aus Kaninchen (8mg/ml), sek. AK: Anti-Kaninchen IgG, gekoppelt mit Alexa Fluor 546 (vgl. 2.3.9.3.). Die Integrationszeiten waren für die Phasenkontrastbilder 40ms, 120ms für die H342-Aufnahmen und für die Alexa Fluor546-Fluoreszenzen 3200-3600ms. Die Aufnahmen wurden mit einem 63-fachen Objektiv erstellt. A und B: Unbehandelte frische Probe (1Tag alt). C: Probe 5 Tage alt. D und E: Probe in N₂L eingefroren. F: Probe mit 10% DMSO versetzt und anschließend in N₂L eingefroren.

Parallel zu den Bienenspermien, wurden auch Eberspermienproben mit der Kurzzeitmethode untersucht (Abb. 58). Man erkennt, dass nur manche Spermien eine orange-rote Fluoreszenz aufweisen und zwar unterschiedlich ausgeprägt. Während einige Markierungen sehr intensiv sind und den gesamten Kopfbereich eines Spermiums einnehmen, sind andere nur sehr schwer erkennbar (siehe Pfeile in Abb. 58).

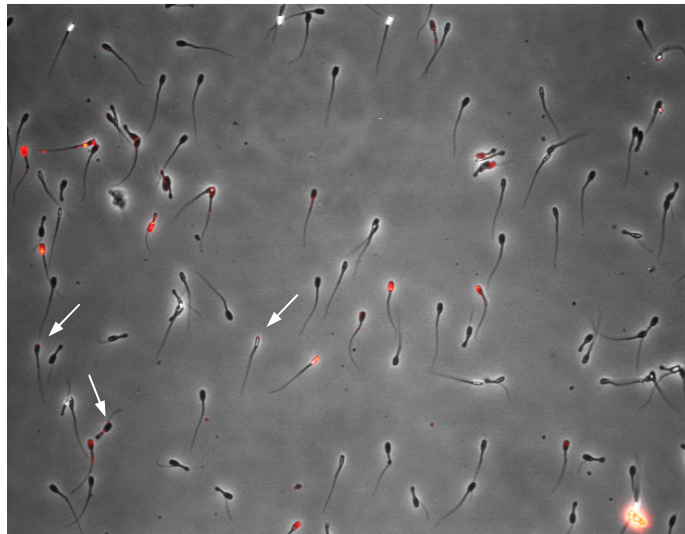


Abb. 58: Fluoreszenzmarkierung mit anti-HK/AF546 an Eberspermien suspension. Antikörpervermittelte Fluoreszenzmarkierung von Eberspermien in Suspension nach der abgewandelten Kurzzeitmethode (prim. AK: Anti-Hefe-Hexokinase aus Kaninchen (8mg/ml), sek. AK: Anti-Kaninchen IgG, gekoppelt an Alexa Fluor 546 (s. 2.3.9.3)). Die Integrationszeiten waren für die Phasenkontrastbilder 40ms, und für die Alexa Fluor546-Fluoreszenzen 3200ms. Die Aufnahme wurde mit einem 20-fach Objektiv erstellt. Die Probe war einen Tag alt.

Die verschiedenen Markierungsmuster sind exemplarisch in Abb. 59 dargestellt. Häufig waren mit dieser verbesserten Kurzzeitmethode nur punktförmige zum Teil schwache Markierungen am Akrosom (vgl. Abb. 59A) oder am Übergang vom Kopf zum Flagellum (vgl. Abb. 59B) zu erkennen. Wie in Abb. 59C zu sehen ist, konnte aber auch der ganze Akrosombereich markiert sein, ohne dass andere Strukturen des Spermiums markiert waren oder der gesamte Kopfbereich war markiert (Abb. 59D). Abbildungen 59E und F zeigen Spermien, die zusätzlich zu den Markierungen am Kopf auch am Flagellum angefärbt sind. Die Fluoreszenzen am Flagellum waren häufig ungleichmäßig verteilt und unterschiedlich stark.

Um einen Überblick über die quantitative Verteilung der verschiedenen Markierungsmuster in Eberspermien suspensionen zu erhalten, wurden die unterschiedlich angefärbten Eberspermien von 5 Spermien suspensionen ausgezählt. Von jeder Probe wurden mehrere Aufnahmen erstellt und die Anzahl der unterschiedlich markierten Eberspermien (siehe Abb. 59A-F) in den Bildern ausgezählt. Dieser Versuch wurde mit unterschiedlich lang gelagerten Proben durchgeführt. Für die Auszählung nach 3 Tagen Inkubation wurden nur 3 statt 5 Spermien suspensionen untersucht.

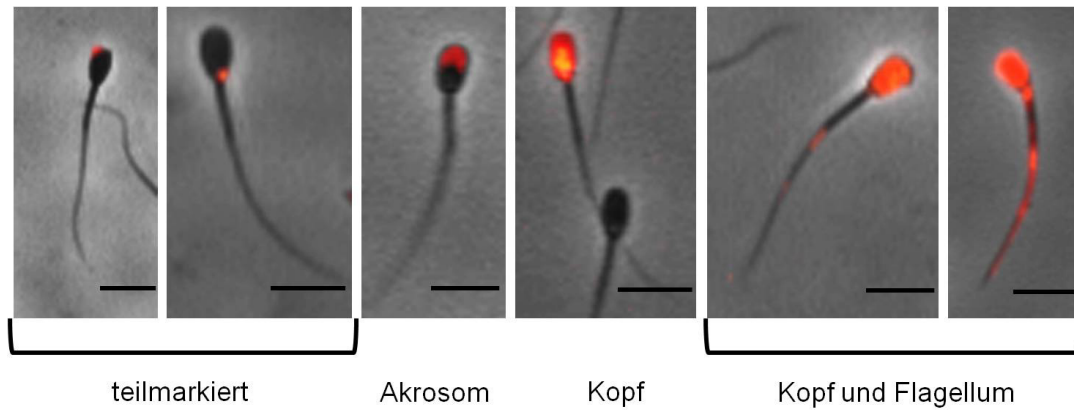


Abb. 59: Muster der Fluoreszenzmarkierungen an Eberspermien mit Anti-HK/AF546. Bildausschnitte aus Aufnahmen von Anti-HK/AF546-markierten Eberspermien in Suspension. Die Aufnahmen wurden mit einem 20-fach Objektiv erstellt und die Integrationszeiten waren 40ms für die Phasenkontrastbilder und 3200ms für die Alexa Fluor 546- Aufnahmen. A) und B) zeigen Spermien, die je eine punkartige Fluoreszenz an verschiedenen Stellen aufweisen. In A) liegt das Signal an der Spitze, seitlich am Akrosom und in B) seitlich am Kopf, nahe dem Flagellum. Das Fluoreszenzsignal des Spermiums in C) dagegen nimmt das gesamte Akrosom ein. Die AF546-Fluoreszenz kann sich aber auch über den gesamten Kopf erstrecken, dieser Zustand ist in D) dargestellt. Ist das Signal noch ausgedehnter, nimmt also Teile oder das ganze Flagellum ein, so sieht es aus, wie in E) und F) gezeigt. Der Balken entspricht 10 μ m

Betrachtet man die Säulendiagramme in Abbildung 60, so fällt auf, dass die Markierungen der Spermien von Eber zu Eber deutlich schwanken. So wurden in der Probe von Eber 3 32,3% der Spermien durch anti-HK/AF546 markiert, in Probe von Eber 4 aber nur 10,8%. Bei allen Eberproben nimmt aber mit zunehmender Lagerungszeit der Anteil unmarkierter Spermien ab. Die Stärke dieser Abnahme schwankt dann wieder von Probe zu Probe. Die stärkste Abnahme zeigte Probe E4, diese Probe enthielt 89,2% unmarkierte Spermien nach 3 Tagen Lagerung (Abb. 61) und nach 5 Tagen dann nur noch 45,9% (Abb. 62). Am stabilsten zeigte sich die Probe von Eber E2, sie verlor im Laufe der Lagerung nur ca. 19,5% der unmarkierten Spermien.

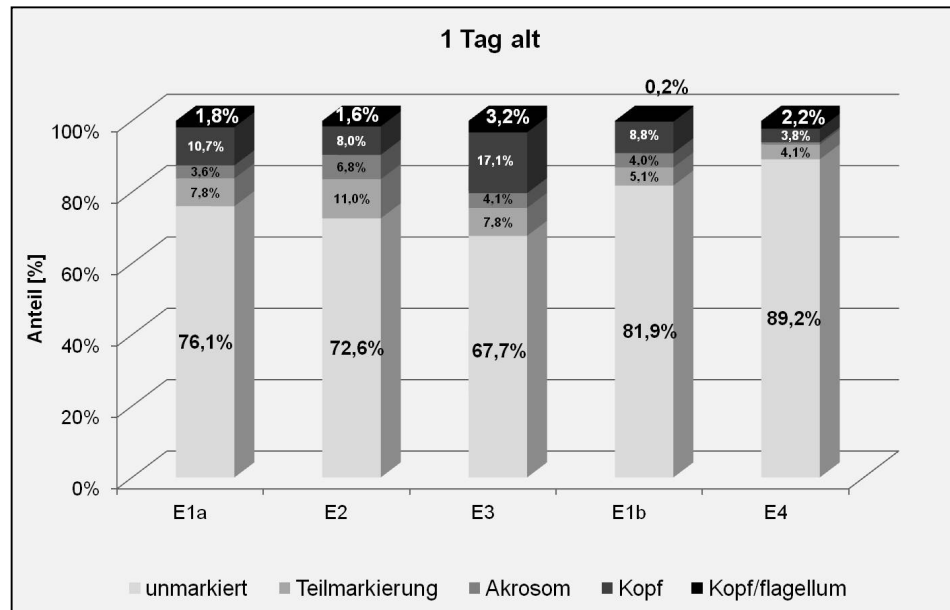


Abb. 60: Quantitative Auswertung verschiedener durch Anti-HK/AF546 hervorgerufene Markierungsmuster in 1 Tag bei 17°C gelagerten Eberspermiesuspensionen. Aufgetragen ist die prozentuale Verteilung der unterschiedlichen Anti-HK/AF546- Markierungstypen in 5 Eberspermiesuspensionen. Pro Probe wurden durchschnittlich 440 Spermien gezählt. Von Eber E1 wurden zwei Proben, die an verschiedenen Tagen gewonnen wurden, untersucht.

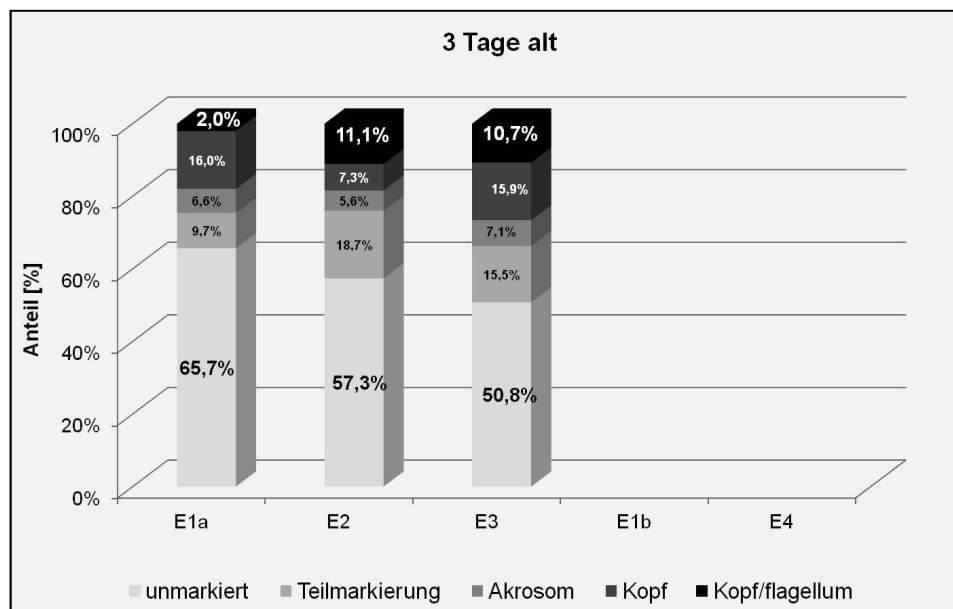


Abb. 61: Quantitative Auswertung verschiedener durch Anti-HK/AF546 hervorgerufene Markierungsmuster in 3 Tage bei 17°C gelagerten Eberspermiesuspensionen. Aufgetragen ist die prozentuale Verteilung der unterschiedlichen Anti-HK/AF546- Markierungstypen in 3 Eberspermiesuspensionen. Dabei handelt es sich um dieselben Proben, deren Markierungsverhalten zwei Tage zuvor untersucht wurde (siehe Abb. 60). Pro Probe wurden durchschnittlich 440 Spermien gezählt.

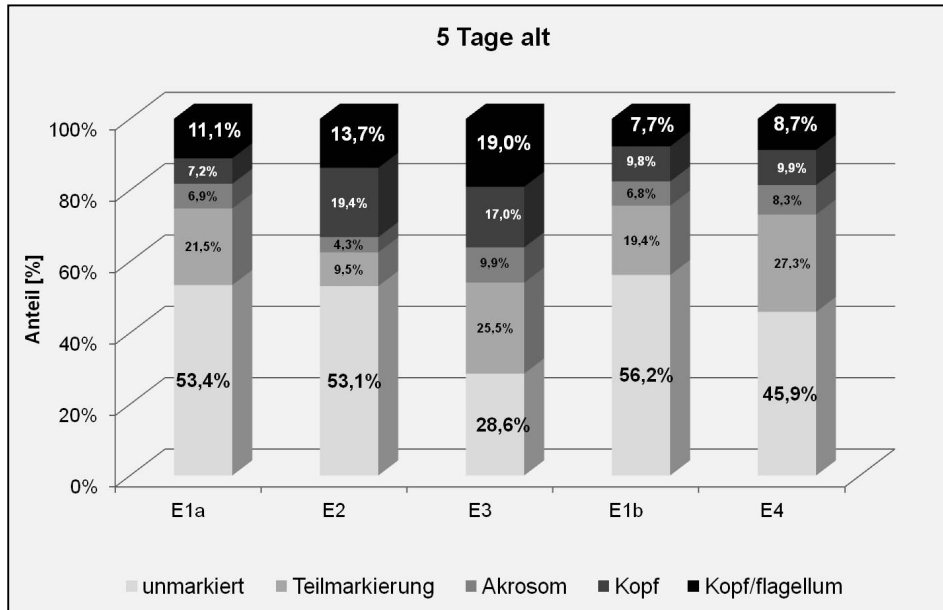


Abb. 62: Quantitative Auswertung verschiedener durch Anti-HK/AF546 hervorgerufene Markierungsmuster in 5 Tage bei 17°C gelagerten Eberspermiesuspensionen. Aufgetragen ist die prozentuale Verteilung der unterschiedlichen Anti-HK/AF546- Markierungstypen in 5 Eberspermiesuspensionen. Es handelt sich um dieselben Proben, deren Markierungsverhalten 2 und 4 Tage zuvor untersucht wurde. (siehe Abb. 60 und 61). Pro Probe wurden durchschnittlich 440 Spermien gezählt. Von Eber E1 wurden zwei Proben, die an verschiedenen Tagen gewonnen wurden, untersucht.

Es ist zu beobachten, dass die Anteile der teilmarkierten Spermien, der Spermien mit fluoreszierendem Akrosom oder Kopf sowohl zwischen den Proben als auch innerhalb einer Probe zwischen den Lagerungszeiten stark variieren. So steigt z. B der Anteil der Kopfmarkierten Spermien in E1a von anfänglichen 10,7% (1 Tag alt) auf 16% nach 3 Tagen Lagerung (Abb. 61), um dann innerhalb von 2 weiteren Tagen Lagerung auf 7,2% zu sinken. Der Anteil dieser Markierungssorte blieb in E3 dagegen relativ konstant und in E2 nahm er von der ersten zur letzten Zählung deutlich zu.

Es wurden verschiedene Tests zur Überprüfung und Beurteilung unterschiedlicher Spermienfunktionen und -strukturen angewendet. Ein besonderes Augenmerk galt dabei der Zellmembran, da diese bekanntermaßen durch Temperaturverringern besonders in Mitleidenschaft gezogen wird. Einige Untersuchungsmethoden fielen durch besondere Kosten- und/oder Zeitersparnis oder auch Anwenderfreundlichkeit positiv auf, hier wäre vor allem der GPI-Test zu nennen, da er schnell und unkompliziert durchgeführt werden kann und kostengünstig ist. Andere Methoden erwiesen sich als ungeeignet, sei es durch unklare Ergebnisse (siehe 3.1.8.2 SCD-Test), Resultate ohne ersichtliche Korrelation mit *in*

vivo-Daten, wie es beim ICDH-Test der Fall war (vgl. 3.1.5) oder, weil die Methode bei Bienenspermien nicht funktionierte (siehe 3.1.9.1 und 3.1.9.2). Als besondere Herausforderung erwies sich die Untersuchung des Akrosoms, da keine der etablierten Färbemethoden bei Bienenspermien funktionierte. Erst durch eine antikörpervermittelte Markierung gegen Hexokinase gelang es dieses Zellkompartiment anzufärben und lokale Schäden an diesem zu detektieren. Auch die Untersuchung des DNA-Status gelang keinesfalls mit allen an Säugerspermien bekannten Methoden, erst der fluoreszenzmikroskopische TUNEL-Test (siehe 3.1.9.3) führte zu klaren Ergebnissen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass ein stufenhafter Untersuchungsaufbau für die Qualitätsbewertung von Bienenspermaproben empfohlen werden kann. Zunächst sollte die Membranintegrität mittels GPI-Test oder Motilitätsanalyse betrachtet werden. Erst wenn weitere Informationen erforderlich sind, sollten die weitaus zeitintensiveren und arbeitsaufwendigeren Untersuchungen zur Unversehrtheit der Akrosomen sowie zum Status des Erbguts erfolgen. Es sei zu erwähnen, dass die hier aufgeführte Methode der Akrosomenmarkierung noch nicht vollständig etabliert ist und weitere Untersuchungen und Überprüfungen erfordert.

3.2. Vorversuche zur Kryokonservierung - Einfluss verschiedener Faktoren auf die Spermivitalität

Für den Erfolg einer Kryokonservierung ist insbesondere die Unversehrtheit der Zellmembran von Bedeutung. Um Defekte an der Plasmamembran zu detektieren, wurde in den folgenden Versuchen das GPI- Aktivitätsverhältnis gemessen. Dieser Test hat den Vorteil, dass er schnell, kostengünstig und mit kleinsten Probenvolumen durchgeführt werden kann.

3.2.1. Eignung verschiedener Kryogefäße

Es wurden verschiedene Kapillaren und Schläuche auf ihre Eignung als Kryogefäß untersucht. Da sowohl für die Vitrifikation als auch für das slow freezing in der Regel eine langsame Abkühlung im jeweiligen Gefriermedium notwendig ist, wurde zunächst geprüft, in welchem Gefäß eine stetige Temperaturreduzierung der mit BSS (ohne Kryoprotektivum) verdünnten Spermaprobe die geringsten Schäden an den Spermien verursacht. Die Spermivitalität wurde anhand der Membranintegrität mit Hilfe der GPI-Aktivitätsmessung ermittelt (siehe Abb. 63).

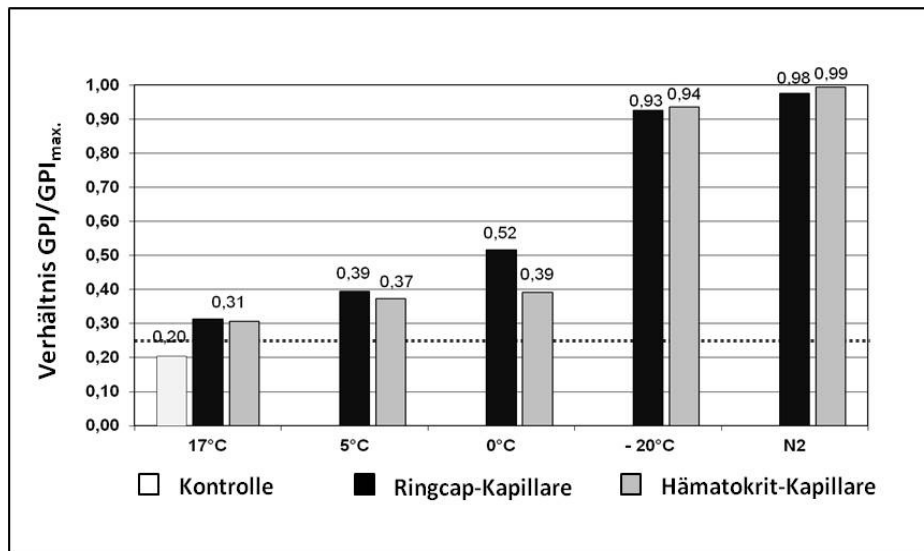


Abb. 63: Membranintegrität (GPI-Test) von Bienenspermien nach schrittweiser Abkühlung und Einfrierung in verschiedenen Kapillaren. 7µl einer 1:10 mit BSS verdünnten Bienenspermien suspension wurden bei 17°C in Kapillaren gefüllt und abgekühlt. Die Abkühlung erfolgte sequentiell durch Aufbewahrung der Proben für 15 Minuten zunächst bei 10°C, dann stufenweise bei 5°C, 0°C, -20°C und letztlich in flüssigem Stickstoff. Nach der Abkühlung wurde die Membranintegrität der Spermien durch Messung der (GPI)-Aktivität bestimmt. Der Kontrollwert stammt von derselben Probe vor Abfüllung in die Kapillaren. Angegeben ist das Verhältnis der Aktivität extrazellulär vor Zerstörung durch Sonifikation zur Gesamtaktivität der GPI in der Probe nach Sonifier-Behandlung. Die gestrichelte Linie gibt den Mittelwert des GPI-Verhältnisses aus 11 unbehandelten Spermienproben wieder.

Ein deutlicher Unterschied zwischen beiden Kapillaren trat erst bei einer Abkühlung auf 0°C auf. Hier zeigten die Hämatokrit-Kapillaren geringere Membranschäden an. Wie erwartet, führte eine Unterkühlung auf -20°C und das anschließende Einfrieren (-196°C) in beiden getesteten Kapillaren zu erheblichen Membranschäden (GPI_{ex}/GPI_{max} -Verhältnis nahe 1).

In der Handhabung ähnelten sich beide Kapillaren. Beide Kapillartypen konnten leicht mit einer Pipettierhilfe (Firma Carl Roth) gefüllt und entleert werden. Allerdings musste man mit der Pipettierhilfe sehr vorsichtig umgehen, um ein unkontrolliertes zu schnelles Füllen und Entleeren zu verhindern. Der Verschluss der Kapillaren erfolgte entweder über das Einziehen von Vaseline an den Kapillarenden oder über Verschweißen. Das Verschweißen musste an den äußersten Enden sehr schnell erfolgen, um eine Temperaturerhöhung in der Probe zu verhindern, was nicht immer gelang. Undichte Gefäße konnten in der Regel erst nach Auftauen der eingefrorenen Proben im Wasserbad festgestellt werden. Eine Verschiebung der Probensäule war ein eindeutiges Zeichen für Undichtigkeit.

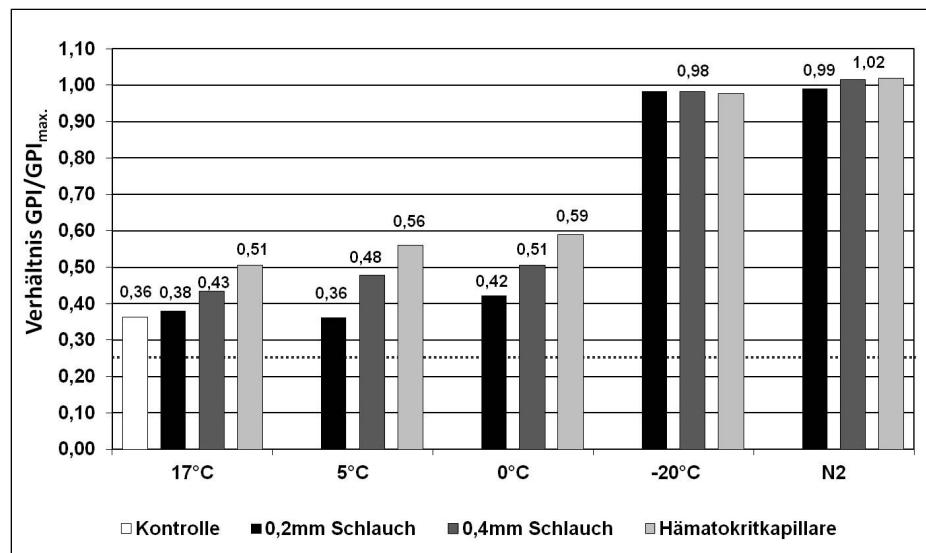


Abb. 64: Membranintegrität (GPI-Test) von Bienenspermien nach schrittweiser Abkühlung und Einfrierung in Kapillaren und Teflonschläuchen. 7µl einer 1:10 mit BSS verdünnten Bienenspermien suspension wurden bei 17°C in Kapillaren bzw. Teflonschläuche gefüllt und abgekühlt. Die Abkühlung erfolgte sequentiell durch Aufbewahrung der Proben für 15 Minuten zunächst bei 10°C, dann stufenweise bei 5°C, 0°C, -20°C und letztlich in flüssigem Stickstoff. Nach der Abkühlung wurde die Membranintegrität der Spermien durch Messung der (GPI)-Aktivität bestimmt. Der Kontrollwert stammt von derselben Probe vor Abfüllung in die Kapillaren. Angegeben ist das Verhältnis der Aktivität extrazellulär vor Zerstörung durch Sonifikation zur Gesamtaktivität der GPI in der Probe nach Sonifizierung. Die gestrichelte Linie gibt den Mittelwert des GPI-Verhältnisses aus 11 unbehandelten Spermienproben wieder.

In einem zweiten Versuch wurden zwei Teflonschläuche, die sich in Innen- und Außendurchmesser sowie Wandstärke unterscheiden mit der besser geeigneten Hämatokritkapillare verglichen (Abb. 64). Während der Abkühlung auf 0°C zeigten die Schläuche, besonders der mit einem geringen Durchmesser, deutlich geringere Membranschäden als die Hämatokritkapillare. Unterkühlung oder Einfrieren bewirkt in allen Gefäßen nahezu vollständigen Verlust der Membranintegrität. Die Anteile membrangeschädigter Spermien waren also bei Abkühlungen im dünnsten Schlauch am niedrigsten und lagen selbst bei 0°C noch nahe des Kontrollwertes der unbehandelten Probe. In der Handhabung zeigte sich vor allem der Teflonschlauch mit einem Innendurchmesser von 0,4mm besonders vorteilhaft. Er ist mithilfe einer Hamiltonspritze oder einer Standardpipette (20µl) mit Pipettenspitze exakt und sauber befüll- und entleerbar. Es zeigte sich, dass beim Entleeren nur Spuren von Bienensperma oder Bienenspermien suspension im Schlauch verbleiben, was deutlich weniger ist als bei den Glaskapillaren. Der dünnere Teflonschlauch ist dagegen nur mit einem unhandlichen Schlauchadapter, der auf einer Hamiltonspritze sitzt, befüll- und entleerbar. Das Verschließen kann bei beiden Schlauchtypen über starkes Zuklemmen mit einer kleinen

Spitzzange schnell und temperaturneutral geschehen. Bei diesem Vorgang muss man jedoch mehrfach zudrücken und auf eine evtl. „Verschiebung“ der Probensäule achten. Zuschweißen ist zusätzlich oder ersatzweise auch möglich. Durch den sehr geringen Schlauchdurchmesser des dünneren Teflonschlauches werden schon für 10µl ca. 31cm Schlauch benötigt, was die Handhabung beim Einfrieren und Auftauen erschwert. Der dickere Teflonschlauch fasst dagegen 10µl in ca. 8 cm, solche Schlauchstücke sind wesentlich handlicher.

Für das Öffnen einer verschweißten Glaskapillare muss diese zunächst angeritzt und anschließend abgebrochen werden, was zu Verletzungen führen kann. Die Teflonschläuche werden dagegen einfach geöffnet, indem die verschlossenen Enden mittels Seitenschneider abgeschnitten werden. Insgesamt stellte sich somit der Teflonschlauch mit 0,4mm Innendurchmesser als besonders praktikabel heraus, außerdem ist seine Anschaffung kostengünstig und sein Material auch für Tiefsttemperaturen gut geeignet. Für die Vitrifikationsversuche wurde zusätzlich auch handelsübliche Alufolie als mögliches Kryogefäß getestet, da diese eine besonders gute Temperaturleitfähigkeit besitzt. Allerdings besitzt Alufolie einige Nachteile, zum Beispiel wird die Probe nicht verschlossen, was eine Kontamination möglich macht. Außerdem ist die Handhabung der Probe, welche nur als Tropfen auf der Alufolienoberfläche sitzt, recht schwierig, weshalb dieses Trägermaterial nur ansatzweise getestet wurde.

3.2.2. Toxizität von DMSO

Das Kryoprotektivum DMSO wird für die Konservierung vieler Zell- und Gewebstypen genutzt und spielt auch in der Kryokonservierung von Bienenspermien eine wichtige Rolle. Neben der schützenden Wirkung besitzt DMSO aber auch negative toxische sowie mögliche mutagene Eigenschaften. So berichtet Harbo (1986) von einer durch DMSO verursachten Unfruchtbarkeit bei Bienen-Königinnen, die aus DMSO-haltigem Sperma entstanden sind. Dennoch wurde DMSO lange Zeit als einzige schützende Substanz bei der Kryokonservierung von Drohnenspermien eingesetzt (Hopkins und Herr, 2010; Taylor et al., 2009) ohne die mögliche Toxizität weiter zu beleuchten. Erst im Zuge des vorgestellten Projektes wurden die Auswirkungen von DMSO auf Bienenspermien und den Besamungserfolg näher betrachtet. Es wurden mehrere *in vitro* Analysen durchgeführt, um mögliche schädigende Wirkungen von DMSO auf Bienenspermien erfassen und besser beurteilen zu können. Außerdem fanden am LIB Hohen Neuendorf ergänzende

Besamungsversuche statt, um auch *in vivo* Daten in die Beurteilung der DMSO-Toxizität einzubeziehen (siehe 3.2.2.4.).

3.2.2.1 Einfluss von DMSO auf die Motilität

Es wurde der Einfluss von DMSO auf die Motilität der Bienenspermien untersucht. Dafür wurde Bienensperma mit 0%, 10% und 30% (v/v) DMSO, sowie 5 μ M H342 versetzt und anschließend am Fluoreszenzmikroskop analysiert. In Abb. 65A-C zeigen typische Bildausschnitte zu jeder DMSO-Konzentration. Die Ergebnisse der Auszählung sind zusammenfassend in Tab. 29 aufgelistet.

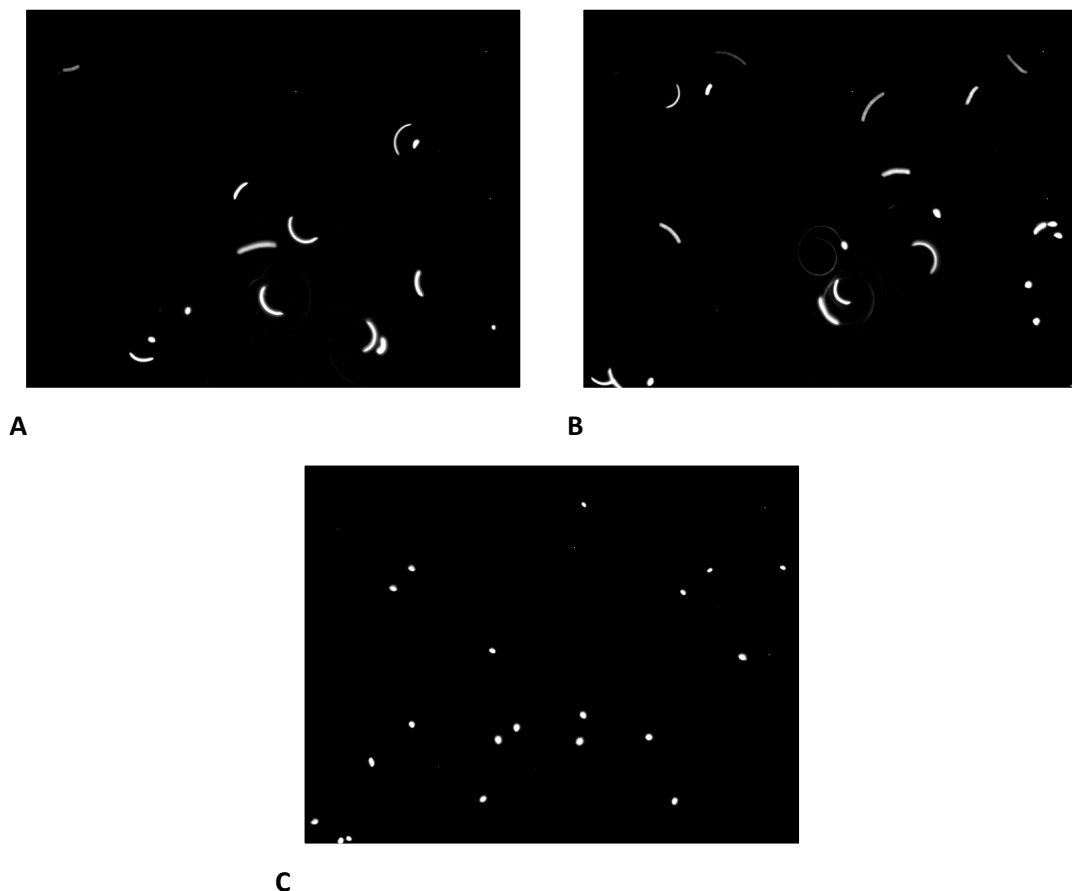


Abb. 65: Mit langer Integrationszeit aufgenommene Fluoreszenzaufnahmen von H342-markierten Bienenspermien mit einer DMSO-Konzentration von 0% (A), 10% (B) und 30% (v/v). Die Spermisuspensionen wurden vor mikroskopischer Untersuchung mit H342 (5 μ M Endkonz.) versetzt und 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Aufnahmen wurden mit einem 20-fach Objektiv und dem Leica Filtercube A erstellt. Die Integrationszeit betrug 2000ms. Motile Spermien erzeugen Lichtstreifen, während unbewegliche Spermien nur Lichtpunkte hervorrufen.

Während sich ohne und mit 10% (v/v) DMSO-Zusatz viele Spermien bewegten, waren in der Probe mit 30% DMSO nahezu alle Spermien immotil. Die Auszählung von über 200 Spermien pro DMSO-Probe bestätigt den optischen Eindruck. In den Proben mit 10% DMSO

(v/v) und ohne DMSO sind 69% bzw. 65% der Bienenspermien motil, während in der Probe mit 30% DMSO nur 1,2% bewegliche Zellen gezählt wurden.

Tab. 29: Anteil motiler und immotiler Bienenspermien in Proben mit unterschiedlichen DMSO-Konzentrationen

Puffer	ohne DMSO		10% DMSO		30%DMSO	
gesamt	262		220		333	
	motil	immotil	motil	immotil	motil	immotil
Anzahl	171	91	152	68	4	329
Prozent	65,3%	34,7%	69,1%	30,9%	1,2%	98,8%

3.2.2.2 Einfluss von DMSO auf die Membranintegrität

Um zu prüfen, ob DMSO die Membranintegrität von Bienenspermien beeinflusst, wurde Bienensperma mit 10% und 30% (v/v) DMSO versetzt, bei Raumtemperatur für 5 bzw. 30 min inkubiert und die Integrität der Plasmamembran durch Messung der GPI-Freisetzung beurteilt. Als Kontrolle diente eine DMSO-freie Bienenspermaprobe gleicher Verdünnung. Die Ergebnisse der GPI-Messungen sind in Abb. 66 graphisch zusammengefasst. Der niedrigste Anteil membrangeschädigter Spermien (niedriges $GPI_{ex.}/GPI_{max.}$ -Verhältnis) war sowohl nach 5 als auch nach 30 min Inkubation in der 10%ige DMSO-Probe zu finden. Mit 11% nach 5minütiger Inkubation und 15 % nach 30 min Lagerung lag diese Probe sogar unter den Werten der Kontrolle, also der Probe ohne DMSO-Gehalt. In der Probe mit 30% (v/v) DMSO wurden dagegen für beide Inkubationszeiten deutlich höhere Werte für das $GPI_{ex.}/GPI_{max.}$ -Verhältnis ermittelt, d.h., in dieser Probe waren verhältnismäßig mehr geschädigte Spermien. Nach einer 5 minütigen Inkubation wiesen 27% der Spermien Membranschäden auf und nach 30 Minuten 34%. So wie in den DMSO-haltigen Proben nahm mit zunehmender Inkubationszeit auch in den Kontrollproben der Anteil geschädigter Spermien stetig zu. Allerdings fiel die Zunahme mit 10% (v/v) DMSO-Anteil schwächer aus.

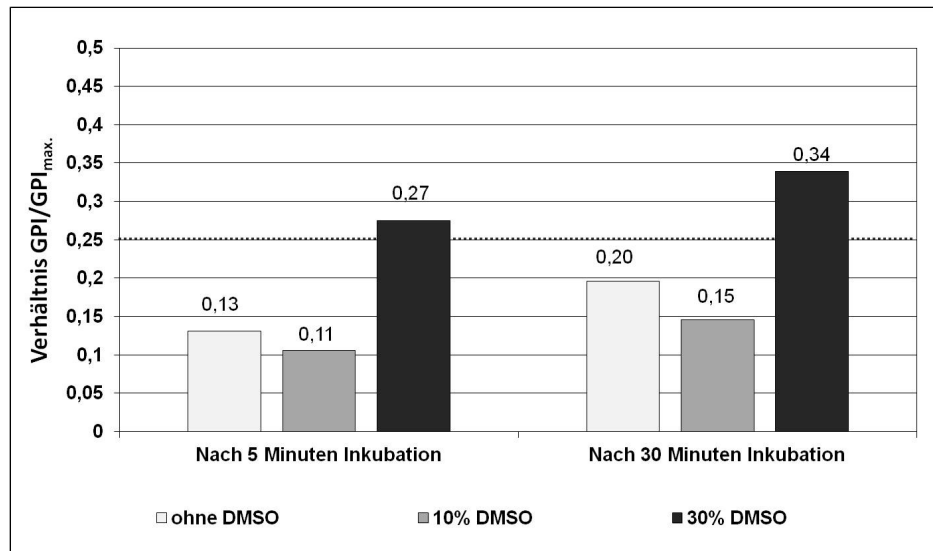


Abb. 66: Membranintegrität (GPI-Test) von Bienenspermien nach 5, bzw. 30 minütiger Inkubation mit unterschiedlichen DMSO-Gehalten. Es wurden die GPI-Aktivitäten von Bienenspermienproben mit 10%, 30% (v/v) und ohne DMSO-Zusatz nach 5 und 30 minütiger Lagerung in Raumtemperatur gemessen. Angegeben wird stets das Verhältnis der gemessenen GPI-Aktivitäten in derselben Probe vor und nach Sonifier-Behandlung. Die gestrichelte Linie gibt den Mittelwert des GPI-Verhältnisses aus 11 unbehandelten Spermienproben wieder.

3.2.2.3 Einfluss von 10% DMSO auf die DNA

Nachdem sich bei der Testung von Motilität und Membranintegrität gezeigt hatte, dass 30% DMSO die Bienenspermien negativ beeinflusst, wurde die Prüfung von DNA-Schäden (TUNEL-Test) auf Proben mit 10% DMSO-Zusatz beschränkt. Von 4 Bienenproben wurden Aliquots mit und ohne 10% (v/v) DMSO 60 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend auf DNA Schäden getestet. Der Anteil DNA-fragmentierter Spermien war in allen Proben sehr gering (siehe Abb. 67), er lag zwischen 1,07% und 1,33%. In den Proben 2 und 3 ist kein Unterschied zwischen den DMSO-haltigen und -freien Aliquots zu verzeichnen. In dem DMSO-haltigen Aliquot der Probe 1 besitzen 0,07% mehr Spermien fragmentierte DNA, in Probe 4 in dem DMSO-haltigen Aliquot sind dagegen 0,04% weniger Spermien geschädigt. Insgesamt sind die Differenzen sehr gering und lassen keine Tendenz erkennen.

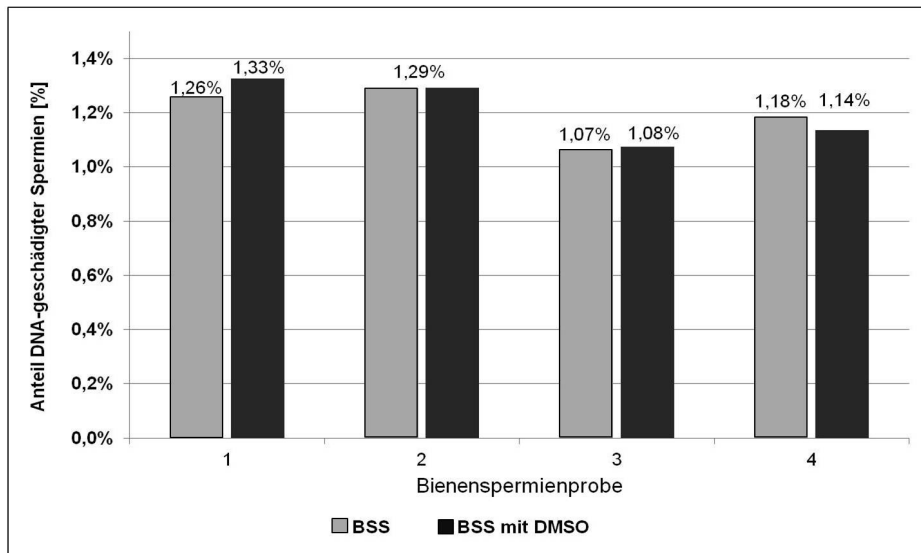


Abb. 67: DNA-Integrität in DMSO-freien und –haltigen Bienenspermienproben. Bienensperma wurde mit BSS bzw. mit DMSO-haltigem BSS (10% (v/v) Endkonzentration) 1:2-fach verdünnt und nach 60 minütiger Inkubation bei Raumtemperatur mittels TUNEL-Test analysiert. Anhand der aufgenommenen Fluoreszenz- und Phasenkontrastbilder wurde der Prozentsatz DNA-geschädigter Spermien bestimmt.

3.2.2.4 Einfluss von DMSO auf den Füllungsgrad der Spermatheka

Parallel zu den *in vitro*-Tests fanden beim Kooperationspartner (LIB in Hohen Neuendorf) Besamungsversuche mit DMSO-haltigem Bienensperma statt. Es wurde getestet, ob und wie stark eine DMSO-Konzentration von 10% (v/v) im versamten Sperma den Füllungsgrad der Spermatheka beeinflusst. Jeweils 4 Königinnen wurden mit unbehandeltem und DMSO-haltigem Sperma inseminiert. Nach 6 Tagen in ihren Kleinstvölkern wurden sie dann getötet und die Anzahl der Spermien in den Spermatheken gezählt (Abb. 68).

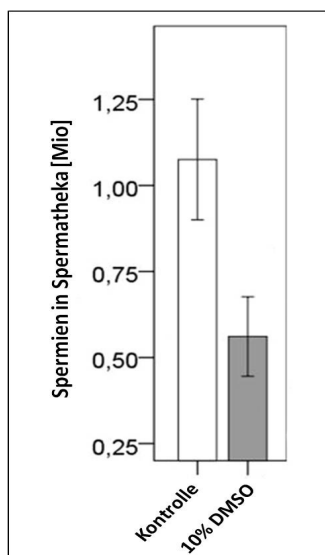


Abb. 68: Effekt der Beimischung DMSO auf den Füllungsgrad der Spermatheka zur Beurteilung der Toxizität. Gepooltes Bienensperma wurde aliquotiert und mit DMSO-freiem BSS bzw. mit DMSO-haltigem BSS gemischt. Die DMSO-Konzentration betrug 10% (v/v). Es wurden je 4 Königinnen mit unbehandeltem und DMSO-haltigem Sperma besamt und nach 6 Tagen die Spermienzahlen in den Spermatheken ermittelt. (Wegener und Bienefeld, 2011)

Normalerweise, wie auch die Kontrolle in Abb. 68 zeigt, sind in einer Spermatheka 6 Tage nach Besamung deutlich über 1 Mio. Spermien zu finden. Wurde dem Sperma vor Besamung jedoch 10% (v/v) DMSO zugesetzt, so ist nur knapp die Hälfte der Spermien in den Spermatheken nachweisbar. Dieses *in vivo* Ergebnis spricht dafür, dass sich auch schon eine DMSO-Konzentration von 10% (v/v) negativ auf den Besamungserfolg auswirkt.

3.2.3. Trehalose als zusätzliches Protektivum

In Abkühlungsversuchen wurde getestet, ob der nicht reduzierende Zucker Trehalose einen positiven Einfluss auf die Vitalität der Bienenspermien ausübt und evtl. die schädigende Wirkung des DMSOs reduzieren kann. Dafür wurde Bienensperma mit BSS, dem unterschiedliche Trehalose- und DMSO-Konzentrationen zugesetzt waren, gemischt und mit 0,33°C/min von anfänglichen 23°C auf 5°C abgekühlt. Anschließend wurde die Spermiovitalität mittels GPI-Messung bestimmt (Abb. 69).

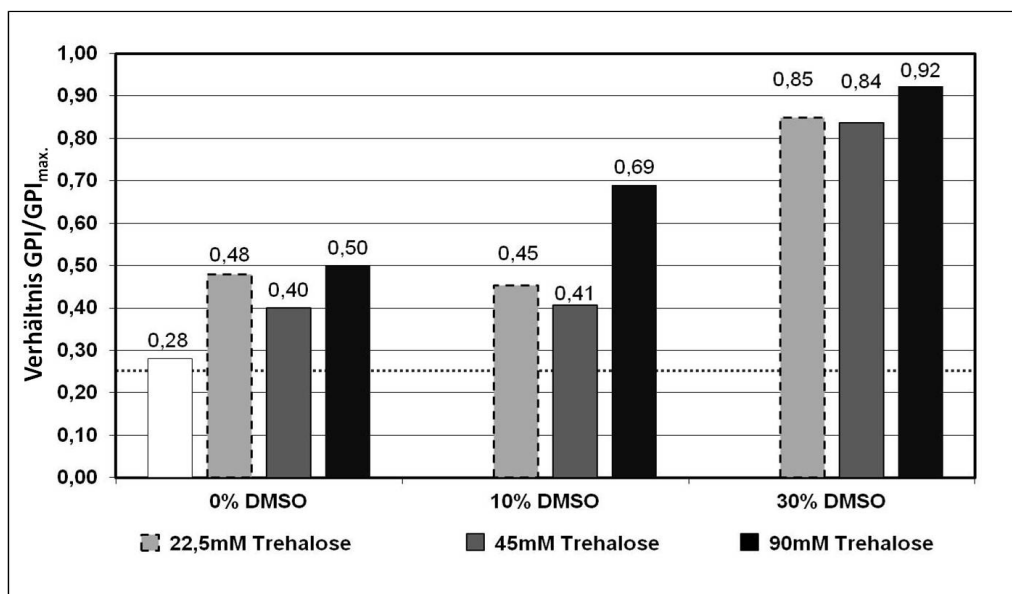


Abb. 69: Membranintegrität (GPI-Test) von Bienenspermien nach langsamer Abkühlung auf 5°C mit verschiedenen Trehalose- und DMSO-Zusätzen. Bienensperma wurde mit BSS, dem unterschiedliche Mengen DMSO und Trehalose zugesetzt wurden, im Verhältnis 1: 4 verdünnt und mit 0,33°C/min auf 5°C abgekühlt. Die Kontrolle (weisse Säule) enthielt weder DMSO noch Trehalose und wurde vor Abkühlung gemessen. Angegeben ist das Verhältnis der Gesamtaktivität der GPI in der Probe nach Sonifier-Behandlung zur Aktivität extrazellulär vor Zerstörung durch Sonifier. Die gestrichelte Linie gibt den Mittelwert des GPI-Verhältnisses aus 11 unbehandelten Spermienproben wieder.

Betrachtet man die Ergebnisse, die in Abb. 69 dargestellt sind, so fällt auf, dass alle Proben mit 30% (v/v) DMSO vergleichsweise hohe $GPI_{ex.}/GPI_{max.}$ -Verhältnisse aufwiesen, d.h. viele geschädigte Spermien enthielten (84-92%). Auch die Proben mit einem höheren

Trehalosegehalt von 90mM wiesen relativ zu ihren Vergleichsproben mit weniger Trehalose und unabhängig von der DMSO-Konzentration einen höheren Anteil geschädigter Spermien auf. Die kleinsten $GPI_{ex.}/GPI_{max.}$ -Verhältnisse zeigten die Proben mit 45mM Trehalose und 0% oder 10% DMSO. Mit 40% und 41% enthielten sie die geringsten Anteile geschädigter Spermien. Ein niedrigerer Trehalosegehalt (22,5mM) resultierte dagegen in mehr geschädigten Spermien.

3.2.4. Einfluss unterschiedlicher Probenvolumen

Neben der Zusammensetzung des Verdünners, ist es denkbar, dass auch das Probenvolumen einen Einfluss auf die Membranintegrität haben könnte. Nicht zuletzt, da sich mit steigender Probenmenge das Verhältnis von Grenzfläche zum Volumen verringert. Es ist davon auszugehen, dass die Zellen der Grenzfläche stärker unter oxidativen Stress stehen, als Zellen im Probeninneren, da sie direkten Kontakt zur umgebenden Luft besitzen. Um dieser Theorie nachzugehen, wurde gepooltes Bienensperma 1:4 mit Trehalosehaltigem BSS verdünnt und in Proben mit verschiedenen Volumina (4 μ l und 10 μ l) aufgeteilt. Nach langsamer Abkühlung mit 0,33 $^{\circ}$ C/min auf 5 $^{\circ}$ C wurde die Membranintegrität mittels GPI-Messung ermittelt (Abb.70).

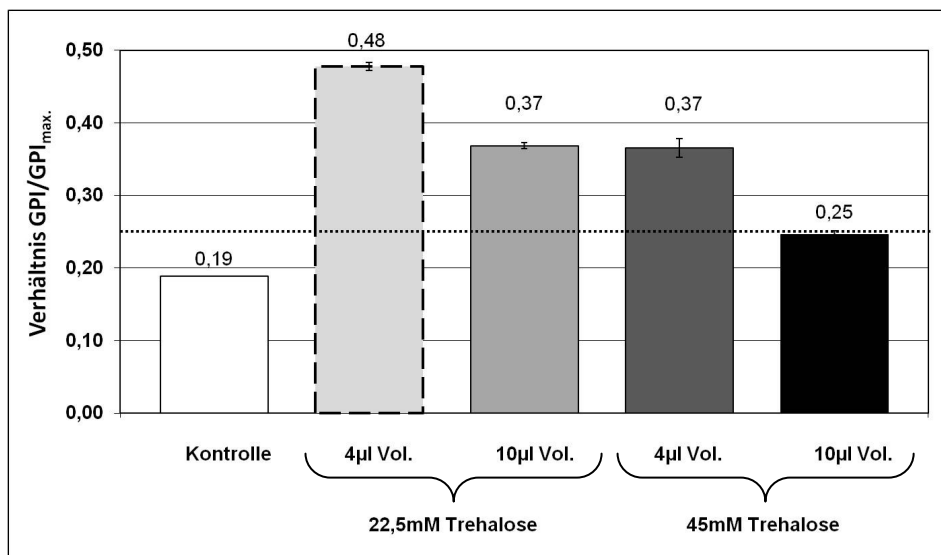


Abb. 70: Membranintegrität (GPI-Test) von Bienenspermien nach langsamer Abkühlung auf 5 $^{\circ}$ C in verschiedenen Probenvolumina und mit unterschiedlichen Trehalosekonzentrationen. Der Kontrollwert (weisse Säule) stammt von derselben Probe vor Trehalosezugabe und Abkühlung. Angegeben ist das Verhältnis der Gesamtaktivität der GPI in der Probe nach Sonifier-Behandlung zur Aktivität extrazellulär vor Zerstörung durch Sonifier. Die gestrichelte Linie gibt den Mittelwert des GPI-Verhältnisses aus 11 unbehandelten Spermienproben wieder. Die Proben waren 1:4 mit BSS (30mM Trehalose) bzw. BSS mit 60mM Trehalose verdünnt. beide BSS-Puffer hatten eine Osmolalität von 450mOsmol/Kg.

Wie Abb. 70 zeigt, wurden in den Aliquot mit kleinem Probenvolumen von 4 μ l im Laufe der Abkühlung mehr Spermien geschädigt, als in den Aliquots mit 10 μ l Probenvolumen. Dieser Umstand ist an den höheren $GPI_{ex.}/GPI_{max.}$ - Verhältnissen der kleineren Proben erkennbar. Die Proben mit mehr Trehalose (45mM) wiesen weniger geschädigte Spermien auf als die entsprechenden Proben mit 22,5mM Trehalose. Kleine Volumina scheinen einen negativen Einfluss auf die Spermiovitalität auszuüben, und ein Trehalosegehalt von 45mM besitzt offensichtlich eine schützende Wirkung auf Bienenspermien.

3.2.5. Einfluss der Osmolalität

Ein weiterer wichtiger Faktor bei der Erstellung eines geeigneten Verdünnungs-, bzw. Einfriermediums ist die Osmolalität. Die Osmolalität des bislang verwendeten BSS-Puffers betrug 450mOsmol/Kg, diese wurde vor allem durch Reduzierung des Natriumcitrats auf 320mOsmol/kg verringert (BSS+) ohne die Trehalosekonzentration von 60mM zu verändern. Der Effekt beider BSS-Lösungen und des Kiev-Puffers auf die Stabilität der Bienenspermien-Plasmamembran (GPI-Test) während einer Abkühlungsphase wurde getestet (Abb. 71).

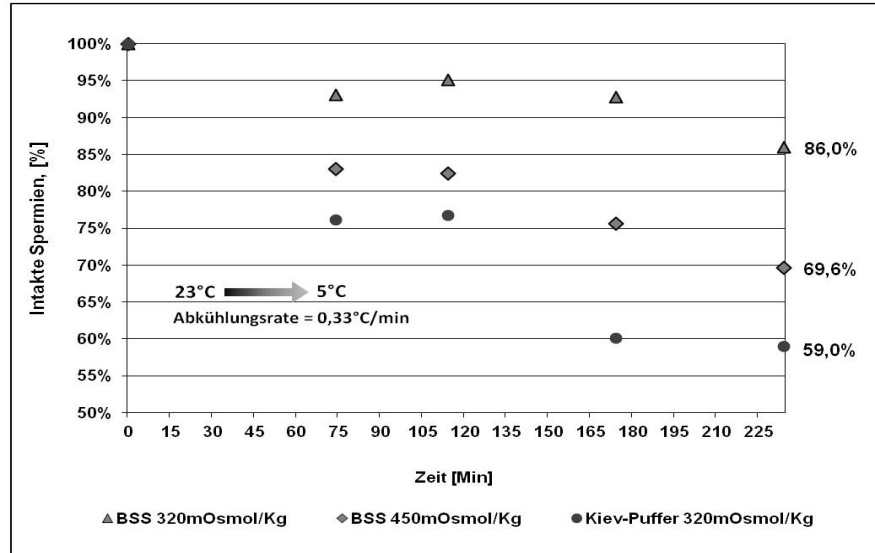


Abb. 71: Membranintegrität (GPI-Test) von Bienenspermien vor und nach langsamer Abkühlung sowie nach 3h Inkubation bei konstant 5°C. Die Proben wurden 1:2 mit Kiev-Puffer; BSS mit 450mOsmol/Kg und BSS+ (320mOsmol/kg) verdünnt. Beide BSS-Puffer enthielten 60mM Trehalose. Die Proben wurden mit 0,33°C/min auf 5°C abgekühlt und danach 3h lang konstant bei 5°C gehalten. Die Referenzwerte (100% jeder Probe) stammten von den entsprechenden Proben vor Abkühlung. Angegeben sind die prozentualen Anteile (membran-) intakter Spermien, die mittels GPI-Test ermittelt wurden.

Die Ergebnisse (siehe Abb. 71) machen deutlich, dass sowohl die Zusammensetzung als auch die Osmolalität des Verdünnungspuffers eine große Rolle bei der Erhaltung der Spermivitalität spielt. Im BSS+ mit einer Osmolalität von 320mOsmol/kg blieb der Anteil intakter Spermien wesentlich konstanter als im Kiev-Puffer gleicher Osmolalität oder im BSS mit höherer Osmolalität (450mOsmol/kg). Nach Abkühlung und 3-stündiger Lagerung bei 5°C war die Membranschädigung in BSS mit 450mOsmol/Kg deutlich niedriger (nur 14%) als in BSS+ (30%) oder im Kiev-Puffer (41%).

3.3. Vitrifikationsversuche

Bei einer Vitrifikation sind hohe Kryoprotektiva-Konzentrationen erforderlich. Konzentrationen von $\geq 30\%$ DMSO oder anderer Schutzstoffe sind gebräuchlich. Die vorangegangenen Tests haben aber gezeigt, dass Bienenspermien durch entsprechend hohe DMSO Konzentrationen geschädigt werden und der Besamungserfolg verringert ist. Da die chemisch bedingte DMSO-Toxizität aber temperaturabhängig ist (Pegg, 2002;), also durch Temperaturabnahme verringert werden kann, wurde geprüft, ob eine Abkühlung der verdünnten Spermiesuspension vor Erhöhung der DMSO-Konzentration auf 30% weniger Membranschäden hervorruft (Abb. 72).

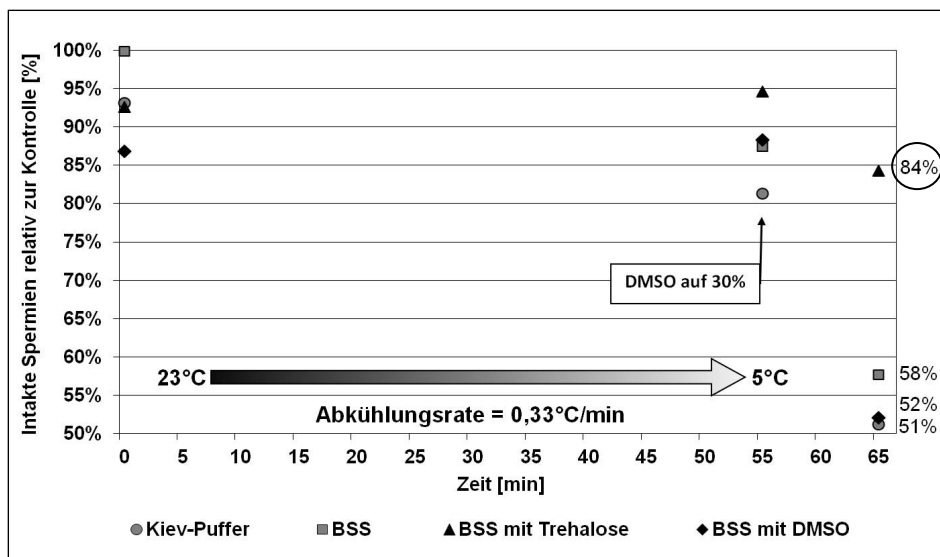


Abb. 72: Änderung der Membranintegrität (GPI-Test) von Bienenspermien während langsamer Abkühlung und anschließender Inkubation mit 30% (v/v) DMSO. Die Proben wurden 1:2 mit Kiev-puffer; BSS+ (60mM Trehalose; 320mOsmol/Kg), BSS oT (ohne Trehalose) und BSS ohne Trehalose und mit 20% (v/v) DMSO verdünnt. Anschließend wurden sie mit 0,33°C/min auf 5°C abgekühlt, und mit DMSO (30% v/v Endkonzentration) weitere 15 min bei 5°C inkubiert. Der Referenzwert (100%) stammte vom selben Bienenspermienpool vor Aufteilung. Angegeben ist der prozentuale Anteil intakter Membranen (GPI-Test).

Vor Abkühlung der verdünnten Spermaproben zeigte nur die Probe ohne DMSO und Trehalose (BSS oT) keine Membranschäden. Die mit Kiev-Puffer verdünnten Proben und die mit Trehalose- bzw. DMSO-haltigem BSS-Puffer verdünnten Proben zeigten eine geringfügige Abnahme intakter Spermien (92%). In der DMSO-haltigen BSS -Probe (10% v/v) lag der Wert deutlich unter 90%. Während der Abkühlung veränderte sich der Anteil intakter Spermien in den Proben mit 10%DMSO (BSS ohne Trehalose aber mit DMSO) oder Trehalose (BSS+) nicht wesentlich. Ohne Trehalose oder DMSO (Kiev und BSS oT) sank dagegen der Anteil intakter Spermien deutlich. Nach Erreichen der 5°C wurde allen Proben DMSO (Endkonzentration 30%) zugemischt und nach 15minütiger Inkubation bei 5°C erneut der GPI-Test durchgeführt. Bis auf die Probe mit 60mM Trehalose (BSS+) bewirkte die DMSO-Zugabe einen erheblichen Verlust intakter Spermien (<60%).

3.3.1. Einsatz unterschiedlicher Kryoprotektiva

Die bisherigen Ergebnisse zeigen deutlich, dass der Einsatz von DMSO als Kryoprotektivum für die Kryokonservierung von Bienenspermien problematisch ist. Deshalb wurde nach alternativen Schutzstoffen gesucht, die DMSO ganz oder teilweise ersetzen könnten. Dass die Kombination aus DMSO und einem weiteren Kryoprotektivum weniger toxisch wirken kann und deshalb vorteilhafter ist als die gleiche Konzentration der Einzelstoffe, beweist ein Besamungsversuch, der am LIB Hohen Neuendorf durchgeführt wurde (Abb. 73). Bei diesem Experiment wurden Bienenköniginnen mit Sperma besamt, das zuvor mit unterschiedlichen Kombinationen aus DMSO und Ethylenglykol (EG) versetzt wurde. Je Konzentrations-Kombination wurden 4 Königinnen besamt und 6 Tage in ihren Kleinstvölkern belassen. Anschließend wurden die Tiere getötet und die Anzahl der Spermien in den Spermatheken gezählt. Weitere Methodendetails werden unter 2.5.2. gegeben.

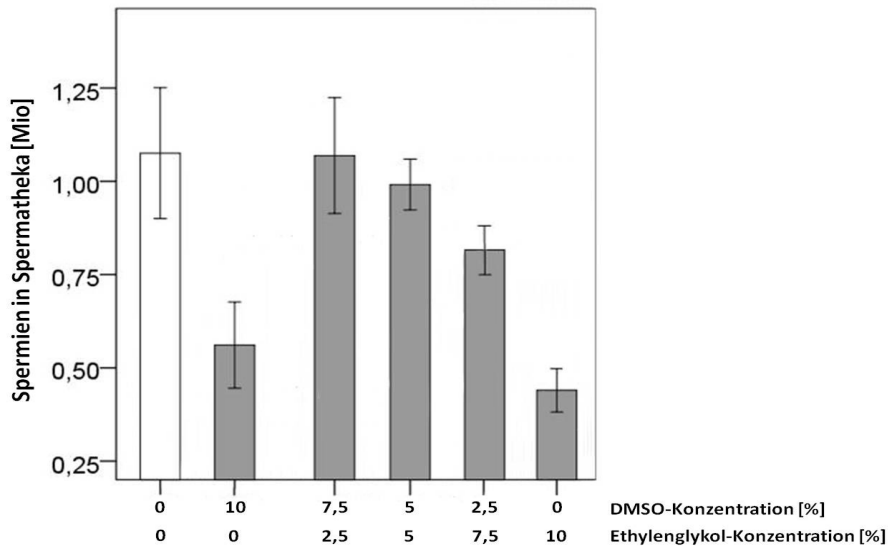


Abb. 73: Effekt der Beimischung von Ethylenglykol und/oder DMSO auf den Füllungsgrad der Spermatheka zur Beurteilung der Giftigkeit des wichtigsten Kryoprotektivums DMSO. Gepooltes Bienensperma wurde aliquotiert und mit DMSO (D) und/oder Ethylenglykol (EG) gemischt. Die Substanzkonzentration betrug bei variierender Aufteilung insgesamt immer 10% (v/v). Es wurden 4 Königinnen je Substanzaufteilung besamt. Nach 6 Tagen wurden die Spermienzahlen in den Spermatheken ermittelt. Als Kontrolle dienten 4 Königinnen, die mit reinem Sperma gleicher Verdünnung besamt wurden (Wegener und Bienefeld, 2011).

6 Tage nach einer Besamung mit unbehandeltem Bienensperma enthalten die Spermatheken der Bienenköniginnen durchschnittlich deutlich mehr als 1 Mio. Spermien. Eine vorherige Zugabe von 10% (v/v) DMSO oder EG zum Sperma, führt jedoch zu einer drastischen Verringerung der Spermienzahlen, die es in die Spermatheken schaffen. Dabei ist der Einfluss von EG sogar noch stärker als von DMSO, mit diesem Zusatz schaffen es nicht einmal 500.000 Spermien in die Spermatheka. Kombiniert man jedoch die beiden Kryoprotektiva, wobei man die Gesamtkonzentration konstant hält, so ist der negative Effekt nur abgeschwächt festzustellen. Der Konzentrationsverteilung kommt dabei eine wichtige Rolle zu. Die Kombination aus 7,5% (v/v) DMSO und 2,5 (v/v) EG erwies sich als besonders vorteilhaft, da sie keine negative Auswirkung erkennen ließ.

Die Ergebnisse dieses Versuches waren sehr vielversprechend, weshalb für die Vitrifikationsversuche neben DMSO und Trehalose noch weitere Substanzen mit bekannter kryoprotektiver Wirkung untersucht und in verschiedenen Konzentrationen und Kombinationen eingesetzt wurden, darunter auch EG. Mit diesen Substanzen und Kombinationen wurden verschiedene Vitrifikationsmethoden durchgeführt mit und ohne vorherige langsame Abkühlung und komplette oder teilweise Zugabe der Kryoprotektiva zu Beginn bei Raumtemperatur oder nach Abkühlung. Zur Beurteilung der Spermienvitalität wurde die Membranintegrität, ermittelt mit Hilfe der GPI-Messung, zu Rate gezogen.

Sowohl der Einsatz von Saccharose als auch der großmolekularer Polysaccharide (Ficoll und Dextran 10000) zeigte keinen schützenden Effekt unabhängig der verwendeten Konzentration oder Kombination mit anderen Kryoprotektiva. Auch mit dem Einsatz von Ethylenglykol, das im Besamungsversuch DMSO zum Teil ersetzen konnte, gelang es nicht Bienenspermien besser abzukühlen oder erfolgreich einzufrieren. Der Einsatz des weit verbreiteten Kyroprotektivums Glycerin brachte ebenso wenig einen Erfolg. Zusätzlich zu diesen Substanzen wurde auch ein Vitrifikationskit der Firma Fertipro verwendet, dieses wurde für humane Oocyten und Embryonen (2PN-8 Zellstadium) entwickelt und zeigte mit Bienenspermien kein positives Ergebnis. Die Ergebnisse der Abkühl- und Vitrifikationstests mit verschiedenen kryoprotektiven Substanzen ist in Tab. 30 zusammengefasst, wobei darauf verzichtet wird, alle Versuche im Detail zu beschreiben, bzw. deren Resultate aufzulisten. Die am LIB Hohen Neuendorf erarbeiteten Resultate bezüglich eines DMSO-Ersatzstoffes für die Vitrifikation von Bienenspermien bestätigten die hier durchgeführten *in vitro* Tests.

Tab. 30: Zusammenfassung umfangreicher Abkühlungs- und Vitrifikationsversuche mit unterschiedlichen Kryoprotektiva.

Kryoprotektivum	Konzentrationen/ Kombinationen	Ergebnisse	
		Abkühlversuche	Vitrifikationsversuche
Dextran 10000	5-20% (w/v) mit Ficoll, DMSO und EG kombiniert	Keinen positiven Effekt (ab ca. 20% negativer Effekt)	nicht erfolgreich
Ficoll	5-20% (w/v) mit Dextran, DMSO und EG kombiniert	keinen positiven Effekt (ab ca. 20% negativer Effekt)	nicht erfolgreich
Saccharose	0,5-1,5M mit DMSO, Glycerin und EG kombiniert	keinen Effekt	nicht erfolgreich
Glycerin	5-30% (v/v) mit DMSO, EG und Saccharose kombiniert	keinen Effekt	nicht erfolgreich
Ethylenglykol	2,5-30% (v/v) mit DMSO, Dextran, Ficoll, Saccharose und Glycerin kombiniert	keinen Effekt	nicht erfolgreich

Vitrifikationskit (Firma Fertipro)	---	nicht durchgeführt	nicht erfolgreich
---------------------------------------	-----	--------------------	-------------------

Da die Vitrifikation kein brauchbares Ergebnis lieferte, wurde versucht, ein slow Freezing-Protokoll zu erarbeiten.

3.4. Entwicklung eines Slow Freezing-Protokolles

Im Gegensatz zur Vitrifikation kann man beim Slow Freezing mit relativ niedrigeren Kryoprotektiva-Konzentrationen arbeiten. Durch Unterkühlung versucht man die extrazelluläre Eiskristallbildung kontrolliert durchzuführen, so dass es in der Umgebung der Zellen zur Aufkonzentrierung der gelösten Substanzen kommt. Hierdurch steigt die Konzentration der Kryoprotektiva während der Unterkühlung und verhindert die Zellschädigung beim Einfrieren. Abkühlrate, Art und Konzentration des Kryoprotektivums, Auftaurate und Zusammensetzung des Kryopuffers müssen optimal auf den Zelltyp eingestellt sein.

3.4.1. Einsatz unterschiedlicher Kryoprotektiva

Neben dem BSS+ mit 60mM Trehalose und einer Osmolalität von 320mOsmol/Kg wurden auch PBS, eine künstliche Hämolymphe und eine künstliche Spermathekaflüssigkeit als mögliche Kryopuffer mit den kryoprotektiven Substanzen DMSO, 1,3-Propandiol (PD), Saccharose, Dimethylacetamid (DMAA), Harnstoff und Hydroxyectoin (HE) getestet (Tab. 31 – 33).

Tab. 31: Prozentualer Anteil der Membranintegrität von Bienenspermien in verschiedenen Kryolösungen vor und nach Slow Freezing (Abkühlungsrate ca. 3,3°C/min, Methode s. 2.6.1.).

Datum des Versuchs	Kryo - Puffer	Messung vor Abkühlung	Nach 1h in -20°C	Nach 3h in -20°C
24.05 2011	BSS+ 10% DMSO	100,5%	89% ± 4,0	81% ± 6,8
	PBS 10% DMSO	94,0%	49% ± 10,8	31% ± 7,0
	künstl. Theka 10% DMSO	89,5%	47% ± 5,7	56% ± 0,7

24.05 2011	künstl. Hämol. 10% DMSO	93,0%	17% ± 8,2	35% ± 3,2
26.05 2011	BSS+ 10% DMSO	99,2%	71% ± 6,9	69% ± 7,8
	PBS 5% DMSO 5% PD	96,4%	76% ± 3,0	62% ± 2,1
	PBS 5% DMSO 0,7mM Urea	99,0%	37% ± 5,3	32% ± 4,7
	PBS 5% DMSO 0,7mM Saccharose	94,3%	28% ± 8,2	31% ± 4,8
				nach 24h bei - 20°C
20./21.06 2011	BSS+ 10% DMSO	84,3%	80% ± 5,4	84% ± 2,4
	Theka 10% DMSO	86,3%	48% ± 2,1	40% ± 4,2
20./21.06 2011	PBS 5%DMSO, 5% PD	89,8%	45% ± 2,8	38% ± 2,2
	PBS 10% Dimethylacetamid	68,5%	40% ± 4,6	34% ± 10,3

Die geringsten Schäden an den Membranen wurden im BSS+Medium erzielt (Prozentsatz der Membranintegrität >80%). Der Versuch, DMSO teilweise durch Harnstoff (Urea), Saccharose oder 1,3-Propandiol (PD) zu ersetzen, brachte keine Verbesserung (Tab. 31; Versuch 26.05.2011). Sowohl Harnstoff als auch Saccharose erwiesen sich als ungeeignet. Die Wirkung von PD wurde in weiteren Versuchen überprüft. Der vollständige Ersatz von DMSO durch Dimethylacetamid (DMAA) verbesserte das Slow Freezing nicht.

Die Empfindlichkeit dieses Einfrierverfahren deutet sich in den Schwankungen der Messdaten an. Es ist sehr unwahrscheinlich, dass der Anteil intakter Spermien mit der Lagerungsdauer zunimmt, was einigen Proben suggerieren. Dieses Phänomen erklärt sich wahrscheinlich dadurch, dass bereits kleine Unterschiede in der Durchführung des Slow Freezings große Effekte bewirken. Hinzu kommt die relativ hohe natürliche Variabilität zwischen den Proben. Um in den weiteren Untersuchungen die hohe Variabilität auch zwischen gepoolten Bienensperma zu berücksichtigen, wurde stets eine Probe im BSS+ mit 10% DMSO als Referenz gemessen.

Tab. 32: Membranintegrität von Bienenspermien vor und nach Slow Freezing in verschiedenen Kryolösungen und 7-tägiger Lagerung bei -20°C.

Datum des Versuchs	Kryo - Puffer	Messung vor Abkühlung	1. Messung nach Abkühlung auf -20°C (nach ca. 1h)	Nach 7 Tagen -20°C
27.06 2011	BSS+ 10% DMSO	101,8%	62% ± 2,4	
	BSS+ 5% DMSO 0,5M HE	102,6%	22% ± 3,8	
	BSS+ 1M HE	89,7%	40% ± 2,0	
28.06/ 05.07 2011	BSS+ 10% DMSO, ohne HE	100,0%	83% ± 5,6	55% ± 4,9
	BSS+ 10% DMSO, 10µM HE	100,1%	69% ± 1,9	55% ± 3,1
	BSS+ 10% DMSO, 100µM HE	80,7%	81% ± 2,2	62% ± 3,7
	BSS+ 10% DMSO, 250µM HE	96,4%	73% ± 3,1	61% ± 4,5
28.06/ 05.07 2011	BSS+ 10% DMSO, 500µM HE	75,2%	61% ± 3,8	50% ± 6,4
	BSS+ 10% DMSO, 1mM HE	76,5%	59% ± 3,2	56% ± 3,7
	BSS+ 10% DMSO, 10mM HE	92,1%	66% ± 3,3	69% ± 6,0
	BSS+ 10% DMSO, 100mM HE	92,9%	52% ± 1,9	41% ± 6,8

Hydroxyectoin (HE) ist ein Aminosäurederivat, das in der Lage ist Zellstrukturen und Proteine vor verschiedenen Stressfaktoren zu schützen (vgl. Diskussion). Zunächst wurde versucht, DMSO zum Teil und komplett durch HE zu ersetzen. Wie Tab. 8, Versuch 27.06.2011 zeigt, gelang das nicht. Hohe HE-Konzentrationen ließen keine Schutzfunktion erkennen, deshalb wurde HE anschließend in geringeren Konzentrationen (10µM-100mM) zusätzlich zu 10% DMSO eingesetzt und getestet (siehe Tab. 32; Versuch 28.06/05.07.2011). Nach nur kurzer Lagerung bei -20°C war die Membranintegrität der Proben ohne HE-Zusatz und mit 100µM HE besonders erfolgversprechend. Nach 7 Tagen Lagerung im Gefrierschrank war der Prozentsatz aber auf unter 60% gesunken.

Tab. 33: Membranintegrität von Bienenspermien vor und nach Slow Freezing in verschiedenen Kryolösungen.

Datum des Versuchs	Kryo - Puffer	Messung vor Abkühlung	Nach 1h in -20°C	Nach 4 Tagen -20°C
07/11.07 2011	BSS+ 10%DMSO	97,3%	69% ± 3,4	69% ± 2,4
	BSS+ 10%DMSO, 10mM HE	93,3%	78% ± 4,0	73% ± 4,5
	BSS+ 5%DMSO, 5%PD	91,0%	63% ± 4,1	48% ± 5,8
	BSS+ 5%DMSO, 5%DMAA	92,9%	71% ± 3,2	56% ± 3,6
	BSS+ 10% DMAA	85,7%	65% ± 4,9	34% ± 5,3
	BSS+ 5%DMSO, 2,5%PD, 2,5%DMAA	95,9%	64% ± 2,0	56% ± 5,7
07/11.07 2011	Theka 10%DMSO,	67,7%	70% ± 7,8	65% ± 3,4
	Theka 5%DMSO, 5% PD	68,2%	71% ± 4,4	44% ± 4,8
	Theka 5% DMSO, 5%DMAA	80,9%	67% ± 1,0	69% ± 6,3
	Theka 10%DMAA	83,9%	56% ± 5,8	41% ± 3,4

In Tab. 33 sind die Ergebnisse weiterer Slow Freezing Experimente zusammengefasst. Einige Kryo-Medium wurden mehrfach getestet, um deren Reproduzierbarkeit zu prüfen. Es stellte sich heraus, dass nach nur kurzer Lagerung im Gefrierschrank das Medium BSS+ mit 10% DMSO und 10mM HE die Membranintegrität der Bienenspermien am besten erhält. Auch sehr gut nach kurzer Lagerung schnitten die Proben in BSS+ mit 5% DMSO und 5% DMAA, sowie in künstlicher Spermathekaflüssigkeit mit 5% DMSO und 5% PD ab. Nach 4 Tagen Lagerung ergab sich jedoch ein anderes Bild. Ein hoher Anteil intakter Spermien war wieder in der BSS+ mit 10% DMSO zu finden, noch besser schnitt mit 73% intakten Spermien die Probe in BSS+ mit 10% DMSO und 10mM HE ab, also zeigte sich auch hier die stabilisierende Wirkung des HE. Viele ungeschädigte Spermien (65% bzw. 69%) waren auch in künstlicher Spermathekaflüssigkeit mit 10% DMSO oder mit 5 %DMSO und 5% DMAA zu finden. Stark geschädigt wurden die Spermien dagegen in Proben ohne DMSO-Zusatz. Auch der teilweise Ersatz des DMSOs durch PD führte zu keinem positiven Ergebnis.

3.4.2. Ermittlung der optimalen Einfrier- und Auftaurate (Koop. LIB)

Nachdem Abkühlungs- und Einfrierversuche zeigten, dass DMSO in einer Konzentration von 10% für die Kryokonservierung von Bienensperma geeignet ist, wurde nach einer optimalen Einfriergeschwindigkeit gesucht. Abkühlraten von 1-6°C/min wurden für BSS+ und Harbo-Phosphatpuffer getestet. Wie in Abb. 74 dargestellt, hatten die unterschiedlichen Abkühlraten nur sehr geringfügige Differenzen der Motilität zur Folge. Eine Abkühlrate von 4°C/min resultierte für BSS+ im größten Anteil beweglicher Spermien. Die Ergebnisse mit dem Harbo-Puffer wiesen noch geringere Differenzen auf, weshalb für beide Puffer eine mittlere Abkühlrate von 3-4°C/min favorisiert wurde. Insgesamt wiesen die Harboproben eine leicht höhere Spermienmotilität auf als die BSS+ -Proben.

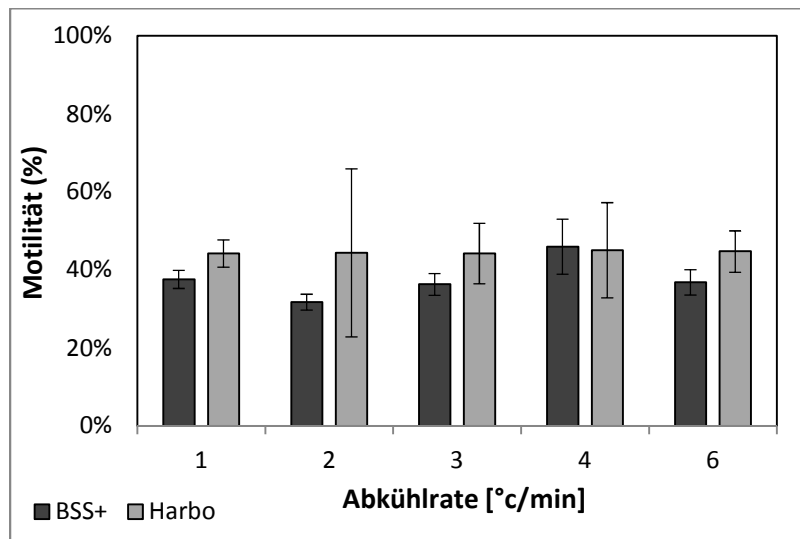


Abb. 74: Motilität von in BSS+ oder Harbo-Puffer verdünnten Bienenspermien nach unterschiedlich schneller Abkühlung auf -30°C und anschließendem Auftauen. Die Schätzung der Motilität wurde durch Fachpersonal für min. 200 Spermien/Probe durchgeführt. Es wurden je Einfriergeschwindigkeit 3 Proben für BSS+ und 6 Proben für Harbo-Puffer untersucht.

Auch die Art des Auftauens spielt eine wichtige Rolle für den Erfolg einer Kryokonservierung und muss mit der Einfrierrate abgestimmt werden. Hierzu wurden verschiedene Auftauvarianten an Bienenspermaproben getestet, die nach den bislang erfolgreichsten Verfahren (DMSO-haltige (10%) mit 3°C/min abkühlen) eingefroren waren. Eine detaillierte Beschreibung der Auftauverfahren ist unter 2.7.2. gegeben. Dieser Versuch wurde mit BSS+ - sowie Harbo-verdünnten Proben durchgeführt und es wurden, wie bei der Optimierung der Abkühlrate, sowohl die Motilität geschätzt als auch die Integrität der Plasmamembran mittels GPI-Test ermittelt. Die Ergebnisse der Motilitätsbestimmung sind als Säulendiagramm in Abb. 75 gezeigt.

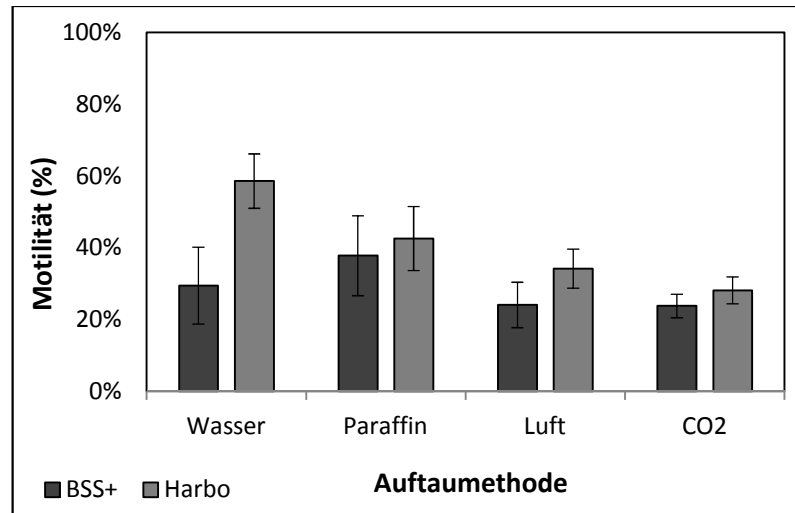


Abb. 75: Motilität von Bienenspermien nach Abkühlung auf -30°C und anschließendem Auftauen mit unterschiedlichen Verfahren. Die Motilität wurde von mindestens 200 Spermien je Probe geschätzt.

Alle BSS+ -Proben wiesen nur relativ geringe Unterschiede der Motilität auf, der Anteil beweglicher Spermien lag zwischen 24% für Proben, die an der Luft auftauten und maximal 37% für in Paraffinöl erwärmte Proben. Dagegen variierte der Prozentsatz motiler Spermienzellen in den Harboproben deutlicher. Am schlechtesten schnitten in CO_2 -aufgetaute Proben ab, in ihnen bewegten sich nur 28% der Spermien. Dagegen waren fast 60% der Spermien motil, wenn die Probe im Wasserbad erwärmt wurde. Insgesamt waren die Proben, die mit BSS+ verdünnt wurden, weniger motil als die Harboproben.

3.4.3. Besamungsversuch zur Überprüfung der erstellten Methode

In einem Besamungsversuch wurde das Slow Freezing Verfahren, welches sich in *in vitro* Experimenten besonders erfolgversprechend darstellte (kryokonserviertes mit 10%-Harbo-Medium verdünntes Bienensperma im Wasserbad aufgetaut) getestet. Als Kontrolle wurde ein Teil der Königinnen mit unbehandeltem Bienensperma aus demselben Spermapool besamt. Im Anschluss, ca. 39 Tage nach Insemination, wurden die Spermien in den Spermatheken gezählt, außerdem wurden die Brutnester auf Drohnenbrut hin untersucht.

Über 4,5 Mio Spermien wurden in Spermatheken gezählt, die von Königinnen stammten, die mit unbehandeltem Sperma inseminiert wurden (Abb. 76). Dagegen wurden in den Spermatheken der Königinnen, die mit kryokonservierten und 1:1,25 bzw. 1:2 verdünnten Spermien besamt wurden, durchschnittlich nur ca. 0,4 bzw. 0,5 Mio Samenzellen gefunden.

Wie an den hohen Standardabweichungen zu erkennen ist, schwankten die Ergebnisse zwischen den untersuchten Königinnen sehr stark.

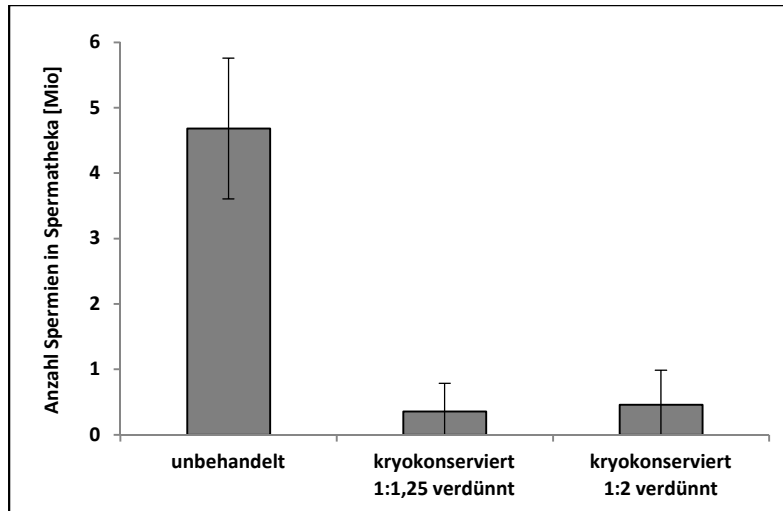


Abb. 76: Spermienanzahl in den Spermatheken mit kryokonserviertem Sperma besamter Königinnen. Königinnen wurden mit kryokonserviertem und unbehandeltem Bienensperma besamt, und die Spermienanzahl in den Spermatheken wurde nach 39 Tagen ermittelt. Für diesen Versuch wurden insgesamt 23 Königinnen besamt. Die Spermaproben wurden 1:1,25 bzw. 1:2 mit DMSO-haltigen Harbo-Puffer verdünnt. Der DMSO-Gehalt in den Proben betrug stets 10% v/v. Nach kurzer Inkubation in Raumtemperatur wurden die Proben mit 3°C/min bis -40°C abgekühlt und anschließend in flüssigen Stickstoff überführt. Nach Auftauen in 35°C warmem Wasser wurden pro Königin je 8µl der entsprechenden Probe versamt.

Auch die Beobachtungen der Brutnester sowie die Erfassung der Spermienmotilität bestätigten den Eindruck der relativ niedrigen Fruchtbarkeit von kryokonservierten Spermien (Abb. 77). Die aus kryokonservierten Spermien entstandenen Nester enthielten einen ungewöhnlich hohen Anteil an unbefruchteter männlicher Brut, normalerweise sind in den Nestern zunächst ausschließlich weibliche Nachkommen zu finden. Das Brutnest der Kontrollkönigin, die mit unbehandeltem Frischsperma besamt wurde, bestätigt dies (Abb. 77). Allerdings war in allen Nestern zumindest ein kleiner Anteil weiblicher Brut zu finden. So enthielten die Brutnester der Königinnen, die mit 1:1,25 verdünntem Kryosperma besamt wurden, immerhin 31% weibliche Nachkommen. Mit stärker verdünntem Sperma (1:2 verdünnt) wurden dagegen nur ca. 17% weibliche Brut erzeugt (siehe Abb. 77). Auch die Motilität der kryokonservierten Spermien, die in den Spermatheken gefunden wurden, war deutlich geringer als von den unbehandelten.

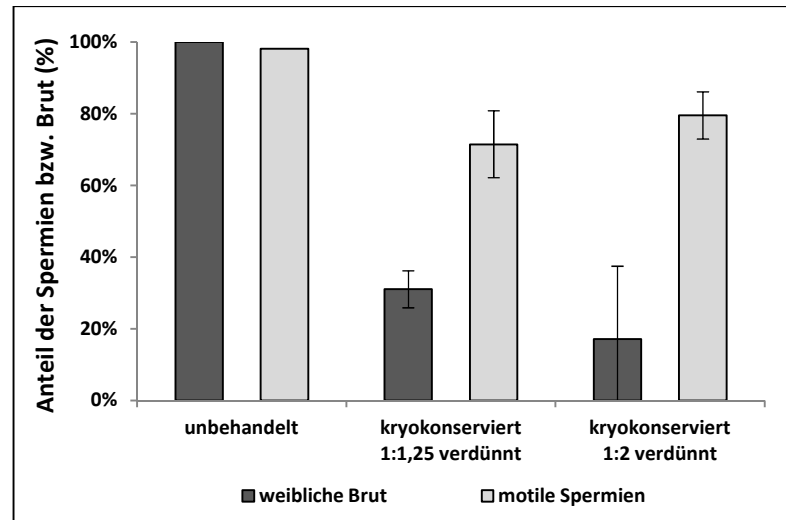


Abb. 77: Anteil motiler Spermien in den Spermatheken bzw. weiblicher Brut nach Versamung kryokonservierter und unbehandelter Bienenspermien. Königinnen wurden mit kryokonserviertem und unbehandeltem Bienensperma besamt. Anschließend wurden die Motilität der in den Spermatheken gefundenen Spermien (n=4) sowie die Anteile weiblicher Brut in den entstandenen Brutnestern (n=3) untersucht. Details zur Kryomethode werden unter 2.6.3. gegeben.

3.4.4. DMSO-Entfernung vor Versamung

Da belegt werden konnte, dass DMSO auf Bienenspermien und besonders auf die besamten Königinnen toxisch wirkt und doch zugleich das einzig geeignete Kryoprotektivum für diese Spermienzellen zu sein scheint, wurde versucht, das DMSO nach der Spermienkonservierung und vor der Versamung zu entfernen. Prinzipiell existieren mehrere Verfahren zur Reduzierung des DMSO-Gehaltes, allerdings sollte die Methode möglichst schonend für die Spermien sein und die Probe nicht oder nur geringfügig verdünnen. Deshalb wurden nur zwei Reinigungsmethoden verfolgt, die Dialyse und die Zentrifugation. Die folgenden Versuche (3.4.4.1 und 3.4.4.2) wurden an Proben ohne Abkühlung bzw. Kryokonservierung der Proben durchgeführt. Versuch 3.4.4.3 zeigt ein abschließendes *in vivo* Experiment mit kryokonserviertem Bienensperma, dem vor Insemination DMSO entfernt wurde.

3.4.4.1 Dialyse zur schonenden DMSO-Entfernung; *in vitro*- Versuche

Die Dialyse ist ein etabliertes Verfahren zur schonenden Entfernung von Substanzen aus Zellsuspensionen. Durch Wahl des Dialysepuffers, Volumen gegen das dialysiert wird, Dialysoberfläche, Porengröße der Membran und Dialysedauer lässt sich das Verfahren für verschiedene Zellen und Bedingungen optimieren.

Zunächst musste allerdings ein Weg gefunden werden, die DMSO-Entfernung verfolgen und den Reinigungserfolg überprüfen zu können. Dies gelang mittels Osmolalitätsmessung an einem Osmometer. Wie sich herausstellte, stehen Osmolalität und DMSO-Konzentration im Bereich von 0-700mM in einem linearen Verhältnis. Für DMSO-haltige BSS+ und Harbo-Puffer-Proben ergeben sich allerdings auf der y-Achse verschobene Kalibriergeraden (Abb. 78). Mit Hilfe dieser Kalibriergeraden und ihrer Geradengleichung wurden im Folgenden die DMSO-Konzentrationen in den Proben ermittelt.

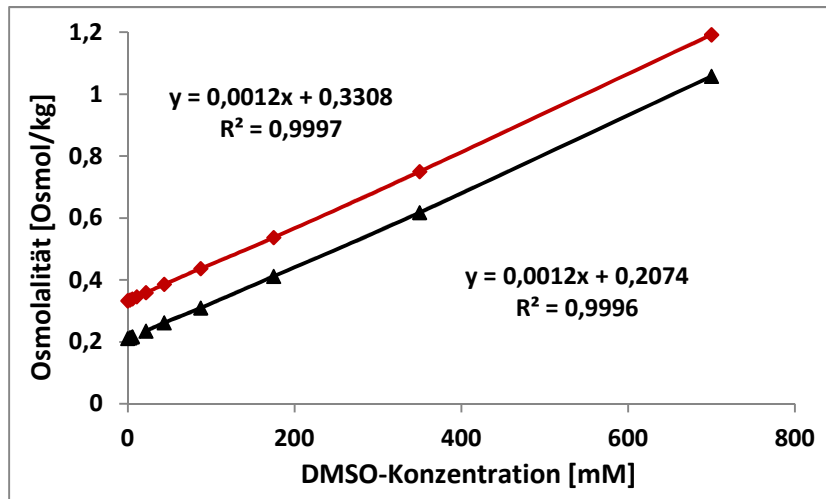


Abb. 78: Kalibriergeraden zur Ermittlung von DMSO-Konzentrationen. Gezeigt wird der lineare Zusammenhang zwischen DMSO-Gehalt und Osmolalität für die Puffer BSS+ (rot) und Harbo (schwarz). Zusätzlich sind die Geradengleichungen und die Bestimmtheitsmaße in der Graphik angegeben. Ermittelt wurden die Osmolalität an einem Osmometer

Zuerst wurden herkömmliche Dialyseschläuche verwendet, schon erste Versuche zeigten jedoch, dass selbst die kleinsten frei erwerbbaeren Dialyseschläuche (Carl Roth GmbH 1780.1) mit einem $\varnothing = 6,3\text{mm}$ zu groß für die Kryokonservierung von Bienenspermien suspensionen sind, da sie Probenvolumina von mehreren hundert μl erfordern. Außerdem war es nicht möglich nach Dialyse die gesamte Spermien suspension ohne erheblichen Probenverlust aus dem Dialyseschlauch zu gewinnen. Deshalb wurde der ursprüngliche Plan, bei dem der Dialyseschlauch direkt auf den frisch aufgetauten Kryoschlauch gesteckt wird (siehe Abb. 21 unter 2.6.4.1), verworfen. Stattdessen fanden sogenannte Mikrodialysierkammern Verwendung, da diese sehr anwenderfreundlich und gerade für geringe Probenvolumina geeignet sind.

Als erstes wurde geprüft, ob eine Reduzierung des DMSO-Gehaltes mittels Dialyse möglich ist und der Reinigungsverlauf untersucht. Proben mit und ohne Spermien wurden mit 10% DMSO (1,4M) versetzt und in die Mikrodialysierkammern gegeben und anschließend gegen

den entsprechenden Puffer (BSS+ oder Harbo) dialysiert. Wie in Abb. 79 dargestellt, nahm in den ersten 10-12 min die DMSO-Konzentration stark ab und fiel auf ca. 40% der Ausgangskonzentration, dabei waren die Unterschiede zwischen den Puffern nur minimal. Danach reduzierte sich der DMSO-Gehalt deutlich langsamer, dennoch waren nach 60 min ca. 90% des DMSOs aus der Probe entfernt worden. Insgesamt differierten die Proben der beiden Puffer nur sehr gering, der größte Unterschied bestand nach ca. 30 min, während in der Harbo-Probe noch 29,9% des DMSOs vorhanden war, enthielt die BSS+ Probe mit 26,2% 3,7% weniger DMSO.

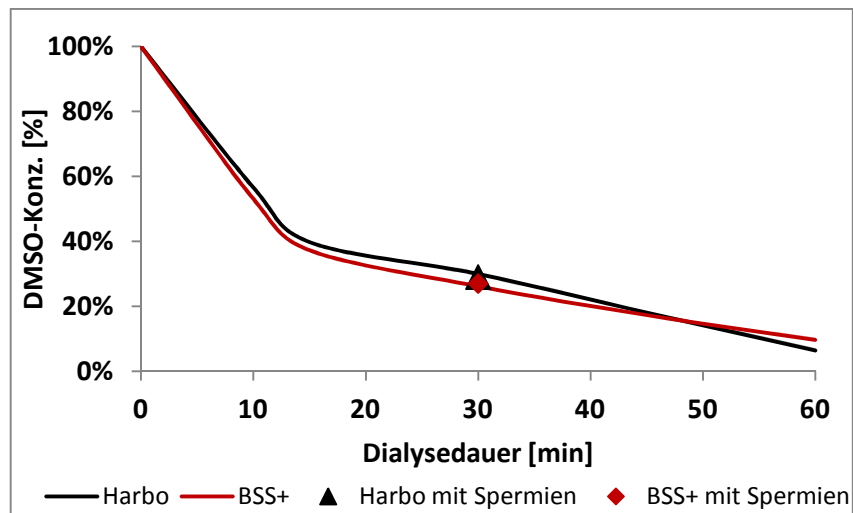


Abb. 79: DMSO-Entfernung mittels Dialyse in Mikroammern. Harbo- (schwarz) und BSS+(rot) Proben mit 10% (v/v) DMSO wurden in Mikrodialysierkammern gegen den entsprechenden Puffer ohne DMSO-Zusatz dialysiert. Die DMSO-Konzentration der Proben wurden mit Hilfe der am Osmometer gemessenen Osmolalitäten und der zuvor erstellten Kalibriergerade ermittelt und in Prozent umgerechnet. Die einzeln eingetragenen Datenpunkte stammen von mit Harbo (schwarzes Dreieck) und BSS+ (rotes Quadrat) verdünnten DMSO-haltigen Spermisuspensionen (1:4).

Zusätzlich zu den reinen Puffer-DMSO-Proben wurden auch DMSO-haltige Bienenspermisuspensionen getestet. Die einzeln dargestellten Datenpunkte liegen nahe an den Werten der Proben ohne Spermien, was beweist, dass die Anwesenheit der Spermien keinen oder nur geringen Einfluss auf den Reinigungsverlauf ausübt.

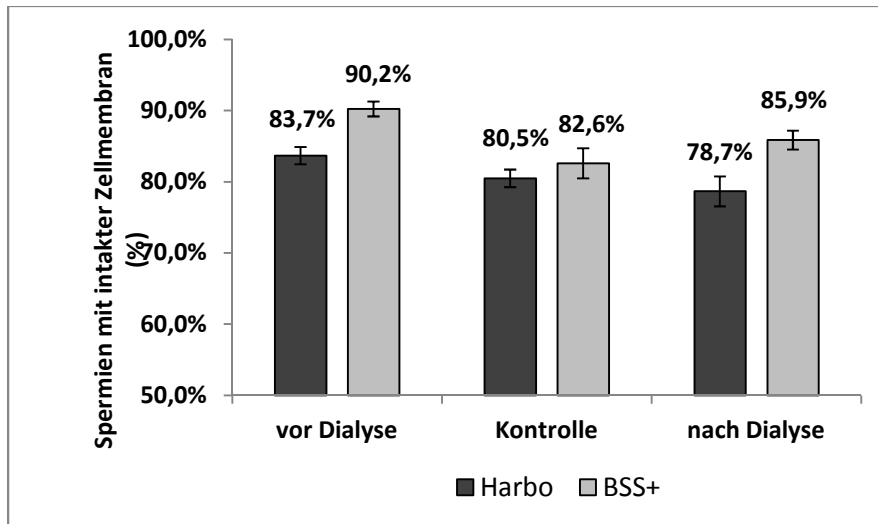


Abb. 80: Membranintegrität von Bienenspermienproben vor und nach 30 minütiger Dialyse. Ergebnisse der GPI-Tests von Bienenspermienproben vor und nach 30 minütiger Dialyse (je n=4) sowie der nicht dialysierten jedoch ebenso 30 min inkubierten Kontroll-Aliquots (n=3). Die Proben wurden mit DMSO-haltigem (10% v/v) BSS+ bzw. Harbo-Puffer 1:4 verdünnt.

Um zu überprüfen, ob und wie stark sich eine Dialyse auf die Vitalität der Bienenspermien auswirkt, wurde die Membranintegrität von Bienenspermienproben mit 10% DMSO vor und nach Dialyse sowie nach gleichlanger Lagerung ohne Dialyse mittels GPI-Test bestimmt. Gleichzeitig dienten diese Messungen dem Vergleich von BSS+ und Harbo-Puffer (Abb.80). Mit beiden Puffern war die Membranintegrität der Spermien vor Dialyse geringfügig höher als nach der Dialyse. Während in der Harbo-Kontrolle, also der 30 Minuten gelagerten Probe ohne Dialyse, ca. 2% weniger Spermien geschädigt waren als in der dialysierten Probe, enthielt die BSS+ Kontrolle sogar 2,4% mehr geschädigte Spermien.

Wie schon in Abb. 79 gezeigt, nimmt mit zunehmender Dialysendauer der DMSO-Gehalt ab. Deshalb wurde der Einfluss der Dialysendauer auf die Spermiovitalität, genauer gesagt auf die Membranintegrität, geprüft. Es wurden mehrere Versuche mit unterschiedlichen Dialysezeiten durchgeführt. Exemplarisch sind die Werte für die 30- und 60-minütigen Dialysen in Abb. 81 dargestellt. Wie auch schon für Abb. 80 beschrieben, nimmt nach einer 30 minütigen Dialyse die Membranintegrität nur geringfügig ab. Nach 60 Minuten Dialyse ist dagegen eine deutliche Schädigung der Spermien nachweisbar.

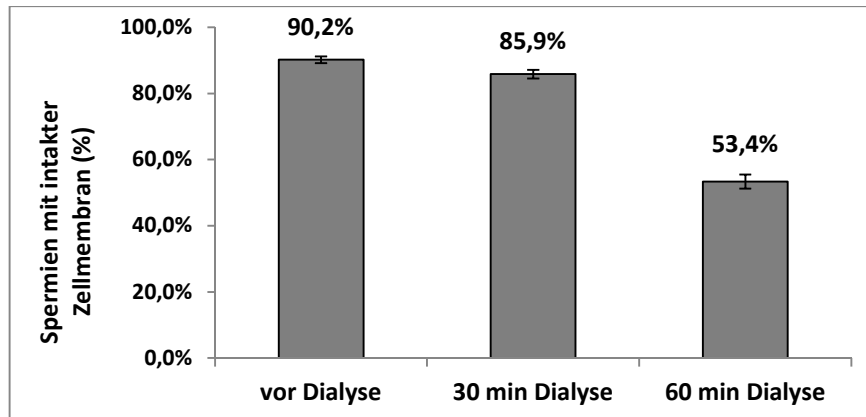


Abb. 81: Einfluss der Dialysedauer auf den Spermienzustand. Ergebnisse der GPI-Tests von Bienenspermienproben vor und nach unterschiedlich langer Dialyse. Die Proben (n=3) wurden mit DMSO-haltigem (10% v/v) BSS+ 1:4 verdünnt.

Manche Beobachtungen, z.B. dass Bienenspermien an der Luft schnell immotil werden und Membranschäden aufweisen, deuteten darauf hin, dass oxidativer Stress ein großes Problem bei der Lagerung und durchaus auch bei der Dialyse sein könnte. Deshalb wurde nach Zusätzen gesucht, die diesen Stressfaktor minimieren. Ein weiterer möglicher Faktor, der in Zellsuspensionen häufig zum Problem für die Zellen wird, sind proteinerzetzende Peptidasen. Um die Dialyse schonender für die Bienenspermien zu machen, wurden deshalb Katalase, das Antioxidans Glutathion und ein Trypsinhemmer als mögliche Zusätze im Dialysepuffer getestet.

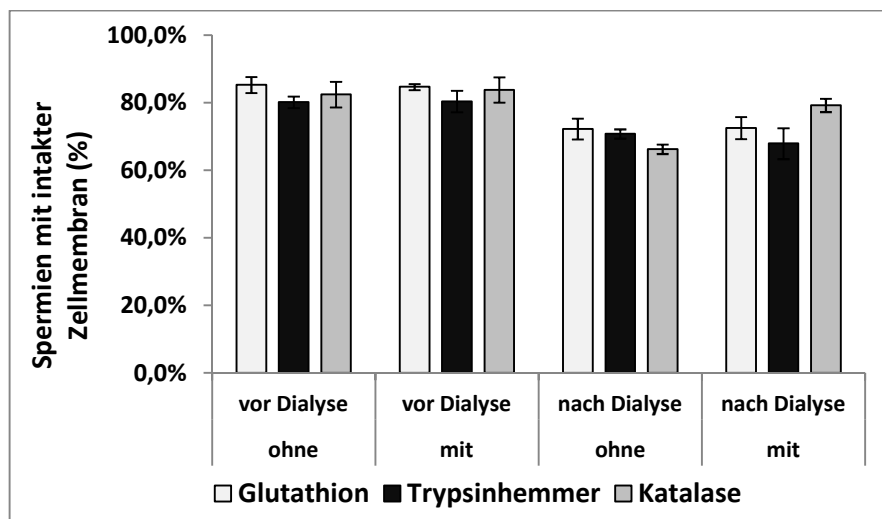


Abb. 82: Membranintegrität von Bienenspermien nach Dialyse mit verschiedenen Zusätzen. Bienenspermien suspensionen (1:4 mit BSS+) wurden 30 min lang in Mikrodialysierkammern gegen BSS+ mit verschiedenen Zusätzen (Glutathion, Katalase, Trypsinhemmer) bei Raumtemperatur dialysiert. Zuvor und anschließend wurde die Membranintegrität der Proben mittels GPI-Test ermittelt.

Vor der Dialyse unterschieden sich alle 3 Proben ohne Zusatz nur sehr geringfügig von den jeweiligen Proben mit den verschiedenen Zusätzen (Abb. 82). Erst nach Dialyse konnten Unterschiede ausgemacht werden. Während Glutathion keinen sichtbaren Effekt hatte, der Anteil von Spermien mit intakten Membranen war mit Glutathion genauso hoch wie ohne, erwies sich die Zugabe des Trypsinhemmers als eher schädlich. In der Probe, die mit Trypsinhemmer dialysiert wurden, waren die Membranintegrität ca. 3% geringer als in der Probe ohne Trypsinhemmer. Nur Katalase zeigte einen schützenden Effekt. War Katalase im Dialysepuffer enthalten, so waren nach Dialyse noch über 79% der Spermien intakt und damit 13% mehr als in den gleichen Proben, die ohne Katalasenzusatz dialysiert wurden.

3.4.4.2 Zentrifugation zur schonenden DMSO-Entfernung (LIB)

Die zweite Möglichkeit, DMSO nach Kryokonservierung und vor Versamung zu entfernen, ist die Zentrifugation. Die Untersuchungen zu diesem Verfahren wurden von unserem Kooperationspartner LIB Hohen Neuendorf durchgeführt und werden hier nur kurz behandelt. Abbildung 83 zeigt den Einfluß der Zentrifugationsgeschwindigkeit. Spermienproben, verdünnt in BSS wurden 12 Minuten lang bei unterschiedlichen Geschwindigkeiten zentrifugiert. Anschließend wurden die Membranintegrität und der Grad der Motilität ermittelt.

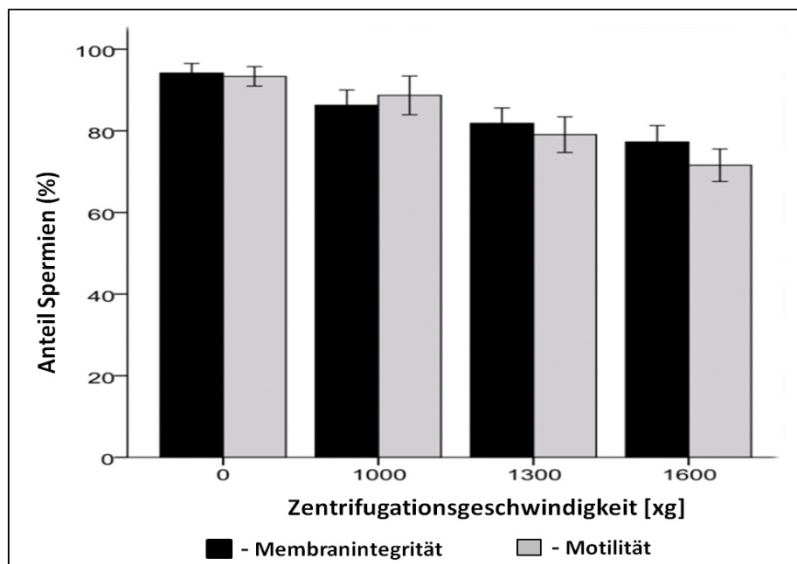


Abb. 83: Membranintegrität und Motilität von Bienenspermien nach Zentrifugation mit unterschiedlicher Geschwindigkeit. Pro Behandlung wurden 2 Bienensperma-Aliquots mit BSS 1:20 verdünnt und anschließend in zugeschweißten Pipettenspitzen 12 min lang bei 1000xg, 1300xg und 1600xg zentrifugiert. Anschließend wurde die Membranintegrität mittels H342/PI-Fluoreszenzdoppelmarkierung untersucht und die Motilität durch manuelles Zählen beurteilt. Der Versuch wurde 4-mal wiederholt, insgesamt wurden 27 Proben untersucht.

Aus Abb. 83 geht deutlich hervor, dass mit zunehmender Zentrifugationsgeschwindigkeit der Anteil geschädigter Spermien zunahm und sich dementsprechend sowohl die Motilität als auch die Membranintegrität reduzierten. Ohne Zentrifugation waren über 90% der Bienenspermien motil und besaßen intakte Membranen, schon eine Zentrifugation mit 1000xg verringerte den Anteil intakter und motiler Spermien um ca. 5%.

Da die durch Zentrifugation gereinigten Spermaproben anschließend versamt werden sollten und jede Königin mit maximal 14µl besamt werden kann, wurde die Rekonzentrierung durch Zentrifugation überprüft. Die Dichte des Bienenspermas nahm durch den Zentrifugationsschritt deutlich ab. Aus anfänglichen 8µl Bienensperma entstanden nach Verdünnung und anschließender 12-minütiger Zentrifugation mit 1000xg, 1300xg und 1600xg ca. 15,5µl, 12,6µl und 10,9µl. Durch Zentrifugation mit der für die Spermien schonensten Zentrifugationsgeschwindigkeit (1000xg) trat also eine Volumenerhöhung um 93,8% auf.

3.4.4.3 Besamungsversuche mit gereinigtem Bienensperma

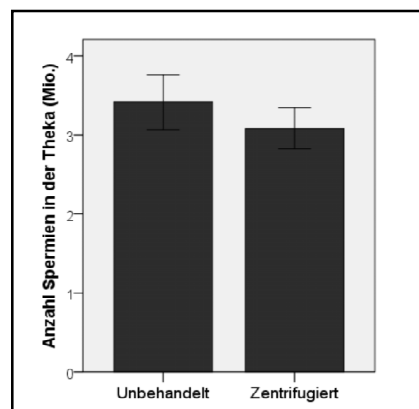


Abb. 84: Spermienanzahl in den Spermatheken von Königinnen, die mit unbehandeltem und zentrifugiertem Sperma besamt wurden. Je 10 Königinnen wurden mit unbehandeltem und zentrifugiertem (12min; 1300xg) Bienensperma besamt, und die Anzahl der Spermien in den Spermatheken wurde ca. 18 Tage nach Eiablage-Beginn bestimmt.

Nach den *in vitro* Versuchen wurde in einem Besamungsexperiment untersucht, ob die Zentrifugation als Reinigungsmethode einen Einfluss auf die Anzahl der Spermien, die die Spermatheka erreichen, ausübt und/oder den Anteil an Drohnenbrut erhöht. Als Kontrolle wurde Königinnen (insgesamt: n=20) mit unbehandeltem Bienensperma besamt. Wie in Abb. 84 zu sehen ist, bewirkt die Zentrifugation des Bienenspermas mit 1300xg nur eine geringe Minderung der Spermatheka Füllung. Der Unterschied von ca. 0,3 Mio. Spermien

war nicht signifikant (ANOVA; $n=17$, $F = 0.8$; $P = 0.39$). Sowohl die Membranintegritäten als auch die Motilitäten der aus den Spermatheken entnommenen Spermien waren für beide Behandlungsgruppen $> 95\%$ und unterschieden sich nicht voneinander. Zwei der insgesamt 20 Königinnen, jeweils eine pro Behandlungsart, verstarben während des Versuches aus unerklärlichem Grund. Eine weitere mit zentrifugiertem Sperma besamte Königin legte aus unerfindlichem Grund keine Eier ab, obwohl durchaus Spermien in ihrer Spermatheka zu finden war. Desweiteren wies pro Behandlungsgruppe jeweils ein Brutnest auch männliche Brut auf. So enthielt das zur Kontrollgruppe gehörende Nest 7% Drohnenbrut und das Nest, das mit zentrifugiertem Sperma entstand, 0,5% männliche Brut. Alle übrigen Königinnen legten ausschließlich weibliche Eier ab.

In einem Besamungsversuch mit kryokonservierten und anschließend dialysierten bzw. zentrifugierten Bienenspermaproben wurden nun geprüft, ob das Entfernen von DMSO die Eibefruchtung verbessert. Dialysiert bzw. zentrifugiert wurden Spermaproben, die zuvor in 10% DMSO-haltigem BSS+ kryokonserviert wurden. Als Kontrolle dienten mit 10% DMSO-haltigem BSS+ kryokonservierte Spermasuspensionen, deren DMSO nicht entfernt wurde. 18-19 Tage nach Beginn der Eiablage wurde der Anteil weiblicher Brut in den entstandenen Brutnestern ermittelt (siehe Abb. 85).

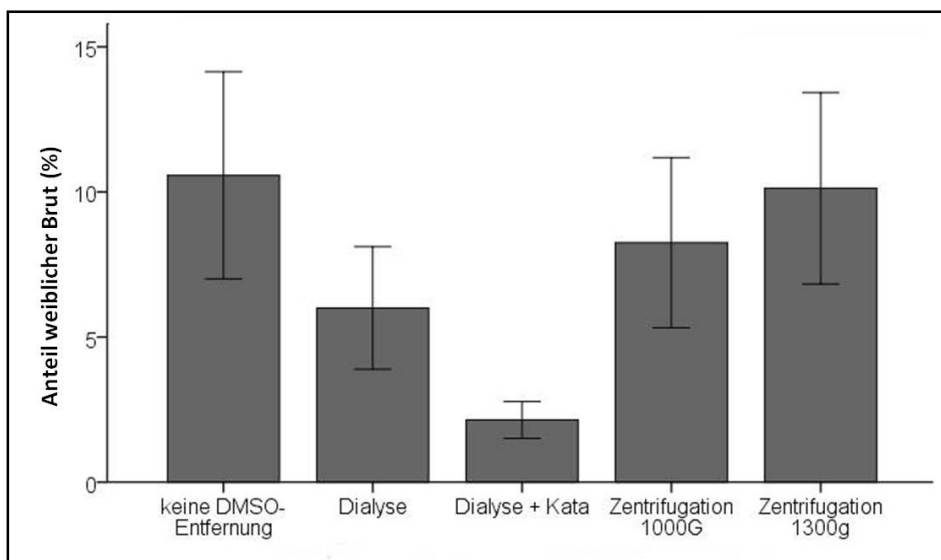


Abb. 85: Anteil weiblicher Brut nach Besamung mit unterschiedlich behandelten Spermaproben. Königinnen wurden mit kryokonserviertem und unterschiedlich gereinigtem Bienensperma besamt, und der Anteil weiblicher Brut wurde 18-19 Tage nach Beginn der Eiablage ermittelt. Insgesamt wurden für diesen Versuch 39 Königinnen besamt.

Der Anteil weiblicher Brut lag in allen untersuchten Nestern bei max. 11% und war damit sehr niedrig. Dennoch differierten die aus unterschiedlich behandeltem Sperma entstandenen Nester deutlich. Besonders wenig weibliche Eier legten die Königinnen, die mit dialysiertem Sperma besamt wurden, insbesondere, wenn der Dialysepuffer zusätzlich Katalase enthielt. Dann waren nur ca. 2,5% Arbeiterinnenbrut vorhanden. Mit zentrifugiertem Sperma besamte Königinnen legten einen deutlich höheren Anteil weibliche Eier. Vor allem die mit 1300xg zentrifugierten Sperma entstandenen Nester enthielten ca. 10% weibliche Brut. Den größten Anteil weiblicher Eier legten jedoch die Königinnen, die mit ungereinigten Spermaproben besamt wurden.

3.5. Eiskristallbildung während des Slow Freezing

Die entwickelte Slow Freezing Methode zur Kryokonservierung von Bienenspermien sollte durch die Veränderungen mancher Faktoren weiter optimiert werden und zu einer höheren Fruchtbarkeit der Spermien nach Gefrierkonservierung führen. Um das zu erreichen ist es nötig die Vorgänge innerhalb der Spermienprobe während des Slow Freezings genauer zu betrachten.

3.5.1. Multiphotonen Laserscanning-Mikroskopie des Gefriervorganges

Eine Zusammenarbeit mit dem Fraunhofer Institut für biomedizinische Technik (IBMT) ermöglichte Einblicke in die Eiskristallbildung während des Slow Freezing von Bienenspermaproben. Abbildung 86 zeigt die räumliche Zunahme der Eisbildung (schwarze Bereiche) während des Einfrierprozesses einer Bienespermaprobe. Das zugesetzte Fluorescein lässt nur die flüssigen Bereiche grün erscheinen. Während bei -9°C , was knapp unter der Nukleationstemperatur von ca. -8°C liegt (vgl. Abb. 86A und B), noch relativ viel Flüssigkeit vorzufinden ist, beschränkt sich bei -20°C das eisfreie Volumen auf dünne Flüssigkeitsfäden. Weitere 10 Grad kälter ist fast die gesamte mittlere Ebene mit Eis erfüllt und nur wenige kleine Flüssigkeitsbereiche sind geblieben. Der Fokus war auf die die mittlere Ebene der Probe eingestellt. Auffallend ist, dass in dieser Fokusebene bei allen drei Temperaturen nur sehr wenige Bienenspermien zu sehen sind. Die Spermien waren durch den Kernfarbstoff H342 als blaue Punkte erkennbar. Abb. 87 zeigt, dass die Bienenspermien sich bereits bei einer Temperatur von -9°C in der unteren Fokusebene aufkonzentriert waren (Abb. 87C).

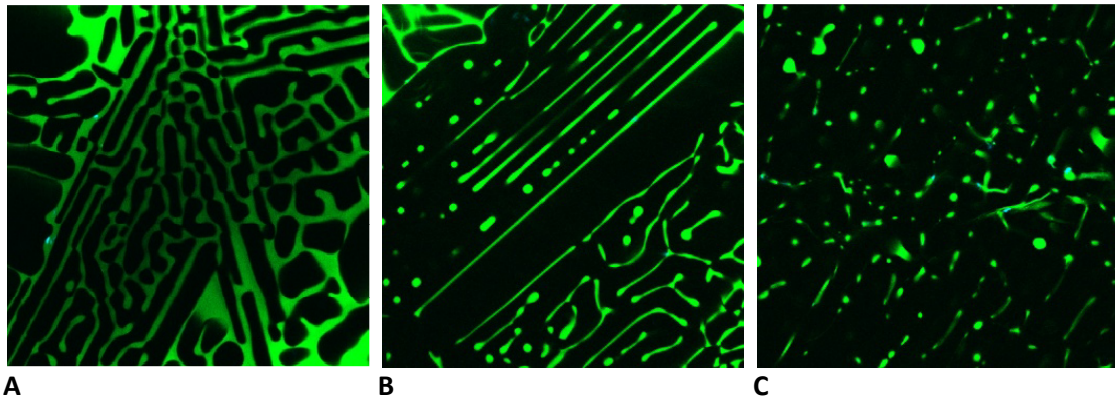


Abb. 86: Mit einem Multiphotonen Laserscanning-Mikroskop erstellte Fluoreszenzaufnahmen einer Bienenspermaprobe während des Einfrierprozesses. Diese wurden 1:100 mit BSS verdünnt und enthielt 10% DMSO und die Fluoreszenzfarbstoffe H342 (5 μ M) und Fluorescein (0,1M). Die Probe wurde mit 3°C/min von Raumtemperatur (ca. 20°C) mittels N₂-Dampf auf -30°C herunter gekühlt und kontinuierlich mikroskopisch betrachtet. Durch die Fluoreszenzfarbstoffe weisen eisfreie Bereiche eine deutliche Grünfärbung auf, während gefrorene Bereiche schwarz erscheinen. Durch den Zusatz von H342 sind Bienenspermien anhand der blauen Kopfmarkierung zu erkennen. Es wurde auf die mittlere Tiefenebene fokussiert und bei -9°C (A), -20°C (B) und -30°C (C) Aufnahmen erstellt.

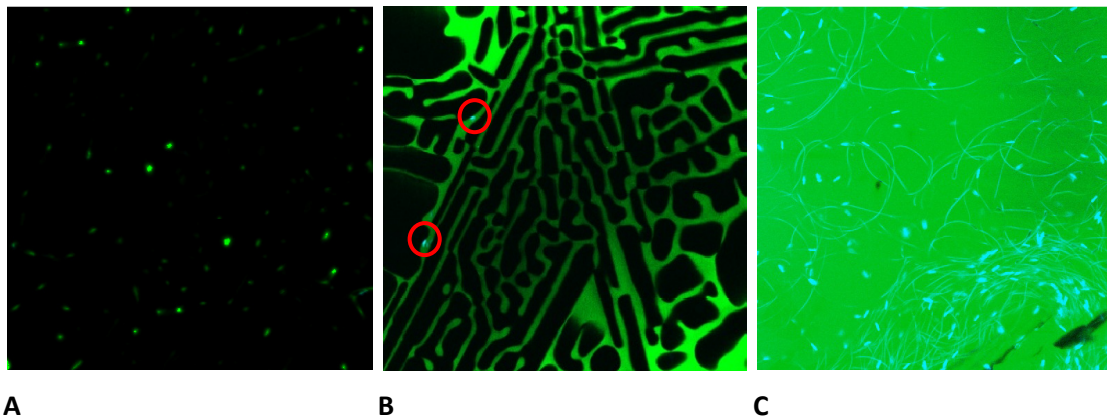


Abb. 87: Mit einem Multiphotonen Laserscanning-Mikroskop erstellte Fluoreszenzaufnahmen einer Bienenspermaprobe bei -9°C. Diese wurden 1:100 mit BSS verdünnt und enthielt 10% DMSO und die Fluoreszenzfarbstoffe H342 (5 μ M) und Fluorescein (0,1M). Die Probe wurde mit 3°C/min von Raumtemperatur (ca. 20°C) mittels N₂-Dampf auf -30°C herunter gekühlt und währenddessen mikroskopisch betrachtet. Durch die Fluoreszenzfarbstoffe weisen eisfreie Bereiche eine deutliche Grünfärbung auf, während gefrorene Bereiche schwarz erscheinen. Durch den Zusatz von die H342 sind Bienenspermien anhand der blauen Kopfmarkierung zu erkennen. Für A) wurde auf die oberste Tiefenebene, direkt unter dem Deckglas, für B) auf die mittlere und für C) auf die unterste Tiefenebene direkt oberhalb des Objektträgers fokussiert. Alle Aufnahmen wurden bei -9°C erstellt.

In der obersten Ebene direkt unterhalb des Deckglases ist fast das komplette Volumen mit Eis erfüllt, und in diesem sind keine Fluoreszenzsignale von Spermienköpfen zu finden (Abb. 87A). Die mittlere Ebene weist, wie oben beschrieben, noch einen relativ hohen flüssigen Volumenanteil auf, in dem wenige Spermien erkennbar sind (siehe rote Markierung, Abb.

87B). Fast alle Bienenspermien liegen in der untersten Ebene direkt über dem Objektträger, wo sich nur wenig Eis gebildet hat und der Großteil aus eisfreier Flüssigkeit besteht (Abb. 87C). Da die Kühlung im Versuchsaufbau von oben stattfand, ist davon auszugehen, dass im oberen Ebenenbereich die Nukleation begann und sich von dort nach unten ausbreitete. Somit wurden die Bienenspermien von der Eisfront in die unteren flüssigen Probenebenen gedrängt, was zu einer Konzentrierung der Spermienzellen und der osmotisch wirksamen Substanzen im restlichen flüssigen Volumen direkt oberhalb des Objektträgers geführt hat.

3.5.2. Nukleationstemperatur und manuelles Seeding.

Wie die Einfrier- und Auftaugeschwindigkeiten beeinflusst auch die Temperatur der Nukleation und damit der Grad der Unterkühlung die Vorgänge in einer zu konservierenden Zellsuspension. Generell besteht die Grundregel, je unterkühlter eine Lösung bei Eintreten der Nukleation ist, desto schneller findet das Eiskristallwachstum statt und desto größer und für die Zellen gefährlicher sind die Eiskristalle. Deshalb wurde nach einer Methode gesucht die Temperatur der Nukleation in einer DMSO-haltigen Spermiesuspension möglichst genau zu ermitteln. Über die kontinuierliche Erfassung der Temperatur innerhalb der Probe mit Hilfe eines ultrafeinen Temperaturfühlers (siehe 2.7.2.) gelang es, den Nukleationspunkt zu bestimmen. Die freiwerdende Kristallisationswärme am Nukleationspunkt bewirkt einen deutlichen Temperatursprung (Abb. 88). Der in Abb. 88 dargestellte Temperaturverlauf stammt von einer 1:10 verdünnten und DMSO-haltigen (10% v/v) Eberspermienprobe.

Bei wiederholten Temperaturmessungen stellte sich heraus, dass die Nukleation in Bienenspermiasuspensionen, die in dünnen Teflonschläuchen 1:4 verdünnt mit 10% DMSO in BSS+ vorliegen bei ca. $-22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ stattfindet. Versuche, die Nukleation mittels manuellen Seedings früher, bzw. bei höheren Temperaturen stattfinden zu lassen, funktionierten nur vereinzelt und unregelmäßig. Sowohl kontrollierte Vibrationen als auch das Berühren des Teflonschlauchs mit einer stark unterkühlten Pinzette führten zu keiner früheren Kristallbildung. Nur innerhalb des programmierbaren Gefriergerätes mit Hilfe der dafür vorgesehenen Apparatur konnte die Unterkühlung der Probe gelegentlich verringert und eine vorzeitige Nukleation herbeigeführt werden. Diese Versuche fanden beim Kooperationspartner, dem LIB in Hohen Neuendorf statt.

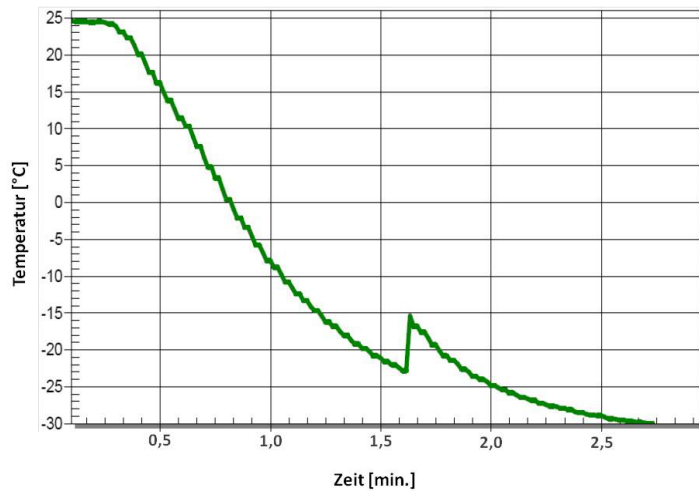


Abb. 88: Ermittlung der Nukleationstemperatur mittels kontinuierlicher Temperaturerfassung innerhalb der Suspension. Mit Hilfe eines ultrafeinen Temperaturfühlers wurde die Temperatur innerhalb eines Teflonschlauches mit 1:10 verdünnter und DMSO-haltiger Eberspermiesuspension kontinuierlich verfolgt und aufgezeichnet.

3.6. DMSO-Zusatz mittels Dialyse zur Erhaltung der natürlichen Spermienbündel

Bei allen bisherigen Experimenten wurde das eingesetzte Kryoprotektivum durch Zugabe und vorsichtiges Verrühren untergemischt. Diese Methode führte stets zu einer Verdünnung und Verwirbelung der Bienenspermien und zu einer Störung der natürlichen Spermienbündel. Mikroskopische Untersuchungen bestätigten, dass Bienenspermien im unverdünnten Sperma ganz eng und parallel in Bündeln zusammenliegen und inaktiv sind. Abb. 89 zeigt ein eng gepacktes inaktives Spermienbündel mit aktiveren Außenbereichen. Zum besseren Verständnis wurden die verschiedenen Bereiche nachträglich am PC unterschiedlich eingefärbt. Im linken sehr dunklen Bereich (rot) lagen die Spermien parallel ganz eng Kopf an Kopf und bewegten sich nicht. Im äußeren Bereich (grün) zeigten Spermien einen synchronisierten Flagellenschlag. Im blauen Bereich, der noch weiter vom Spermienbündel entfernt lag, wiesen die Spermien eine voneinander weitgehend unabhängige und kreisende Motilität auf. Hier waren nur noch selten parallel liegende Spermien zu beobachten, stattdessen zeigten sie ihre in Verdünnungen typische runde Form.

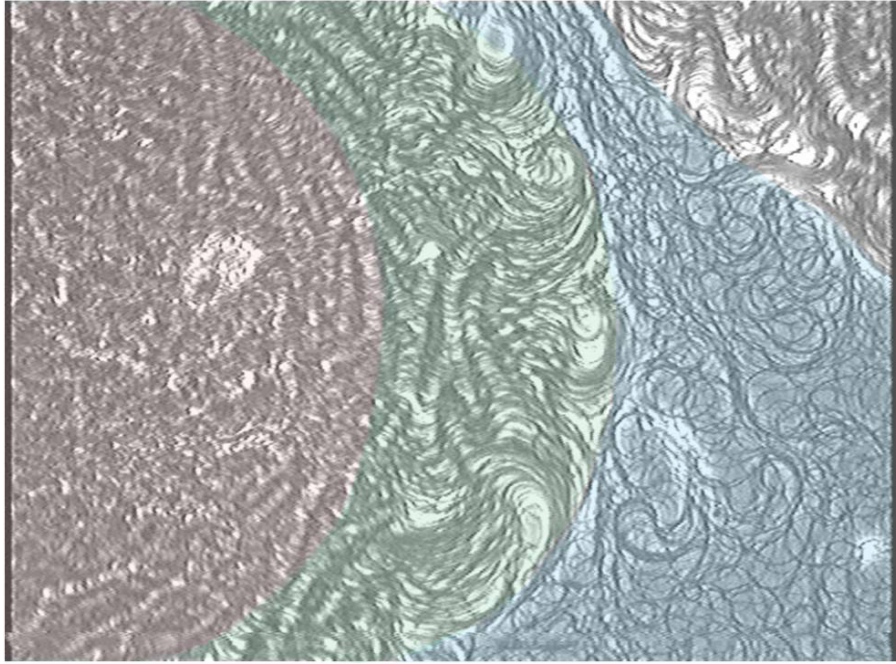


Abb. 89: Randbereich eines Bienenspermienbündels. Für dieses Experiment wurde unverdünntes Bienensperma auf einen mit Puffer benetzten Objektträger gegeben und mikroskopisch untersucht. Sowohl für die Foto- als auch für die Videoaufnahmen wurde ein 20-fach Objektiv verwendet. Nachträglich wurden die verschiedenen Bereiche eingefärbt um eine Unterscheidung zu erleichtern. Im rötlichen Bereich liegen die Spermien noch inaktiv und dicht gepackt in paralleler Ordnung vor. Im grünlichen Teil waren dagegen schon ein parallel ausgeführter Flagellenschlag und eine Auflockerung der Spermien zu erkennen. Im bläulichen Bereich lagen die Spermien vereinzelt von einander und stark motil vor, eine parallele Ausrichtung war nicht mehr zu sehen.

Um diese natürliche, inaktive und dicht gepackte Bündelung der Bienenspermien zu erhalten wurde das für die Kryokonservierung erforderliche DMSO mittels Dialyse in das Bienensperma gebracht. Dadurch fand keine, bzw. nur eine sehr geringe Verdünnung statt und die mechanische Schädigung durch Rühren war unnötig.

In einem Besamungsversuch wurden drei verschiedene Dialyseprotokolle miteinander verglichen. Zum einen fanden zwei unterschiedliche DMSO-Konzentrationen (13,5% und 21%) im Dialysepuffer Verwendung und zum anderen wurden die Proben vor Besamung teilweise 1:2 mit BSS verdünnt. Detaillierte Angaben der Durchführung sind unter 2.8. zu finden. Die Motilität der Spermien nach Auftauen, ihre Anzahl sowie Motilität in den Spermatheken nach Besamung der Königinnen, als auch der Anteil der weiblichen Brut wurden beurteilt.

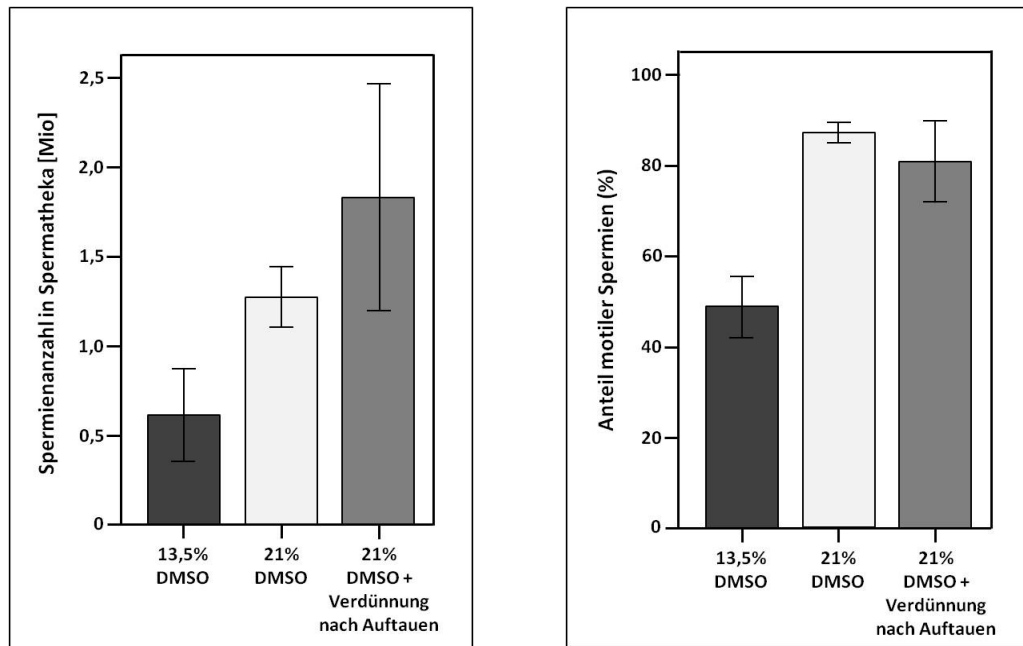
Die zunächst untersuchte Motilität in den aufgetauten Proben zeigte nur geringe Unterschiede zwischen den Methoden. Wurde vor der Kryokonservierung das Bienensperma gegen 13,5% DMSO dialysiert, waren nach Auftauen durchschnittlich 91,1%

Ergebnisse

der Spermien beweglich. Die Dialyse gegen 21% DMSO ergab unerwartet hohe Motilitätswerte (90,2%) nach Kryokonservierung (Ergebnisse nicht graphisch gezeigt). Diese sehr hohen Motilitätswerte waren sehr erfolgversprechend für die *in vivo* Versuche. Die Motilität der den Spermatheken entnommenen Spermien wies zwischen den Behandlungsmethoden z.T. starke Unterschiede auf, wie Abb. 90B zeigt. Der größte Anteil beweglicher Spermien in den Spermatheken resultierte aus einer Dialyse gegen 21% DMSO ohne Verdünnung nach dem Auftauen. Fand nach dem Auftauen eine Verdünnung statt, so war die Motilität nur geringfügig niedriger ($p=0,44$). Die niedrigste Motilitätsrate erreichte die Probe, die gegen 13,5% DMSO dialysiert wurde, sie betrug nur ca. 50% und unterschied sich damit signifikant von den beiden anderen Proben Gruppen ($p<0,05$).

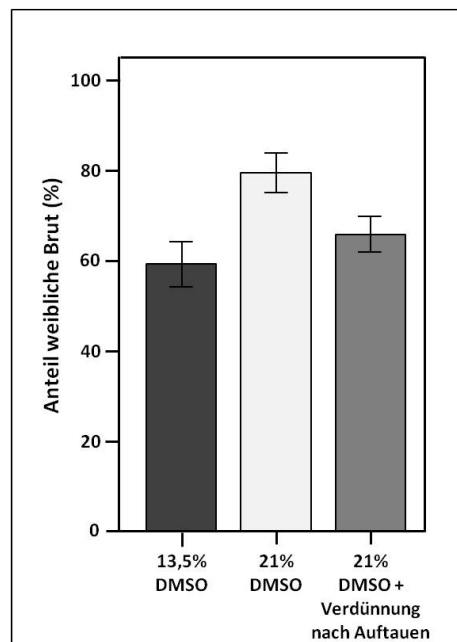
Die größte Anzahl an Spermien in der Spermatheka konnte mit durchschnittlich ca. 1,8 Mio erzielt werden, wenn das Bienesperma gegen 21% DMSO dialysiert wurde und anschließend mit BSS 1:2 verdünnt wurde. Ohne Verdünnung erreichten durchschnittlich ca. 1,25 Mio Spermien die Spermatheka und die geringste Spermienanzahl (ca. 0,6 Mio) resultierte, wenn gegen eine geringere DMSO-Konzentration dialysiert wurde. Signifikante Differenzen konnten trotz der deutlichen Unterschiede nicht verzeichnet werden ($P=0,054$), da die Ergebnisse innerhalb der Proben Gruppen stark schwankte, wie an der hohen Standardabweichungen in Abb. 90A erkennbar ist.

Auch beim Anteil der weiblichen Brut sind Unterschiede erkennbar (Abb. 90C). Die Spermaproben, die vor der Kryokonservierung gegen 21% DMSO dialysiert wurden, erbrachten über 79% weibliche Brut und waren damit am fruchtbarsten. Hier konnte auch eine signifikante Differenz ($P=0,04$) zu den anderen beiden Proben Gruppen ermittelt werden, die sich wiederum zueinander nicht signifikant unterschieden ($P=0,44$). Wurde das Sperma vor dem Einfrieren gegen 13,5% DMSO dialysiert, so produzierten die besamten Königinnen im Durchschnitt 59,2% Arbeiterinnenbrut, wobei die Ergebnisse zwischen 43,8 und 77,8% variierten. Wurden die Spermaproben gegen 21% DMSO dialysiert und nach dem Auftauen 1:2 verdünnt, so wurden zwischen 59,5 und 73% weibliche Brut erreicht ($\bar{\varnothing}=65,8\%$).



A

B



C

Abb. 90: Anzahl (A) und Motilität (B) von kryokonservierten Spermien in Spermatheken von künstlich besamten Königinnen sowie der resultierende Anteil weiblicher Brut (C). Den zur Besamung verwendeten Spermproben wurde vor dem Einfrieren DMSO mittels Dialyse zugesetzt. Der Puffer, gegen den dialysiert wurde, enthielt 13,5% oder 21% DMSO. Die Dialysedauer war der DMSO-Konzentration angepasst und dementsprechend kürzer bei höherem DMSO-Anteil bzw. länger bei niedriger Konzentration des Kryoprotektivums. Nach dem Auftauen wurde ein Teil der gegen 21% DMSO dialysierten Proben mit BSS verdünnt. Insgesamt wurden für diesen Versuch 15 Königinnen besamt.

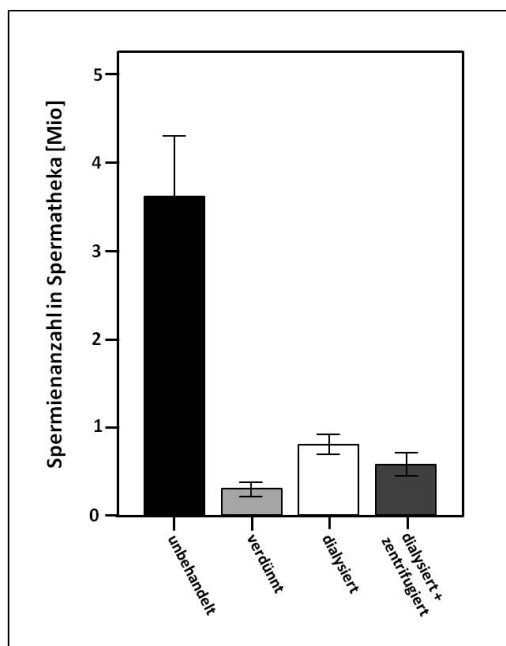
3.7. Abschließende vergleichende Untersuchungen zur Beurteilung der erstellten Kryoprotokolle (z.T.LIB)

In einem weiteren umfangreichen Besamungsversuch wurden drei Modifikationen der Kryotechnik miteinander verglichen. Eine detaillierte Beschreibung der Methoden sind unter 2.8.3. zu finden.

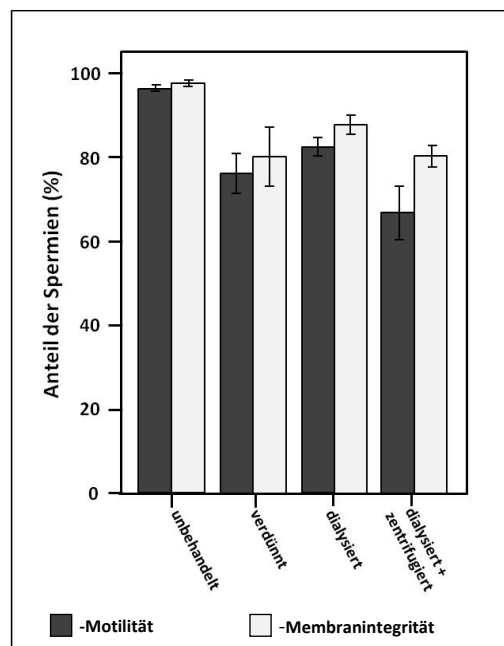
Methode 1: Zusatz von 10% (v/v) DMSO durch Zugabe und Vermischung mit Bienensperma (Verdünnung 1:1,25). Zum Einfrieren wurden die Proben, mit 3°C/min bis -40°C und sofortiger Überführung in N₂. Zum Auftauen wurden die Proben für 10 Sekunden in 35°C warmes Wasser gehalten.

Methoden 2 und 3: Die Spermaproben wurden 32 Minuten gegen 21% DMSO in BSS dialysiert. Zum Einfrieren wurden die Proben, wie in Methode 1 mit 3°C/min bis -40°C gekühlt und anschließend direkt in N₂ überführt. Für das Auftauen wurden die Proben 15 Sek. lang in 35°C warmes Paraffinöl gehalten. In der 3. Methode wurde vor der Besamung noch ein Reinigungsschritt des aufgetauten Spermias durchgeführt. Die Proben wurden mit BSS 1: x verdünnt und anschließend bei 1300xg zentrifugiert.

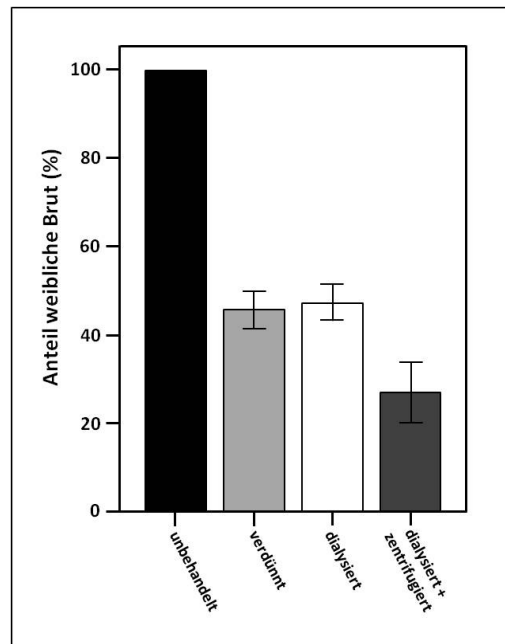
Um die Qualität der Kryoproben und deren Besamungserfolg bewerten zu können, wurden für jede Methode 13-14 Königinnen besamt und die Anzahl der Spermien in den Spermatheken, deren Motilität und Membranintegrität, sowie die Produktion weiblicher Brut bestimmt.



A



B



C

Abb. 91: Anzahl (A), Motilität und Membranintegrität (B) von frischen und kryokonservierten Spermien in Spermatheken von künstlich besamten Königinnen sowie der resultierende Anteil weiblicher Brut (C). Den zur Besamung verwendeten kryokonservierten Spermaproben wurde vor dem Einfrieren DMSO mittels Verdünnung (siehe Beschriftung: verdünnt) oder Dialyse zugesetzt. Die mit „dialysiert + zentrifugiert“ beschrifteten Ergebnisse stammen von Bienenspermienproben, die vor Besamung durch Verdünnung und anschließender Zentrifugation zusätzlich gereinigt wurden. Es wurden 3 Königinnen mit frischem und ansonsten 13-14 Königinnen je Kryomethode mit kryokonserviertem Sperma besamt.

Im Vergleich zum nativen Sperma war die Zahl der Spermien in den Spermatheken nach Besamung mit kryokonserviertem Sperma deutlich geringer (Abb. 91A). Wurde mit frischem, unbehandeltem Sperma besamt, so konnten durchschnittlich über 3,5 Mio. und damit signifikant mehr Spermien in der Spermatheka gezählt werden, als mit jeder kryokonservierten Probe ($p < 0,05$). Mit Kryosperma, dem DMSO durch Verdünnung zugesetzt wurde, konnten durchschnittlich nicht mal 0,5 Mio. Spermien pro Spermatheka gefunden werden. Am besten schnitt das Kryosperma der 2. Methode ab, welches vor Einfrieren gegen eine DMSO-Lösung dialysiert und vor Versamung nicht zentrifugiert wurde. Mit diesem konnten durchschnittlich 0,7 Mio. Spermien die Spermatheka erreichen. Wurde das Kryosperma vor Besamung per Verdünnung und Zentrifugation zusätzlich vom DMSO befreit, so schafften es durchschnittlich ca. 0,5 Mio. Spermien in die Spermatheka.

Auch hinsichtlich Motilität und Membranintegrität der aus den Spermatheken entnommenen Spermien war ein deutlicher Unterschied zwischen Kryosperma und Frischsperma erkennbar (Abb. 91B). Über 95% der Spermien des versamten Frischspermas waren intakt und motil. Die Werte für beide Qualitätsmerkmale aller kryokonservierten

Spermabproben, unabhängig von der Methode, lagen deutlich niedriger und wiesen trotz sichtbarer Unterschiede keine signifikanten Differenzen untereinander auf ($p > 0,05$). Als bestes Kryosperma schnitt das mittels Dialyse mit DMSO versetzte und nach Auftauen nicht zentrifugierte ab (Methode 2). Es wies in den Spermatheken über 80% motile Spermien und ca. 87% Membranintegrität auf. Die beiden anderen Kryoproben lieferten mit ca. 80% Spermien ohne Membranschäden sehr ähnliche Ergebnisse für die Membranintegrität. In der Motilität der Spermien unterschieden sie sich allerdings deutlich. Für die Kryoprobe, der mittels Verdünnung DMSO zugesetzt wurde, konnten in den Spermatheken ca. 85% motile Spermien gezählt werden. Wurde mittels Dialyse DMSO zugesetzt und vor Besamung verdünnt und zentrifugiert, so war nur eine durchschnittliche Motilität von knapp über 65% messbar. Eines der wichtigsten Qualitätsmerkmale von Bienensperma ist der Anteil weiblicher Brut, da er direkt auf die Fruchtbarkeit der Spermienprobe zurückzuführen ist. Auch bei dem hier vorgestellten Besamungsversuch wurden die prozentualen Anteile weiblicher Brut ermittelt (Abb. 91C). Der natürliche Anteil weiblicher Brut nach Besamung der Königin mit Frischsperma beträgt fast 100%. Durch Kryosperma konnten je nach Methode 48% bis 27% weibliche Brut erreicht werden. Wie auch zuvor schnitt die Kryoprobe der 2. Methode (DMSO-Zusatz durch Dialyse) mit 48% am besten ab. Der geringste Anteil Arbeiterinnenbrut wurde mit Kryosperma der 3. Methode erreicht (27%).

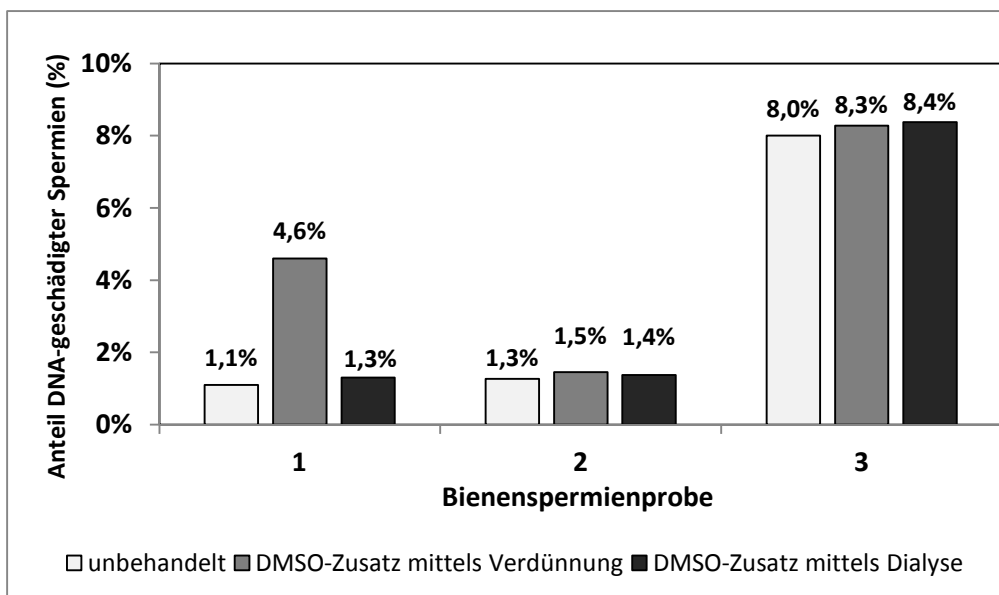


Abb. 92: Prozentualer Anteil DNA-geschädigter Spermien nach Kryokonservierung. Drei Spermabproben wurden in unbehandeltem Zustand und nach Kryokonservierung mit Methode 1 (DMSO-Zugabe durch Verdünnung) sowie Methode 2 (DMSO-Zusatz mittels Dialyse) auf DNA-Schäden hin untersucht. Zur Ermittlung von DNA-Fragmentierungen wurde der TUNEL-Test angewendet (siehe 2.3.8.3.).

Von drei Spermapools wurden je zwei unbehandelte, nach Methode 1 sowie nach Methode 2 kryokonservierte Aliquots mittels TUNEL-Test auf DNA-Schäden untersucht (Abb. 92). Der prozentuale Anteil von Spermien mit DNA-Schäden variierte mit 1,1%-8,4% zwischen den Spermapools, wies allerdings innerhalb eines Pools zwischen den Behandlungsmethoden nur geringe Differenzen auf. Als Ausnahme ist hier der relativ hohe Anteil DNA-geschädigter Spermien der Kryomethode 1 aus dem 1. Spermienpool zu nennen. Diese Probe enthielt mit 4,6% geschädigte Spermien mehr als das Vierfache der unbehandelten Kontrolle. Beim Auftauen dieser Probe fiel auf, dass die Probensäule innerhalb des Probenschlauches verrutschte, was für ein unvollständiges Verschließen spricht. Zwar enthielten die kryokonservierten Proben stets mehr geschädigte Spermien als die unbehandelten Kontrollen, jedoch waren die Unterschiede verschwindend gering. Außerdem konnten keine Differenzen zwischen den Kryomethoden festgestellt werden.

Auch wenn der Anteil weiblicher Brut nach Besamung der Königin mit kryokonserviertem Bienensperma noch deutlich niedriger liegt als mit nativem Sperma, sind die hier erzielten Werte die bislang erfolgreichsten, die bislang beschrieben wurden und sie sind für Zuchtzwecke ausreichend. In neueren Experimenten aus 2014 wurden sogar über 70% weibliche Brut festgestellt, wenn nach Methode 2 kryokonserviertes Bienensperma eingesetzt wurde (Herr [REDACTED], persönliche Mitteilung).

4. Diskussion

Die Gefährdung der Honigbiene und Ansätze zu ihrer Rettung werden immer mehr zu wichtigen Themen in der Gesellschaft und damit auch in der Forschung. Mit wachsendem Interesse und auch Unbehagen wird die Bevölkerung durch angesehene Zeitungen, Radiosender und Fernsehprogramme über den stetigen Rückgang der Bienenvölker und dessen Auswirkungen informiert (Fokus, Süddeutsche, BR, SWR, WDR u.v.m.). Wissenschaftler behandeln zunehmend einzelne Aspekte des Problems und suchen nach Lösungen für diese. Eine der zurzeit meist diskutierten und erforschten Bienenerkrankungen ist die Varroose, also der Befall durch die Milbe *Varroa destructor*. Dieser mit Ausnahme von Australien weltweit verbreitete Parasit stellt laut Rosenkranz et al. (2010) die größte Bedrohung der Honigbienen dar und spielt eine sehr wichtige Rolle beim Rückgang sowohl domestizierter, als auch wilder Honigbienen (Neumann et al., 2012; Thompson, et al., 2014). Die Milbeninfektion verursacht neben direkten Schäden auch eine große Anfälligkeit der Bienen für weitere Pathogene und führt so direkt und indirekt meist zum Zusammenbruch des Bienenvolkes (Annoscia et al., 2012; Yang et al., 2007). Dementsprechend beschäftigen sich viele Forschungsprojekte mit der frühzeitigen Erkennung und wirkungsvollen Bekämpfung der *Varroa destructor* (Rosenkranz et al., 2010; Dulin et al., 2014). Einer der Lösungsansätze ist die Züchtung varroa-resistenter Honigbienen, deren Reinigungsverhalten eine Varroose des Bienenstocks von Anfang an eindämmt (Rosenkranz et al., 2010; Guzman-Novoa et al., 2012; Locke et al., 2012).

Da sowohl Honigbienen als auch Wildbienen gleichzeitig von vielen verschiedenen Parasiten, Pathogenen und Umwelteinflüssen bedroht werden, (siehe 1.2.1.) und sich die genetische Vielfalt schon jetzt ständig verringert (Biesmeijer et al., 2006), ist die Nachfrage nach einer generellen Sicherung des genetischen Materials von Bienen, insbesondere Honigbienen groß. Die langfristige Konservierung von Drohnenspermien stellt eine Möglichkeit für dieses Problem dar und würde viele Vorteile mit sich bringen. Genetisches Material verschiedener, zum Teil gefährdeter (Honig-) Bienenrassen und -populationen könnte konserviert und somit die genetische Vielfalt gesichert werden. Außerdem würde es eine immense Erleichterung und Beschleunigung in der Bienenzucht darstellen. Zeitliche und räumliche Einschränkungen bei der Spermienwahl für Besamungen würden wegfallen und es könnten Spermienproben von Bienenvölkern mit bereits bestätigter Qualität und /oder besonderen Eigenschaften verwendet werden. Der Zuchtfortschritt würde dadurch beschleunigt und ressourcensparender eintreten. Zusätzlich könnte die Spermienkonservierung eine wichtige Rolle bei der Eindämmung von Parasiten und

anderen Erkrankungen spielen, da der Transport lebender Bienen entfällt und dadurch die Gefahr der Pathogenverbreitung erheblich reduziert würde. Doch die Entwicklung einer geeigneten Konservierungsmethode bedarf aussagekräftiger, möglichst zeit- und kostensparender Qualitätstests um den Konservierungserfolg überprüfen und den Befruchtungserfolg vorhersagen zu können. Deshalb wurden im ersten Teil des hier beschriebenen Projektes geeignete Methoden zur Qualitätsbewertung von Bienenspermaproben gesucht und validiert.

4.1. Entwicklung und Validierung aussagekräftiger *in vitro*-Qualitätstests

Eine gute Bienenspermaqualität zeichnet sich letztlich immer durch eine hohe Fruchtbarkeit der Spermien aus, die nach Besamung der Bienenköniginnen in einer möglichst hohen und langfristigen Befruchtungsrate und gesunden, fruchtbaren Nachkommen resultiert. Es gibt recht gut etablierte *in vivo*- Merkmale, mit denen eine Aussage über die Qualität der Spermienprobe möglich wird, ohne den Befruchtungserfolg über Jahre verfolgen zu müssen. Zu diesen gehören die Anzahl der Spermien, die in die Spermatheka eingelagert werden, der Anteil befruchteter, also weiblicher Eier, sowie die Eigenschaften des Brutnestes und die Phänotypen der Nachkommen (Harbo, 1977 und 1979; Kaftanoglu und Peng, 1984; Hopkins und Herr, 2012). Diese Art der Qualitätsbegutachtung bringt allerdings einige schwerwiegende Nachteile mit sich. Zum einen sind diese *in vivo*-Methoden sowohl zeitintensiv als auch kostspielig, da sich das aus der Besamung entstandene Brutnest zunächst entwickeln muss und für die Untersuchungen gut geschultes bzw. erfahrenes Personal notwendig wird. Zum anderen werden bei diesen *in vivo* - Betrachtungen meist alle Versuchstiere getötet, bei Bewertung der Spermienanzahl in der Spermatheka sogar inklusive der wertvollen Königin. Deshalb wäre die Etablierung geeigneter *in vitro* – Schnelltests so wichtig und würde die Entwicklung einer Lagerungsmethode für Bienenspermien beschleunigen, sowie eine kommerzielle Beurteilung von Bienenspermaproben vereinfachen.

In vitro-Tests gibt es nur wenige und diese sind meist nicht anhand von *in vivo*-Daten validiert. Es gibt einige Kombinationen von Fluoreszenzfarben, die an Bienenspermien angewendet wurden. Beispielsweise veröffentlichten Collins und Donoghue 1999 ihre Ergebnisse zu zwei Arten der Doppel-Fluoreszenzmarkierung an Bienenspermien. Diese sogenannten Lebend-Tot-Färbungen wurden bis dahin meist nur für Säuger- und Vogelspermien erfolgreich verwendet und liefern Informationen über den Zustand der Plasmamembranen. Die Kombination aus den Fluoreszenzfarbstoffen SYBR-14, ein grün

fluoreszierender Nukleinsäuremarker, und Propidiumjodid (PI) lieferte bei ihren Versuchen die deutlichsten Signale und wurde deshalb bevorzugt. Ein Vergleich und eine Validierung mit *in vivo*-Daten fanden jedoch nicht statt. Auch in späteren Versuchen wurde diese Doppelmarkierung angewendet, jedoch nicht mit *in vivo*-Daten in Beziehung gesetzt (Collins, 2000; Taylor et al., 2009). Auch ältere Untersuchungen zur Fluoreszenzmarkierung von Bienenspermien (Locke et al., 1990) enthalten keinen *in vivo*-Vergleich. Eine weitere, neuere Untersuchung in diesem Zusammenhang beschäftigt sich mit der Fluoreszenzsignalauswertung mittels Durchflusszytometrie und liefert recht vielversprechende Ergebnisse (Rzymiski et al., 2012). Eine *in vivo*-Validierung fehlt allerdings auch hier.

Eine weitere Eigenschaft, die für die Bewertung der Spermaqualität häufiger herangezogen wird und als gebräuchliches Qualitätskriterium für andere Nutztierarten gilt, ist die Motilität. Diese wird meist in unbehandelten oder nur leicht verdünnten Spermasuspensionen gemessen und soll beweisen, dass die Zellen und ihr Energiehaushalt intakt sind. Die natürliche Fähigkeit der Fortbewegung stellt für die Spermien der meisten Tierarten eine Grundvoraussetzung zur Befruchtung dar. Wie notwendig die Motilität der Bienenspermien für den Transport in die Spermatheka und die später stattfindende Befruchtung wirklich ist, steht jedoch nicht fest und wird z. T. kontrovers diskutiert (Ruttner, 1956; Ruttner und Königer, 1971; Werner und Simmons, 2008). Obwohl die Motilität der Bienenspermien von mehreren Wissenschaftlern als Qualitätskriterium verwendet wurde, ist die Aussagekraft dieses Merkmals bezüglich der Fruchtbarkeit der betreffenden Bienenspermien fragwürdig. So zeigten kryokonservierte Bienenspermien keine reduzierte Motilität - sie war zum Teil sogar erhöht - die Besamung mit diesen eingefrorenen Spermien ergab aber eine erheblich geringere Fruchtbarkeit (Kaftanoglu und Peng 1984). Inwieweit diese Diskrepanz durch methodische Faktoren und/oder für Bienenspermien typische Eigenschaften, wie reversible Immotilität (Lensky und Schindler, 1967; Verma, 1978) bedingt ist und sich die Motilität letztendlich als Qualitätsmerkmal eignet, bleibt also strittig.

Der Bedarf an schnellen aussagekräftigen *in vitro*-Tests ist dementsprechend hoch. In dieser Arbeit wurden zunächst unterschiedliche Zellkompartimente und Funktionen von Bienenspermien betrachtet und nach geeigneten Überprüfungsverfahren gesucht. Anschließend wurden die vielversprechendsten *in vitro* Methoden mit dem häufig verwendeten *in vivo*-Merkmal des Spermatheken-Füllstandes (Anzahl Spermien in den Spermatheken) validiert.

Diskussion

Ein für die Spermaqualität generell wichtiges Merkmal ist die Spermienkonzentration. Diese wird bei Säugersperma entweder zusammen mit der Motilität mittels eines CASA-Systems bewertet (Gangal, 2011) oder durch manuelles Zählen mit sogenannten Zählkammern, siehe Abb.25, ermittelt. Die geringe Größe und durchgehend fädige Form der Bienenspermien verhindert eine Auswertung mit gängigen CASA-Systemen, die einen klaren Kontrast der Spermienköpfe zum Hintergrund und zu den restlichen Spermienkörpern benötigen. Deshalb wurden zunächst manuelle Zählungen am Mikroskop durchgeführt, die Ergebnisse dieser Experimente sind unter 3.1.1. aufgeführt. Eine Spermaverdünnung mit H₂O statt Puffer stellte sich als sehr nützlich heraus, weil damit die Motilität unterbunden wird und sich die meisten Spermien aufgrund des hypoosmotischen Mediums einrollen (vgl. Abb. 25D). Beides erleichtert das manuelle Zählen der dünnen und langen Bienenspermien sehr. Eine weitere große Verbesserung gelang mit dem Einsatz von H342. Dieser Fluoreszenzfarbstoff bindet an die DNA aller Spermien und fluoresziert erst dann stark blau, was die Zählung vereinfacht und sogar eine PC-gestützte Quantifizierung mittels SSIQ ermöglicht (Peters et al., 2002). Eine weitere, für Bienensperma neue Methode der Zellkonzentrationsbestimmung funktioniert über die Messung der Fluoreszenzstärke H342-markierter Spermien suspensionen am Fluorimeter (an Lymphozyten durchgeführt von Blaheta et al., 1993). Mit den gemessenen Fluoreszenzstärken und den Ergebnissen der manuellen Auszählungen für dieselben Proben, ergaben sich für frische und gefrierkonservierte Spermaproben zwei verschiedene Kalibriergeraden mit unterschiedlichen Steigungswerten (siehe Abb. 27). Allerdings zeigen die Korrelationskoeffizienten dieser Geraden ($r^2 = 0,78-0,82$), dass die Messung der Fluoreszenzstärken am Fluorimeter die Spermienkonzentration weniger präzise wiedergibt, als die mikroskopische Analyse.

Grundsätzlich ist die Bestimmung der Zellkonzentration zwar für manche weiteren Analysen sinnvoll, jedoch für die Beurteilung der Spermaqualität nach Gefrierkonservierung eher zweitrangig, da die Kryokonservierung nichts an der Spermiedichte verändert. Deshalb wurden diese Versuche in der weiteren Betrachtung vernachlässigt.

Wie schon erwähnt, reagieren in einer frischen Bienenspermien suspension die meisten Zellen stark auf hypoosmotisches Medium wie Wasser. Sie rollen sich ein und werden immotil. Diese Reaktion ist die Grundlage des sogenannten HOS-Tests, des **hypoosmotischen Schwellungstests**. Dieser Test wurde bislang vor allem an Säugerspermien, wie zum Beispiel Rinder-, Hunde-, Pferde- und auch Menschengpermien durchgeführt (Jeyendran et al., 1984; Kumi-Diaka, 1993; Correa und Zavos, 1994; Neild et

al., 1999) und beruht auf dem Prinzip, dass nur intakte Spermien auf den osmotischen Stress reagieren können (Jeyendran et al., 1992). Damit kann der Test eine Quantifizierung von vitalen Spermienzellen mit funktioneller Plasmamembran ermöglichen und laut Bassiri et al. (2013) sogar Informationen über den DNA-Status liefern. Der HOS-Test funktionierte auch bei Bienenspermien recht gut, in frischen Spermaproben reagierten fast alle Spermien auf den äußeren Reiz (Abb. 28). Die Intensität der Reaktion, also der Einrollung des Flagellums, verstärkte sich mit zunehmender Verdünnung, also abnehmender Osmolalität. Trotz der vielversprechenden Ergebnisse und der einfachen Handhabung wurde dieser Test später nicht standardmäßig durchgeführt, weil die Auswertung dieser Analyse nur durch manuelle Zählung und subjektive Beobachtung geschehen kann.

Wie der HOS-Test so liefert auch eine sogenannte „Lebend-Tot“-Färbung Informationen über den Zustand der Plasmamembranen. Für die hier beschriebene Arbeit wurde eine Kombination aus Hoechst33342 (H342) und Propidiumjodid (PI) verwendet. Diese Farbstoffkombination ist bei Säugerspermien gut etabliert (Celeghini et al., 2007; Sutkeviciene et al., 2009; Celeghini et al., 2010) und wurde auch schon an Bienenspermien erfolgreich angewendet (Locke et al., 1990; Collins und Donoghue, 1999). Es wurden verschiedene Farbstoffkonzentrationen und Inkubationszeiten des rot fluoreszierenden Tot-Farbstoffes PI getestet, da für Eberspermien eine toxische Wirkung des Pls auftrat (nicht veröffentlichtes Ergebnis). Die bei Eberspermien beobachtete Toxizität des PI konnte an Bienenspermien nicht beobachtet werden. Höhere PI-Konzentrationen, sowie längere Inkubationen veränderten den Anteil markierter Spermienzellen nicht. Allerdings war zu beobachten, dass bei höheren PI-Konzentrationen (150µg/ml) die H342-Fluoreszenz abgeschwächt wurde, bzw. nicht, wie gewöhnlich, alle Zellen blau markiert wurden (siehe Abb. 29B). Häufig waren die PI-positiven Spermien nur rot, bzw. leicht violett angefärbt. Dieser Umstand könnte zwei Gründe haben. Zum einen ist eine teilweise Löschung, ein sogenanntes Quenching, der von H342 emittierten blauen Fluoreszenz durch PI zu erwarten, da das von H342 emittierte Licht den Anregungsbereich von PI überlagert (Abb. 93).

Diskussion

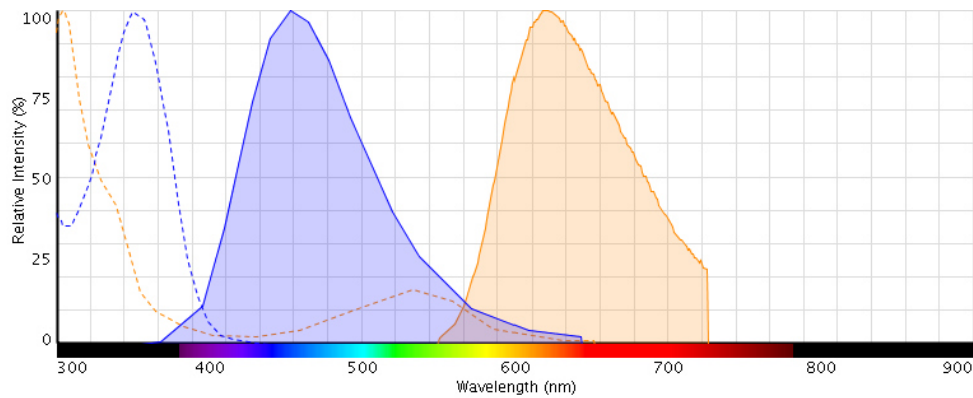


Abb. 93: Excitations- und Emissionsspektren der Farbstoffe H342 und PI. Gezeigt werden die Anregungs- (gestrichelte Linien) und Emissionsspektren (gefärbter Bereich) der Fluoreszenzfarbstoffe H342 (blau) und PI (orange).

Quelle: <http://www.lifetechnologies.com>

Eine andere Möglichkeit ist, dass das PI-Molekül das H342 selbst an der Bindung hindert. Während PI zwischen den Basen der DNA interkaliert ohne bestimmte Basenpaare oder Sequenzen zu bevorzugen, bindet das H342-Molekül nur an min. 3 AT-Basenpaaren in der kleinen Furche (https://www.ipmc.cnrs.fr/fichiers/recherche/microscopie/Sondes/Hoechst_33342.pdf; <https://www.ipmc.cnrs.fr/fichiers/recherche/microscopie/Sondes/PI.pdf>). Es ist also möglich, dass interkaliertes PI, insbesondere wenn eine hohe Konzentration gewählt wurde, die Bindungsmöglichkeiten für H342-Moleküle sterisch behindert. Da die Detektion gerade der PI-Markierungen für die Qualitätsbewertung besonders wichtig ist, wurde die PI-Konzentration weiterhin relativ hoch eingesetzt (150 µg/ml). Die Analysen konnten durch unser Bildauswerteverfahren (SSIQ) objektiv, zeitsparend und jederzeit überprüfbar ausgewertet werden. Nach diesen Analysen nahm der Anteil PI-positiver Bienenspermien mit der Lagerungszeit, der Stärke der Verdünnung und der Intensität der Behandlung zu. Es konnte auch ein Zusammenhang zwischen der PI-Markierung und der Spermienform festgestellt werden, die Ergebnisse dieser Beobachtungen sind in Abbildung 6 dargestellt.

Eine weitere Methode den Zustand der Plasmamembranen innerhalb einer Bienenspermprobe zu ermitteln, stellt die fluorimetrische Aktivitätsmessung der Glukose-Phosphat-Isomerase (GPI) dar. Die GPI ist ein glykolytisches Enzym, das im Zytoplasma der Spermien vorkommt und die in allen Lebewesen unersetzbare reversible Reaktion von Glukose-6-Phosphat zu Fruktose-6-Phosphat katalysiert. In dem fluorimetrischen Verfahren zur Aktivitätsmessung wird durch die GPI Fruktose-6-Phosphat zu Glukose-6-Phosphat umgewandelt und anschließend mittels des Hilfsenzym Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase weiter umgesetzt. Bei der Reaktion des Hilfsenzym entsteht aus dem

oxidierten Coenzym (NADP^+) die reduzierte Form ($\text{NADPH}+\text{H}^+$), die bei 538nm fluorimetrisch messbar ist. Je mehr Spermien Plasmamembranschäden aufweisen, desto mehr GPI-Aktivität ist messbar. Die GPI-Freisetzung wird relativ zur gesamten GPI-Aktivität der Probe nach Ultraschallbehandlung gemessen. Diese Methode hat große Vorteile gegenüber den mikroskopischen Analysen, es ist möglich in kurzer Zeit (ca. 15 Min.) mehrere Proben (bis zu 24 Proben gleichzeitig) zu untersuchen. Zudem ist die Messung objektiv und erfordert vergleichsweise minimale Probenvolumina.

Ähnlich funktioniert auch die ebenfalls durchgeführte Aktivitätsmessung der Isocitrat-Dehydrogenase (ICDH). Da die zu messende NADP^+ -abhängige Isocitrat-Dehydrogenase (EC 1.1.1.42) aber kein rein cytoplasmatisches Enzym ist wie die GPI, sondern teilweise im Lumen der Mitochondrien vorliegt, sollte mit dieser Analyse geprüft werden, ob parallel zur Plasmamembran auch die Mitochondrienmembranen zerstört werden. Die Freisetzung der ICDH war aber gegenüber der GPI-Freisetzung deutlich schwächer und verzögert. Eine Bindung der ICDH an zelluläre Strukturen kann hierfür nicht verantwortlich gemacht werden, da die künstliche Membranzerstörung das Enzym freisetzt. Vielmehr scheint der Test zu zeigen, dass die Mitochondrienmembranen aufgrund ihrer Lage in der Zelle weniger anfällig sind gegen osmotischen Stress und auch gegen Tiefgefrierung als die Plasmamembran.

Obwohl die Aussagekraft der Motilität bei Bienenspermien strittig ist, gehört die Beurteilung der Spermienbewegung zu den etablierten Qualitätsprüfungen. Deshalb wurden verschiedene Analysemethoden zur Motilitätsbewertung gesucht und überprüft. Die Einfachste beruht auf mikroskopischer Betrachtung und Schätzung des Anteils motiler Spermien in einer Probe. Diese Methode ist extrem vom jeweiligen Betrachter und dessen subjektiven Eindruck abhängig, außerdem sind die Ergebnisse später nicht nachvollzieh- und überprüfbar. Eine weitere Problematik, die während der Untersuchungen aufgetreten ist, stellt die reversible Immotilität dar (Lensky und Schindler, 1967). Bienenspermien die sich zum Zeitpunkt der Betrachtung nicht bewegen und deshalb fälschlicherweise dem immotilen Anteil zugerechnet werden, fangen kurze Zeit später an sich spiralig zu drehen.

Da die Spermien sehr dünn und wenig kontrastreich sind, hat sich die Kern-Anfärbung mit H342 bewährt. Die Bewegung der markierten Spermien kann dann mit Hilfe von Langzeitbelichtungsaufnahmen festgehalten und später am PC ausgewertet werden. Damit erhält die manuelle Auswertung den Vorteil überprüfbar und objektiver zu werden. Außerdem wurde beobachtet, dass die Motilität der Bienenspermien für eine kurze Dauer

Diskussion

(einige Min.) stark zunimmt, wenn die Probe mit UV-Licht bestrahlt wird. Das verringert das oben beschriebene Problem, erfordert aber eine zügige Durchführung.

Eine weitere Möglichkeit der Motilitätsbeurteilung stellt die Analyse von kurzen Videosequenzen H342-markierten Bienenspermien dar. Das in der Entwicklung befindliche Verfahren (CASANova) kombiniert die Möglichkeit gleichzeitig Zellkonzentration, Bewegungsparameter, spezielle Fluoreszenzmarkierungen (z.B. Antikörper-gekoppelte Farbstoffe) und den Grad der Agglutination (Hinweis auf Akrosomreaktion) in der Probe zu ermitteln. Diese umfangreiche Kombination verschiedener physiologischer Parameter ist mit den herkömmlichen CASA-Systemen nicht möglich. Die Entwicklung eines solch umfangreichen Programmes ist schwierig und langwierig und lässt ständig neue Probleme auftreten. Deshalb konnten während des Projektes nur wenige Proben mit CASANova untersucht werden und es musste auf das herkömmliche Schätzverfahren zurückgegriffen werden.

Um festzustellen welcher der bislang vorgestellten Analysen eine aussagekräftige Qualitätsbeurteilung ermöglicht, wurden die Ergebnisse zunächst untereinander verglichen und auf signifikante Korrelationen hin untersucht. Die Doppelmarkierung mit H342 und PI korreliert mit dem GPI-Test und steht zudem in einem antiproportionalen Zusammenhang mit der Motilitätsmessung (siehe Abb. 43A/B). Für die ICDH-Messung lässt sich solch ein Zusammenhang allerdings nicht bestätigen, was aus dem Bestimmtheitsmaß von $r=0,350$ für das Streudiagramm der ICDH- und H342/PI-Werte hervorgeht (Abb. 43C). Weitere Berechnungen ergaben zusätzlich antiproportionale Zusammenhänge zwischen dem Quotienten $GPI_{\text{gemessen}} / GPI_{\text{maximal}}$ und der DMSO-Konzentration in einem Bereich von 0-10,5% (v/v), sowie zwischen der DMSO-Konzentration und dem Anteil PI-markierter Spermien. Für die Motilität konnte wiederum ein entgegengesetzter Zusammenhang erkannt werden. Bei dem Vergleich der *in vitro*-Daten mit dem *in vivo*-Merkmal des Spermathekenfüllstandes wiesen sowohl die Motilität, die H342/PI-Färbung, der HOS-Test und auch der GPI-Test eine Korrelation mit dem Spermathekenfüllstand auf. Einzige Ausnahme bildete wieder der ICDH-Test, der auch mit dem *in vivo*-Merkmal keinen Zusammenhang erkennen ließ.

Aufgrund der Schnelligkeit und Objektivität des GPI-Tests, wurde diese Analyse bei den nachfolgenden Versuchen meist als erstes verwendet, doch auch die Motilitätsmessung und die H342/PI-Färbung wurden weiter eingesetzt. Der HOS-Test wurde nicht weiterverwendet, da er recht zeitaufwendig ist und nur manuell ausgewertet werden kann.

Doch außer der Unversehrtheit der Plasmamembran, der Reaktion auf äußere Reize und der Bewegungsfunktion gilt es geeignete Methoden zur Untersuchung weiterer Merkmale zu finden, bzw. zu entwickeln. Ein wichtiges Kriterium, das alle Samenzellen erfüllen müssen, um eine erfolgreiche Befruchtung und gesunde Nachkommen zu gewährleisten, ist die Unversehrtheit der DNA. Gerade, wenn eine Kryokonservierung geplant ist und bei dieser evtl. DMSO, die DMSO-Toxizität wird später noch näher betrachtet, oder andere Kryoprotektiva zum Einsatz kommen, ist es notwendig die Struktur der DNA zu untersuchen. Auch für den Vergleich von Bienenvölkern untereinander, bzw. für die Ursachensuche bei nicht erfolgreicher Befruchtung könnte der DNA-Status Informationen liefern. Es gibt einige mehr oder weniger etablierte Verfahren zur DNA-Untersuchung. Meistens handelt es sich um mikroskopische Verfahren, die z.T. auch in der Durchflusszytometrie Anwendung finden. All diese Analysen sind für die Untersuchung von Säugerspermien-DNA entwickelt und noch nicht an Insektenspermien, insbesondere Bienenspermien angewendet worden. Von diesen mehr oder weniger gut etablierten Verfahren wurden mehrere zunächst an Eberspermien und erst bei vielversprechendem Ergebnis an Bienenspermien getestet.

Der **AcridinOrange-Test (AOT)** (siehe 3.1.8.1.) zum Beispiel liefert Informationen über das Verhältnis von ssDNA zu dsDNA mittels der dichromatischen Eigenschaften des Fluoreszenzfarbstoffes Acridinorange. Der AOT wird vor allem bei Untersuchungen mit humanen Spermien verwendet (Tejada et al., 1984; Hoshi et al., 1993; Virant-Klun et al., 2002), wobei er nicht immer zufriedenstellende Ergebnisse lieferte (Claassens et al., 1992; Chohan et al., 2006). Das Verfahren funktionierte zwar tendenziell und lieferte somit Spermien mit verschiedenen Grün-, Gelb- und Rot-Fluoreszenzen, doch eine klare Differenzierung war unmöglich, da die Farbtöne, wie auch bei Chohan et al. (2006) beschrieben wird, ineinander übergingen. Nur mit Hilfe eines Durchflusszytometers, das die Quantifizierung von Fluoreszenzsignalen festgelegter Wellenlängen ermöglicht, ist die Auswertung des AOT aussagekräftig. Eine Quantifizierung, die ausschließlich auf den mikroskopischen Beobachtungen beruht, ist dagegen höchst subjektiv und kaum nachvollziehbar. Da zum Zeitpunkt des Experiments nur eine Schwarz-Weiß-Kamera zur Verfügung stand, konnte der vorgefundene Zustand für eine nachfolgende Auswertung auch nicht festgehalten werden.

Eine weitere, relativ neue Methode der DNA-Untersuchung stellt das sogenannte Sperm Chromatin Dispersion Assay, kurz SCD dar (Fernandez et al., 2003). Bei dieser Methode ist es notwendig die mehr oder weniger stark ausgeprägten Lichthöfe der mit DNA-Farbstoff

Diskussion

markierten Spermienköpfe zu differenzieren und zu quantifizieren. Damit die „Halos“ entstehen, sind die Spermien dabei in Agarosegel eingebettet. Auch dieses Experiment wurde zunächst an Eberspermien durchgeführt. Obwohl die Einbettung sowie die Halo-Entstehung durchaus funktionierten, waren, anders als es Chohan et al. (2006) und Zhang et al. (2010) für Humanspermien beschreiben, eine klare Differenzierung und damit auch eine Quantifizierung nicht möglich. Da die Spermien in verschiedenen Ebenen lagen, gelang es nicht gleichzeitig alle Zellen zu fokussieren, was dazu führte, dass die „Halos“ nicht scharfgestellter Zellen fälschlicherweise größer wirkten.

Bei der dritten Methode, die getestet wurde, handelt es sich um den sogenannten TUNEL-Test. Bei diesem Verfahren wird in einer enzymatischen Reaktion an Fluorescein gekoppeltes UTP an freie 3'-OH-Enden der DNA gebunden. Dadurch werden Einzel- und Doppelstrangbrüche markiert. Das Prinzip ist einfach, je geschädigter die DNA, desto mehr Strangbrüche sind vorhanden und desto stärker wird das Fluoreszenzsignal des Spermienkopfes. Wie schon unter 2.3.8.3. beschrieben handelt es sich um ein gut etabliertes Verfahren, das häufig für Menschen- und andere Säugerspermien angewendet wird (Chohan et al., 2006; Martins et al., 2007; Zhang et al., 2010) und für das ein Versuchskit der Firma Roche verwendet werden kann (Ramos und Wetzels, 2001; Dominguez-Fandos et al., 2007).

Die Methode funktioniert nur an Bienenspermienausstrichen, zeigt dann aber eine deutliche Fluoreszenz geschädigter Spermien. Die Positiv- und Negativkontrollen bestätigten, dass die Methode funktioniert und somit auch an Bienenspermien angewendet werden kann. Als standardmäßiger Schnelltest eignet sich das TUNEL-Assay jedoch nicht, ist die Auswertung der erstellten Fluoreszenzbilder doch viel zu zeit- und arbeitsaufwendig. Außerdem beweisen die TUNEL-Versuche an verschiedenen Bienenspermasuspensionen, dass der Spermienanteil mit geschädigter DNA in gewöhnlichen Spermaproben meist sehr gering ist und nur wenig variiert. Der Test macht also nur für Proben Sinn, bei denen eine geschädigte DNA zu vermuten ist.

Ein für Spermien typisches Zellkompartiment ist das Akrosom, tatsächlich ist die Existenz dieser einzigartigen Struktur ausschließlich auf Spermazellen beschränkt (Afzelius, 2006). Bei Säugerspermien wird die Unversehrtheit des Akrosoms häufig untersucht und als Qualitätsmerkmal angesehen (Didion et al., 1989; Kovács und Foote, 1992; Vázquez et al., 1996; Nagy et al., 2003), denn nur Samenzellen mit intaktem Akrosom sind fähig eine Akrosomenreaktion durchzuführen, die wiederum für das Durchdringen der Zona pellucida und damit für die Befruchtung äußerst wichtig ist (Tulsiani et al., 1998; Abou-haila und

Tulsiani, 2000). Dass die sogenannte Akrosomenreaktion für die Befruchtung von Säuger-Eizellen von großer Bedeutung ist, steht außer Frage, allerdings wird der genaue Zeitpunkt der Initiierung dieses exozytotischen Vorganges für verschiedene Spezies kontrovers diskutiert (Huang et al., 1981; Fazeli et al., 1997).

Inwieweit das Akrosom bei Bienenspermien für die Befruchtung notwendig ist, bleibt unklar, dennoch besitzen auch Bienenspermien diese spezielle Struktur (Hoage und Kessel, 1968; Phillips, 1970), was auch eine Funktion dieser Zellstruktur nahelegt. Deshalb wurde nach einer Möglichkeit gesucht, diese zu markieren und ihren Zustand zu prüfen. Doch alle getesteten, für Säugerspermien gebräuchlichen Verfahren waren nicht auf Bienenspermien übertragbar. So gelang weder eine Fluoreszenzmarkierung mit den an Säugerspermien häufig angewendeten Agglutininen PSA (Casey et al., 1993; Cross und Watson, 1994; Sukardi et al., 1997) oder PNA (siehe 3.1.9.1), noch eine antikörpervermittelte Markierung des Akrosins (3.1.9.2.), einer für Akrosomen typischen Peptidase (Schleuning und Fritz, 1976; Kennedy et al., 1989). Auf der Suche nach einer Markierungsmethode für Bienenspermienakrosomen wurden verschiedene Antikörperpräparate auch eines gegen Hexokinase getestet. Mit diesem wurden lokal begrenzte Fluoreszenzmarkierungen detektiert, die besonders im Bereich des Akrosoms auftraten. Es zeigte sich, dass die Ausdehnung und Leuchtkraft der Fluoreszenzsignale, sowie die Anzahl markierter Spermien mit Behandlungsstärke und sogar Probenalter zunimmt. Wurden für den Versuch frische Spermaproben und ein möglichst schonendes Markierungsverfahren gewählt, fand man bei ca. 44% der Spermien eine Fluoreszenzmarkierung, allerdings waren diese meist punktförmig an der Akrosomenspitze und schwach. Mit einer weniger schonenden Methode wurden dagegen über 80% der Spermien markiert und die Fluoreszenzen waren weit ausgedehnter und stärker. Kurzzeitiges Einfrieren führte ebenfalls zu starken und ausgedehnten Fluoreszenzen, die nicht nur das Akrosom betrafen, sondern auch am Flagellum zu finden waren. Diese Versuche zeigen, dass durch den Antikörper nicht das Akrosom markiert wird, sondern die Hexokinase, die auch an den Membranen des Kopfbereichs lokalisiert ist (Travis et al., 1998), und dass die Plasmamembran besonders empfindlich im Bereich des Akrosoms reagiert. Dass allerdings in einer frischen (1 Tag alten) Spermaprobe schon 44% markierte Spermien vorgefunden wurden, könnte methodisch bedingt sein. Die Markierungsmethode wurde mittlerweile an Eberspermien weiter optimiert, wodurch der Anteil markierter Spermien in frischen Proben unter 10% sank (Senel, 2015). Wie bei Bienenspermien so ist auch an Eberspermien die Abfolge der Markierung mit dem Hexokinase-Antikörper ähnlich. Während der Lagerung von Ebersperma unter Bedingungen wie sie in der Schweinezucht erfolgt, sind zunächst nur

kleine Spots am Akrosom und im Halsbereich erkennbar, dann ist das Akrosom vollständig markiert, später ist der gesamte Kopf gefärbt und zuletzt sind auch am Flagellum Markierungen erkennbar (Abb. 59 A-F). Diese immunologische Fluoreszenzmarkierung mittels Anti-HK hat unerwartete Ergebnisse erbracht, die hinsichtlich der Heterogenität der Plasmamembran neue Ergebnisse liefern kann. Allerdings sind weitere Analysen zu den Bindungseigenschaften des Antikörpers erforderlich.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass mit dem GPI-Test ein schneller, anwenderfreundlicher und kostengünstiger Vitalitätstest, der zudem gut mit *in vivo* Daten korreliert, zur Verfügung steht. Mit diesem Test kann der Zustand der Plasmamembran ermittelt werden (Parks und Graham, 1992; Oehninger et al., 2000; Harrison und Vickers, 1990; Flesch und Gadella, 2000; Celeghini et al., 2007), was für die Entwicklung einer Kryokonservierungsmethode von entscheidender Bedeutung ist. Ersatzweise kann auch die zeitlich aufwändigere Fluoreszenz-Doppelmarkierung mit H342 und PI als Primärtest dienen. Die Bewertung der Motilität erfordert weit größeren Aufwand. Weitere Tests (z.B. DNA-Zustand) scheinen für die Entwicklung der Kryokonservierungstechnik zunächst zweitrangig, sollten aber zur weiteren Evaluierung eingesetzt werden.

4.2. Vorversuche zur Kryokonservierung - Einfluss verschiedener Faktoren auf die Spermiovitalität

Spermien vieler Haus- und Nutz-, aber auch Wildtiere werden kryokonserviert, um sie zeitlich unbegrenzt lagern zu können ohne deren Funktionalität und Fruchtbarkeit zu verlieren. Diese Tieftemperaturlagerung ist für die Sicherung der Artenvielfalt und für die Reproduktionsmedizin und Tierzucht von großer Bedeutung. Ein beeindruckendes Beispiel aus der Landwirtschaft, das aufzeigt, wie sehr die Kryokonservierung an Stellenwert gewonnen hat, ist die Milchvieh- und Fleischrinderzucht. Während vor 1950 fast ausschließlich Frischsperma für alle künstlichen Befruchtungen verwendet wurde, ist heutzutage die Kryokonservierung von Rindersperma und der Verkauf dieses Kryospermas ein wichtiger weltweiter Wirtschaftszweig und aus der modernen Rinderzucht nicht mehr wegzudenken. Die Kryokonservierung von Eberspermien hat sich dagegen nicht etabliert. Die hohe Sensibilität dieser Zellen gegen Kälteschock (Barbas und Mascarenhas, 2009), sowie starke individuelle Schwankungen (Benson et al., 2012b) erschweren die Erstellung einer einheitlichen Kryomethode.

Wie an diesen Beispielen gezeigt, reagieren Spermien verschiedener Spezies sehr unterschiedlich auf Kryokonservierungstechniken. Barbas und Mascarenhas (2009) stellten

eine negative Korrelation zwischen der Größe des Spermienkopfes und der Kryostabilität bei vergleichenden Untersuchungen an Haus- und Nutztieren fest. Überträgt man dieses Ergebnis auf Bienenspermien, so sollten diese dementsprechend relativ resistent gegen Kälte und damit gut für eine Kryokonservierung geeignet sein, denn sie besitzen besonders schmale Köpfe.

Doch die Anforderungen an eine erfolgreiche Bienenspermakonservierung sind im Vergleich zur Rinderzucht immens hoch. In der Rinderzucht reicht theoretisch ein fruchtbares und funktionstüchtiges Spermium pro Besamungsportion zur Erreichung des Besamungserfolges, also zur Erzeugung eines Kälbchens aus. Die durchschnittlich 30-40% intakten Spermien nach Kryokonservierung, siehe dazu Benson et al. (2012b), sind dementsprechend absolut ausreichend, wenn auch eine Verbesserung wünschenswert wäre. Bei Bienen ist der Sachverhalt, bedingt durch das einzigartige Besamungsverhalten und die einmalige Sozialstruktur, völlig anders (Tautz, 2007). Jede Besamungsportion sollte genügend fruchtbare und funktionell intakte Spermien enthalten, um über einen längeren Zeitraum, wenn möglich über ein Jahr, eine genügend hohe Legeleistung der Bienenkönigin zu gewährleisten. Nur wenn die Königin genügend befruchtete also weibliche Eier legt, kann ein funktionierendes und widerstandsfähiges Bienenvolk entstehen.

Die ersten Versuche zur Kryokonservierung von Bienenspermien begannen in den 70er Jahren (Melnichenko und Vavilov, 1975 und Harbo, 1977, 1979). In den frühen 80er Jahren wurden dann weitere Experimente zur Gefrierkonservierung von Bienenspermien von Harbo (1983) und Kaftanoglu und Peng (1984) durchgeführt. Beide Gruppen verwendeten DMSO als Kryoprotektivum und erzielten zum Teil eine relativ hohe Motilität nach Auftauen (Kaftanoglu und Peng, 1984), allerdings war die Fruchtbarkeit des kryokonservierten Spermias stets nur sehr gering. So konnten Kaftanoglu und Peng nach Versamung des Kryospermias zwar einen weiblichen Brutanteil von durchschnittlich 56% verzeichnen, allerdings wurden für die Versamung nur die besten Proben mit hoher Motilität verwendet.

Lange Zeit wurden keine neuen Arbeiten zu diesem Thema vorgestellt. Anfang des 21. Jahrhunderts, bedingt durch die verstärkte Gefährdung der Honigbiene und rückläufige Völkerzahlen, wurde neues Interesse an der Langzeitlagerung von Bienenspermien geweckt. 2009 veröffentlichten Taylor et al. ihre Arbeit zur systematischen Betrachtung einiger Faktoren, die die Kryokonservierung von Bienenspermien beeinflussen. Dabei verwendeten sie die Motilität vor Konservierung und den Anteil Spermien mit intakter Plasmamembran nach dem Auftauen als Qualitätskriterien des Bienenspermias. Das beste Ergebnis wurde mit DMSO als Kryoprotektivum und einem zur Spermathekaflüssigkeit

Diskussion

leicht hypoosmotischen Medium mit Kalium, Bicarbonat und einem alkalischen pH von 8,1 erreicht. Außerdem erwies sich in dieser Untersuchung eine etwas stärkere Verdünnung des Spermias von min. 6:1 als vorteilhaft. Unter diesen Umständen konnten bis zu 64% lebende, bzw. membranintakte Spermien nach Kryokonservierung erreicht werden. Was bei diesen vielversprechenden Untersuchungen fehlt, ist eine Versammlung des Kryospermias und damit eine Bestätigung der Spermaqualität durch *in vivo* Daten. Nach weiteren, ähnlichen Experimenten (vgl. Hopkins und Herr, 2010) führten erstmals 2012 Hopkins und Herr ein solches Besamungsexperiment mit Kryosperma durch. Sie untersuchten dabei nicht nur den Befruchtungserfolg der besamten Königinnen, sondern auch die Legeleistung von mit Kryosperma besamten Königinnen, die selbst aus Kryosperma entstanden sind. Durchschnittlich wurde ein weiblicher Brutanteil von 50% erreicht, wobei die Werte zwischen den 5 Königinnen stark schwankten (zwischen 0% und 100%). Auch in der ersten Tochtergeneration differierten die Anteile weiblicher Brut zwischen den 6 besamten Königinnen sehr stark, es wurden Werte zwischen 0% und 95,6% erreicht, wobei sich ein Durchschnitt von ca. 46% ergab. Eine interessante Beobachtung, die von den Wissenschaftlern gemacht wurde, betrifft die Dauer der Legeleistung und die Lebenserwartung der Königinnen. Während alle mit Frischsperma besamten Kontrollköniginnen die ganze Saison über befruchtete Eier legten, verschwanden mit Kryosperma besamte Königinnen nach ca. 2 Monaten aus ihren Bienenstöcken. Dieses Verhalten könnte zwei mögliche Gründe haben: Erstens eine zu niedrige Spermienanzahl in den Spermatheken und/oder zweitens einen negativen Effekt des Verdünners und/oder des Kryoprotektivums auf die Königin. Diese Annahme wird durch Ergebnisse von Wegener und Bienefeld (2012), die eine starke toxische Wirkung von DMSO auf Bienenspermien und Bienenköniginnen beschreiben, gestützt. Eigene, im Zuge dieses Projektes durchgeführte Versuche zur DMSO-Toxizität geben klare Hinweise darauf, dass hohe Konzentrationen (30% v/v) sowohl die Motilität als auch die Membranintegrität von Bienenspermien stark reduzieren (siehe 3.2.2.1 und 3.2.2.2.). Dagegen scheint eine DMSO-Konzentration von 10% (v/v) von Bienenspermien gut toleriert zu werden und keine direkten Schäden zu verursachen. Im Gegensatz zu frühen Untersuchungen von Harbo (1977) hat DMSO nach den hier durchgeführten Untersuchungen (siehe Abb. 68) einen immensen Einfluss auf den Füllungsgrad der Spermatheka. Sind normalerweise weit mehr als eine Million Spermien, häufig sogar 3-5 Mio., in der Spermatheka nach Besamung nachweisbar, so schaffen es nur ca. 0,6 Mio Spermien in die Samenblase, wenn die Probe DMSO-haltig ist. Wie schon erwähnt, steht dieses Ergebnis in krassem Widerspruch zu den Beobachtungen Harbos, die er 1977 gemacht hat. Er konnte keinen negativen Effekt auf den Füllungsgrad der

Spermatheka durch 10% (v/v) DMSO erkennen. In späteren Untersuchungen schließt Harbo (1986) jedoch nicht aus, dass DMSO zur Sterilität der aus DMSO-haltigem Sperma entstandenen Königinnen führt und empfiehlt weitere Analysen. Doch wie die Untersuchungen von Wegener und Bienefeld (2012) zeigen, nimmt DMSO diesbezüglich keine Sonderstellung ein. Alle gängigen Kryoprotektiva üben, wenn sie mit versamt werden, einen solch negativen Einfluss auf den Besamungserfolg aus. Eine Möglichkeit den negativen Effekt eines Kryoprotektivums zu minimieren, ist die Verwendung mehrerer Schutzstoffe bei gleicher Gesamtkonzentration (Wegener und Bienefeld, 2012). Die Ergebnisse des Besamungsversuches, der beweist, dass ein Mix aus mehreren Schutzstoffen vorteilhafter ist als der Einsatz eines Kryoprotektivums in gleicher Konzentration, sind in Abb. 48 dargestellt. Aus diesem Grund wurde sowohl bei den Vitrifikationsversuchen als auch bei dem slow Freezing versucht DMSO zumindest teilweise zu ersetzen. Als zusätzlicher Schutzstoff wurde das Disaccharid Trehalose eingesetzt. Es konnte gezeigt werden (siehe 3.2.3. und Abb. 69), dass eine Trehalosekonzentration von 45-60mM unabhängig der DMSO-Konzentration einen positiven Effekt auf die Membranintegrität von Bienenspermien ausübt, während sich höhere Konzentrationen des Zuckers (z.B. 90mM) eher negativ auswirken. Der Einsatz von Trehalose in der Kryokonservierung ist nicht ungewöhnlich (Benoit et al., 2009; Aisen et al., 2002; Rudolph und Crowe, 1985), da er als Blutzucker der Insekten und natürlich vorkommendes Protektivum in der Natur weit verbreitet ist (Bale, 2002; Crowe et al., 1992, 1996). Es konnte gezeigt werden, dass Trehalose bei anhydrobiotischen Vorgängen Biomembranen effektiv schützt und gleichzeitig eine Vitrifikation begünstigt (Crowe et al., 1996, 1998).

Neben der Zusammensetzung des Spermaverdünners übt auch die Osmolalität einen starken Einfluss auf die Membranintegrität der Bienenspermien aus. Auch Taylor et al. (2009) erkannten die Bedeutung der Osmolalität und beschrieben eine hohe Empfindlichkeit der Bienenspermien gegenüber eines hyperosmotischen Mediums, weshalb zu einem leicht hypoosmotischen Medium geraten wurde.

Außer der Zusammensetzung der Einfrierlösung und der Einfrier- und Auftaugeschwindigkeit spielen noch weitere Faktoren eine wichtige Rolle. Diese sollten teilweise schon vor Beginn der Kryokonservierungsversuche beleuchtet und festgelegt werden. So auch die Größe und Beschaffenheit des Probengefäßes. Sowohl Plastik- als auch Glasröhrchen wurden in der Kryokonservierung von Bienenspermien schon angewendet (Taylor et al., 2009; Hopkins und Herr, 2010; Harbo, 1979, 1983). Das Verschließen der Probe geschah dabei meist durch in die Röhrchen eingezogene Vaseline. In der aktuellen

Untersuchung wurden zwei verschiedene Glaskapillaren und Teflonschläuche unterschiedlichen Durchmessers miteinander verglichen. Neben der ermittelten Membranintegrität waren auch Wirtschaftlichkeit und vor allem Handhabung wichtige Entscheidungskriterien. Aus diesem Grund wurde ein Teflonschlauch mit 0,4mm Innendurchmesser ausgewählt. Er besitzt die Vorteile mittels Standardpipette unkompliziert befüll- und entleerbar zu sein, niedrigste Temperaturen (-196°C) auszuhalten, antiadhäsive Eigenschaften vorzuweisen und bruchstabil zu sein. Außerdem ist er auf verschiedenen Wegen verschließbar, so zum Beispiel durch Klemmen, Verschweißen und Verstopfen mittels Vaseline oder verkürzter Stecknadel. Neben Zusammensetzung und Osmolalität des Verdünners sowie Art des Kryogefäßes wirkt sich auch das Volumen der Probe auf die Membranintegrität aus (vgl. 3.2.4.). Es zeigte sich, dass größere Probenvolumina zu bevorzugen sind, da in größeren Probenmengen der Anteil membrangeschädigter Spermien niedriger ausfällt. Das könnte mit dem veränderten Oberflächen-Volumen-Verhältnis und der damit verbundenen ROS-Belastung zusammenhängen. Je kleiner das Volumen, desto größer das Oberflächen-Volumen-Verhältnis, also desto mehr Spermien sind verhältnismäßig an der Grenzfläche zur Luft und stehen unter erhöhter oxidativer Belastung. Sogenannte reaktive Sauerstoffspezies (ROS) werden, wenn sie in höherer Konzentration auftreten, als schädlicher (Barbas und Mascarenhas, 2009; Aitken und Bennetts, 2006) und für eine erfolgreiche Konservierung limitierender Faktor angesehen (Medeiros et al., 2002; Thomson et al., 2009; Wegener et al., 2012). Auch die im Zuge des vorgestellten Projektes durchgeführten und in Wegener et al. (2014) beschriebenen Besamungsexperimente bekräftigen die Annahme, dass ein größeres Probenvolumen vorteilhaft ist.

4.3. Entwicklung eines geeigneten Kryokonservierungsprotokolls

Nachdem einige Faktoren festgelegt werden konnten, wurde mit den eigentlichen Kryokonservierungsversuchen begonnen. Man unterscheidet grundsätzlich zwei Strategien des Einfrierens, das sogenannte Slow Freezing und die Vitrifikation. Für die Kryokonservierung von Bienenspermien wurde bislang fast ausschließlich nach einem Slow Freezing Protokoll geforscht. Einzig die Untersuchungen von Hopkins und Herr (2010) schlossen wenige Vitrifikationsversuche mit ein. Jedoch ist davon auszugehen, dass keine wirklichen Vitrifikationen durchgeführt wurden, da zwar hohe Abkühlraten jedoch nur 10% (v/v) Kryoprotektivum verwendet wurden. Um einen glasartigen Zustand in einer wässrigen

Lösung zu erhalten sind allerdings min. 30% (v/v) bzw. 5-7M an Kryoprotektivum erforderlich (Barbas und Mascarenhas, 2009; Pegg, 2002; Gao und Critser, 2000).

Die Methodik der Vitrifikation ist aus zwei Gründen vielversprechend. Zum einen bedarf sie keiner teuren, großen und schwer zu bedienenden Apparaturen sondern nur N_{2l} und kann somit quasi überall und von jedem Imker durchgeführt werden. Zum anderen werden typische Kryoschäden wie Kälteschock, Schäden durch Eiskristallisation (besonders intrazelluläre Eiskristallisation) sowie sogenannte Lösungseffekte unterdrückt. Allerdings berichten viele Wissenschaftler von der zum Teil sehr starken osmotischen und chemischen Toxizität der hohen Kryoprotektivum-Konzentrationen (Barbas und Mascarenhas, 2009; Gao und Critser, 2000) und raten generell von einer klassischen Spermien-Vitrifikation ab. Das spiegelt sich auch in der bisherigen Vitrifikationsforschung, die hauptsächlich mit Oozyten, Embryos und nur äußerst selten mit Spermien arbeitet, wider (Kuleshova und Lopata, 2002; Woods et al., 2004). Barbas und Mascarenhas (2009) beschreiben für die meisten Säugerspermien eine starke Sensitivität gegenüber hohen Kryoprotektivumkonzentrationen und eine niedrige osmotische Toleranz und sehen darin den Grund für fehlgeschlagene Vitrifikationsversuche.

Dennoch fanden im Zuge des vorgestellten Projektes umfangreiche Vitrifikationsversuche statt. Ein zusätzliches Abkühlexperiment bis 5°C zeigte, dass trotz 15 minütiger Lagerung in 30% (v/v) DMSO immerhin noch 84% intakte Spermien für die Vitrifikation zu Verfügung stehen. Allerdings nur, wenn das DMSO erst nach Abkühlung auf 5°C zugesetzt und die anfängliche Verdünnung bei Raumtemperatur (23°C) mit dem trehalosehaltigen BSS+ durchgeführt wird. Sowohl eine DMSO-Zugabe von 10% (v/v) bei Raumtemperatur als auch die Verdünnung mit einem Puffer ohne Trehalose (Kiev-Puffer, BSS ohne Trehalose und mit /ohne DMSO) resultierten in einem deutlich geringeren Anteil intakter Spermien nach Abkühlung (51-58%). Um die Toxizität des DMSOs wenn möglich zu reduzieren, wurden für die Vitrifikationstests verschiedene Kryoprotektiva alleine und in Gemischen eingesetzt. Es wurden stets Gesamtkonzentrationen von $\geq 30\%$ (v/v) verwendet, um einen amorphen glasartigen Zustand erreichen zu können. Sowohl etablierte membrangängige Kryoprotektiva wie DMSO, Glycerin und Ethylenglykol als auch Di- und Polysaccharide wie Saccharose, Ficoll und Dextran (Viudes de Castro et al., 2010) wurden berücksichtigt. Die für Vitrifikationen benötigte hohe Einfrierrate wurde durch direktes Überführen in N_{2l} gewährleistet, wobei dem Einfrieren teilweise eine langsame Abkühlung auf bis zu 0°C bzw. 5°C mit anschließender Schutzstoffzugabe vorausging (vgl. Abb. 72). Das Auftauen geschah durch direktes Überführen in ein 35°C warmes Wasserbad möglichst schnell, um eine

Diskussion

Rekristallisation zu verhindern. Trotz verschiedener Schutzstoffe und Kombinationen gelang es nicht, eine Bienenspermienprobe mit nennenswertem Anteil membranintakter Spermien nach Vitrifikation zu erhalten. Es existieren mehrere mögliche Gründe für das Scheitern. Zum einen werden sehr hohe Konzentrationen an Kryoprotektiva verwendet, die bewiesenermaßen toxisch auf Bienenspermien wirken. Zwar konnte gezeigt werden, dass nach Abkühlung auf 5°C und Zugabe von 30% DMSO noch über 80% der Spermien intakte Membranen besaßen, jedoch ist davon auszugehen, dass während und nach dem Auftauen toxizitätsbedingte Schäden zunehmen. Zum anderen stellt sich die Frage, ob die Einfriergeschwindigkeit überhaupt schnell genug für eine Vitrifikation war oder ob stattdessen extra- und intrazelluläres Eis entstanden ist. Vor allem Letzteres würde die niedrige Überlebensrate der Spermien durchaus erklären, denn allgemein gilt intrazelluläres Eis als letaler Faktor, den es zu verhindern gilt (Petrunkina, 2007; Chu, 1972; Kuleshova und Lopata, 2002). Dagegen sprechen jedoch relativ aktuelle Untersuchungen von Morris (2006) und Morris et al. (2007/2012), die beweisen, dass in Spermien unabhängig von der Art der Kryokonservierung keine Eiskristallisation sondern stets eine Vitrifikation stattfindet. Dieser Umstand soll laut Morris et al. durch den hohen intrazellulären Proteingehalt und das relativ geringe Volumen bedingt sein, wodurch die Glasbildung schon bei recht hohen Temperaturen (-30°C) und geringen Abkühlgeschwindigkeiten (-1 bis -3000°C/min) erreicht wird. Morris et al. (2012) erklären die Kryoschäden mit einem osmotischen Ungleichgewicht beim Auftauen, dass während des schnellen Einfrierens durch beschränkte Diffusion und damit beschränkter extrazellulärer Eiskristallisation gebildet wird. Welche Art der Schäden bei Bienenspermien vorherrschend ist, kann an dieser Stelle nicht mit Sicherheit geklärt werden. Eine Vitrifikation scheint allerdings keine geeignete Methode der Kryokonservierung von Bienenspermien zu sein, weshalb im Folgenden das Slow Freezing näher betrachtet wurde.

Das Slow Freezing ist ein multifaktorieller Prozess, da es hier auch auf die optimale Einstellung der Einfrier- und Auftaugeschwindigkeit ankommt, sogar noch mehr als bei der Vitrifikation, bei der das Einfrieren und Auftauen im Prinzip nur schnell genug ablaufen muss. Neben der Abkühl- und Erwärmungsrate spielen natürlich auch bei dieser Kryokonservierungsmethode die Art, Konzentration und Zusammensetzung der Kryoprotektiva sowie die Auswahl des für die Kryolösung verwendeten Puffers eine wichtige Rolle. Aus diesem Grund wurden neben dem BSS+ mit 60mM Trehalose und einer Osmolalität von 320mOsmol/Kg auch PBS, eine künstliche Hämolymphe und eine künstliche Spermathekaflüssigkeit als mögliche Kryopuffer mit den kryoprotektiven Substanzen DMSO,

1,3-Propanediol (PD), Saccharose, Dimethylacetamid (DMAA), Harnstoff und Hydroxyectoin (HE) getestet (Tab. 31 –33).

Bei einem vergleichenden Abkühlungsversuch bis -20°C , bei dem alle Puffervarianten nur mit 10% (v/v) DMSO eingesetzt wurden, war BSS+ den anderen Lösungen überlegen (siehe Tab. 31). Außerdem fällt auf, dass einige Werte eine Zunahme intakter Spermien mit Dauer der Lagerung suggerieren (Tab. 31). Natürlich ist dies mehr als unwahrscheinlich, weshalb dieses Phänomen eher für eine große Empfindlichkeit der Methode spricht. Aus diesem Grund und weil generell eine hohe Varianz zwischen den Proben auftrat, wurde bei allen weiteren Versuchen BSS+ mit 10% (v/v) DMSO als Referenz mit untersucht. Als mögliche Ersatzstoffe für DMSO wurden PD, Saccharose, Harnstoff und DMAA getestet. 1,3-Propanediol (PD) galt als recht vielversprechend, da es vergleichsweise nur eine geringe Toxizität auf Spermazellen aufweist (Hanada und Nagase, 1980; Widiasih et al., 2009; Wegener und Bienefeld, 2012). Beispielsweise zeigte PD in einer Konzentration von 3,1M im Vergleich mit 10 weiteren Kryoprotektiva, darunter auch DMSO die geringste toxische Wirkung auf Kaninchenspermien (Hanada und Nagase, 1980). Auch unsere Kooperationspartner (Wegener und Bienefeld, 2012) beschäftigten sich mit der toxischen Wirkung verschiedener Kryokonservierungsstoffe auf Bienenspermien und bestätigten eine relativ geringe *in vitro* Toxizität von PD. Zudem konnten sie beweisen, dass PD in einer Konzentration von 5% keinerlei negativen Einfluss auf den Füllstand der Spermatheken besamter Königinnen ausübt. Anders verhält es sich allerdings bei 10% PD, in dieser Konzentration reduzierte PD die Anzahl der Spermien in den Spermatheken erheblich. In den hier durchgeführten Einfrierversuchen wurde PD in Konzentrationen von 2,5-10% eingesetzt. Die Ergebnisse schwankten recht stark (vgl. Tab.31 und 33), doch der Anteil intakter Spermien nach Einfrieren in BSS+ mit 10% (v/v) DMSO lag stets deutlich höher. Aus diesem Grund wurde an DMSO festgehalten.

Wie DMSO und PD gehört auch Dimethylacetamid (DMAA) zu den membrangängigen Kryoprotektiva und wird bei der Kryokonservierung verschiedener Spermienespezies mit unterschiedlichem Erfolg angewendet (De Baulny et al., 1999; Tselutin et al., 1999; Morris et al., 2003; Bianchi et al., 2008; McClean et al., 2008; Rodriguez-Martinez und Wallgren, 2010). Bei der Gefrierkonservierung von kryoempfindlichen Schweinespermien erwies sich DMAA als vorteilhafter Glycerin-Teilersatz (Rodriguez-Martinez und Wallgren, 2010; Zee et al., 2008). Bianchi et al. (2008) vermuten, dass der positive Effekt des DMAAs in der zum Glycerin vergleichsweise besseren Membrangängigkeit begründet sein könnte, wodurch osmotische Schäden beim Auftauen minimiert werden könnten. Im alleinigen Einsatz zeigte

Diskussion

DMAA in einer Konzentration von 10% bei der Konservierung von Bienenspermien keine besonders gute Schutzfunktion, wie sich aus den Werten in Tab. 31. und 33. erkennen lässt. Als Teilersatz zu DMSO blieben allerdings deutlich mehr Spermien intakt als mit dem Einsatz von PD. Dennoch konnte die Schutzwirkung von 10% DMSO nicht übertroffen werden.

Häufig werden auch Kohlenhydrate, insbesondere Disaccharide als Gefrierschutzmittel für Spermien und Eizellen unterschiedlicher Spezies erfolgreich eingesetzt (Woelders et al., 1997; Sztein et al., 2001; Borini et al., 2006; Becker-Silva, 2004), deshalb wurde zusätzlich zum generellen Trehalosegehalt des Puffers auch Saccharose in verschiedenen Konzentrationen getestet. Allerdings ließ Saccharose sowohl im alleinigen Einsatz (Ergebnis nicht gezeigt) als auch in Kombination mit DMSO keine Schutzwirkung erkennen. Ein ähnliches Resultat lieferte auch Harnstoff. Dieses Amid kommt als natürliches Kryoprotektivum zum Beispiel in Fröschen vor (Costanzo und Lee, 2005) und kann Membranen vor osmotischem Stress schützen (Costa-Balogh et al., 2006). Bei der Kryokonservierung von Bienenspermien zeigte es jedoch keinen schützenden Effekt.

Als weiterer Zusatz mit möglicher Schutzfunktion wurde Hydroxyectoin getestet. Dieses polare und daher gut wasserlösliche Molekül mit niedriger Molekularmasse ist ein Aminosäurederivat und gehört zu den sogenannten kompatiblen Soluten. Diese Art der Moleküle besitzt die Eigenschaft selbst in hohen Konzentrationen den Metabolismus einer Zelle nicht zu beeinflussen und Zellstrukturen sowie Proteine vor verschiedenen Stressfaktoren zu schützen (Lippert und Galinsky, 1991; Knapp et al., 1999; Lentzen und Schwarz, 2006), indem sie Hydrathüllen stabilisieren. Den kompatiblen Soluten gehören Moleküle unterschiedlicher chemischer Klassen an, so sind Zucker (z.B. Trehalose, Saccharose), Polyole (z.B. Inositol, Glycerin), Aminosäuren (z.B. Prolin, Glutaminsäure) sowie Aminosäurederivate (z.B. Ectoin, Hydroxyectoin) vertreten (Lippert und Galinsky, 1991). Kompatible Solute werden bei der Kryokonservierung von humanen Endothelzellen und mesenchymatischen Stammzellen eingesetzt (Freimark et al., 2011; Sun et al., 2012) und finden als Schutzstoff in der Hautpflegeindustrie (Lentzen und Schwarz, 2006) sowie in Protein stabilisierungskits Anwendung.

Für die Kryokonservierung von Bienenspermien wurden Ectoin (nicht gezeigte Ergebnisse) und Hydroxyectoin in verschiedenen Konzentrationen als alleiniges Kryoprotektivum und als Zusatz zum DMSO angewendet. Nur als Zusatz zu 10% (v/v) DMSO und auch nur in einer Konzentration von 10mM konnte eine leicht positive Wirkung erkannt werden. Allerdings können diese Ergebnisse nicht als aussagekräftig betrachtet werden, da die Differenzen zum Teil sehr gering und die generellen Schwankungen zwischen den Messungen dagegen

recht hoch ausfielen. Auch die unterschiedliche Dauer der Lagerung bei -20°C hatte differierende Ergebnisse zur Folge. So war der Anteil intakter Bienenspermien nach 1h bei -20°C in der Probe ohne Hydroxyectoin am höchsten, nach 7 Tagen Lagerung befanden sich dagegen die meisten intakten Spermien in der Probe mit 10mM Hydroxyectoin.

Insgesamt konnte durch den Einsatz verschiedener Zusatz- und Ersatzstoffe keine reproduzierbar deutliche Verbesserung zur Kryokonservierung mit 10% (v/v) DMSO erreicht werden. Deshalb wurde die Optimierung der Einfrier- und Auftaurate ausschließlich mit einer 10%igen DMSO-Lösung als Kryopuffer durchgeführt. Als Grundpuffer wurde dafür außer BSS+ auch der Harbo-Puffer verwendet. Somit wurden die Bienenspermaproben 1:4 mit DMSO-haltigem BSS+ bzw. Harbo-Puffer verdünnt und mit Abkühlraten von $1-6^{\circ}\text{C}/\text{min}$ auf -50°C gebracht. Nach anschließender Überführung in $\text{N}_{2\text{L}}$ erfolgte das Auftauen stets nach gleichem Schema durch direktes Übertragen in 35°C warmes Wasser. Generell hatten die untersuchten Abkühlraten nur geringe Differenzen sowohl in der Motilität sowie insbesondere in der Membranintegrität der kryokonservierten Bienenspermien zur Folge (siehe 3.4.2.). Insgesamt wiesen die Harbo-Proben leicht höhere Anteile beweglicher Spermien auf als die BSS+-Proben und es konnte ein Optimum für die Abkühlrate von $3-4^{\circ}\text{C}/\text{min}$ ermittelt werden, wobei das Optimum der BSS+-Proben eher bei $4^{\circ}\text{C}/\text{min}$ zu finden war. Diese Abkühlrate ist für Bienenspermien nicht außergewöhnlich, ganz im Gegenteil, sie wurde bereits von Harbo (1983), Kaftanoglu und Peng (1984) und Hopkins und Herr (2010) angewendet. Da die optimale Auftaurate stark von der Einfriereschwindigkeit abhängt, wurde bei Ermittlung dieser die Abkühlrate bei konstant $3^{\circ}\text{C}/\text{min}$ gehalten. Auch bei diesem Experiment lagen die Werte der Harbo-Proben für Motilität und Membranintegrität höher als für die BSS+-Proben. Außerdem zeichneten sich zwei verschiedene Optima ab. Während Harbo-Proben optimal in 35°C warmen Wasser auftauen, ist für BSS+-Proben ein direktes Überführen in 35°C warmes Paraffinöl besser. Da eine Kryokonservierung von Bienenspermien in DMSO-haltigem Harbo-Puffer bei beiden Experimenten bessere Ergebnisse erzielte und ein Auftauen im Wasserbad praktikabler ist, wurde für die anschließenden Besamungsversuche auch DMSO-haltiger Harbo-Puffer als Kryopuffer verwendet.

Das Besamungsexperiment sollte zeigen, ob Bienensperma, das nach dem erstellten Protokoll konserviert wurde, befruchtungsfähig und ob bzw. wie stark der Besamungserfolg eingeschränkt ist. Die Ergebnisse dieses Experiments sind unter 3.4.3. dargestellt. Wie auch bei allen bisherigen Besamungsversuchen mit kryokonserviertem Bienensperma war die Reduzierung des Besamungserfolges immens. Im Vergleich zur Kontrolle schafften es nur

ca. ein Zehntel der Spermien in die Spermatheka, wenn Kryosperma versamt wurde. Auch der Anteil weiblicher Brut war deutlich reduziert und betrug je nach Stärke der Spermaverdünnung 31% oder 17% statt der normalen 100% (vgl. Abb. 77). Selbst die Motilität der aus den Spermatheken entnommenen Spermien war bei Kryosperma geringer, allerdings nicht in dem Maße wie der Anteil weiblicher Brut oder der Anzahl der Spermien in den Spermatheken.

Ein Grund für dieses schlechte Befruchtungsergebnis könnte nach wie vor in der starken toxischen Wirkung des DMSOs liegen, die ja durch einen vorherigen Besamungsversuch bewiesen wurde (Abb. 68; Wegener und Bienefeld, 2012). Es ist davon auszugehen, dass die Entfernung des DMSOs nach dem Auftauen der Spermaprobe den Befruchtungserfolg deutlich vergrößern könnte. In die Kryokonservierung tierischer Keimzellen gehört die Entfernung des Protektivums nach Auftauen oftmals zum allgemeinen Vorgehen dazu (Gao und Critser, 2000; Pegg, 2002; Woods et al., 2004). Dementsprechend existieren einige Arbeiten, die sich mit der Problematik der Protektivum-Entfernung beschäftigen (Gao et al, 1995; Gilmore et al., 1997) und aus denen sogar Patente hervorgingen (US 5700632 A).

Für die schonende DMSO-Entfernung nach Auftauen wurden zwei Methoden verfolgt, Dialyse und Zentrifugation. Beide Methoden sind bewährte Reinigungsverfahren mit breitem Anwendungsspektrum. Das Verfahren der Dialyse besitzt den Vorteil, dass der Reinigungsverlauf, also die Abnahme der DMSO-Konzentration, über die Messung der Osmolalität direkt mit verfolgbar ist (siehe 3.4.4.1., Abb. 79). Außerdem kann die Dialyse in Mikrodialysierkammern erfolgen, was den Verlust an Spermaprobe minimiert. Es zeigte sich, dass zu Beginn der Dialyse eine rasche DMSO-Reduzierung erfolgt, deren Geschwindigkeit sich dann im Laufe des Verfahrens verringert. Nach 30 minütiger Reinigung waren nur noch 26-30% des DMSOs in der Probe enthalten. Eine längere Dialyse von beispielsweise 60 min reduzierte den Anteil intakter Spermien deutlich (um ca. 37%) und bewirkte nur eine weitere Verringerung des DMSO-Gehalts um max. 20%. Dagegen waren in 30 min dialysierten Proben nur ca. 5% weniger intakte Spermien zu finden (vgl. Abb. 81), weshalb die Dialysedauer auf 30 min festgelegt wurde. Spermien werden an der Luft schnell immotil und weisen Membranschäden auf. Es ist davon auszugehen, dass diese Schäden von oxidativem Stress stammen, der auch durchaus während der Dialyse auftreten und den Anteil intakter Spermien verringern könnte. Deshalb wurde dem Dialysepuffer versuchsweise Katalase oder das Antioxidans Glutathion hinzugefügt. Reduziertes Glutathion wurde bereits bei der Kryokonservierung verschiedener Spermienarten zur Reduzierung des oxidativen Stresses erfolgreich eingesetzt (Gadea et al., 2005; Baumber et

al., 2003). Als weiterer Zusatz wurde ein Trypsinhemmer getestet, der die schädliche Wirkung möglicher Peptidasen aufheben sollte. Doch nur der Zusatz von Katalase zeigte eine leicht positive Wirkung und wurde deshalb für den späteren Besamungsversuch mit berücksichtigt. Es ist nicht überraschend, dass Katalase im Dialysepuffer Bienenspermien vor oxidativem Stress schützt, denn es kommt sowohl in den Spermien selbst sowie in den Spermatheken der Bienenköniginnen vor (Collins et al., 2004). Schon 1978 erkannte Verma einen positiven Effekt von Katalase auf Bienenspermien in Flüssiglagerung, weshalb er das Enzym dem Spermaverdüner zusetzte. Auch wurde es schon von Taylor et al., 2009 für eine verbesserte Kryokonservierung von Bienenspermien eingesetzt.

Die Zentrifugation wurde als zweite Reinigungsmethode in Betracht gezogen und für Bienenspermien optimiert. Diese Versuche wurden in Absprache von den Projektpartnern am LIB-Hohen Neuendorf durchgeführt. Es wurden verschiedene Zentrifugationsmedien verglichen, die optimale Zentrifugationsgeschwindigkeit zwischen 1000-1600xg für Bienenspermien ermittelt und verschiedene Zusätze auf ihre Schutzfunktion hin getestet. BSS+ erwies sich als idealer Zentrifugationspuffer, im Vergleich mit 4 weiteren Pufferlösungen wurden in BSS+ die wenigsten Spermien geschädigt. Es zeigte sich, dass der Grad der Schädigung mit Zunahme der Zentrifugationsgeschwindigkeit steigt (vgl. Abb. 83). Dennoch wurde für weitere Versuche neben der geringsten (1000xg) auch die mittlere Geschwindigkeit von 1300xg gewählt, weil bei dieser Zentrifugationsstärke die Probe deutlich besser rekonzentriert wird. Die Dichte der Probe spielt durch die Beschränkung des maximalen Besamungsvolumens eine wichtige Rolle. Die Zentrifugationsstärke von 1300xg ist also ein Kompromiss zwischen Spermien-Schädigung und -Rekonzentrierung. Als Schutzstoffe wurden Eigelb, der Serinprotease-Inhibitor Aprotinin und Katalase getestet. Keiner der Zusatzstoffe zeigte eine klare deutliche Wirkung, die Differenzen zwischen den Werten waren verschwindend gering (nicht dargestelltes Ergebnis).

Nach den *in vitro*-Untersuchungen wurden durch Zentrifugation gereinigte sowie zur Kontrolle unbehandelte Spermaproben versamt und die in den Spermatheken gefundenen Spermien sowie deren Motilität bestimmt. Zusätzlich wurden auch die entstandenen Brutnester analysiert. Das Ergebnis war vielversprechend, da zentrifugiertes und unbehandeltes Sperma nur geringe Differenzen in den untersuchten Eigenschaften bewirkten (vgl. 3.4.4.3.) und der Besamungserfolg recht groß war.

Ein anschließender Besamungsversuch mit kryokonserviertem und auf unterschiedliche Weise gereinigtem Bienensperma sollte zeigen, welches Verfahren der DMSO-Entfernung den größeren Besamungserfolg gewährleistet. Es wurden Proben nach Zentrifugation mit

Diskussion

1000xg sowie 1300xg versamt, genauso wie dialysierte Proben mit und ohne Katalasezusatz. Als Kontrolle dienten natürlich kryokonservierte Proben ohne anschließende Reinigung. Analysiert wurde der Anteil weiblicher Brut, der aus dem jeweiligen Kryosperma entstanden ist. Obwohl die Dialyse bei den *in vitro*-Untersuchungen ein vielversprechendes Reinigungsverfahren darstellte, lieferte sie im Vergleich zur Zentrifugation eindeutig schlechtere *in vivo* Werte. Warum das Sperma, welches gegen katalasehaltigen Puffer dialysiert wurde, eine besonders schlechte Befruchtungsrate aufwies, kann nicht ohne weitere Untersuchungen geklärt werden. Die generell schlechteren Werte dialysierten Spermien könnten evtl. auf eine unzureichende DMSO-Entfernung zurückzuführen sein. Bei der Zentrifugation schnitt die höhere Geschwindigkeit von 1300xg deutlich besser ab, wobei ein Anteil weiblicher Brut vergleichbar mit dem Kontrollwert erreicht werden konnte. Insgesamt konnte durch die Entfernung des DMSOs jedoch keine eindeutige Verbesserung der quantifizierten weiblichen Brut erzielt werden. Dennoch könnte es von Vorteil sein gereinigtes Sperma ohne DMSO zu versamen, um eventuelle Langzeitwirkungen des Protektivums auf die Königin zu verhindern.

Insgesamt waren die Anteile weiblicher Brut bei diesem Versuch extrem niedrig und deutlich unter den Werten des vorherigen Besamungsversuches, dessen Ergebnisse unter 3.4.3 Abb. 77 dargestellt sind. Der Grund für diese starke Abweichung ist unbekannt.

Um den Prozess des Slow freezings zu optimieren, wurden am Fraunhofer Institut für biomedizinische Technik (IBMT) in St. Ingbert mit Hilfe eines Multiphotonen Laserscanning-Mikroskops die Vorgänge der Nukleation und des Eiskristallwachstums in einer Spermprobe kontinuierlich verfolgt. Hierzu mussten allerdings die Spermproben erheblich stärker verdünnt werden (1:100 statt 1:1,25). Die Abkühlrate wurde aber mit 3°C/min konstant gehalten. Bei -8 bis -9°C erfolgte die Nukleation und das Eiskristallwachstum setzte ein. Zwischen -20°C und -30°C war nur noch sehr wenig flüssiges Volumen nachweisbar (Abb. 86 A-C). Da die Probe (Objektträger) mittels Stickstoffdampf von oben abgekühlt wurde, bildete sich direkt unter dem Deckglas zuerst Eis. In dieser oberen und darunterliegenden mittleren Zone waren kaum Spermien zu finden, sie wurden offensichtlich von der Eisfront nach unten in die restliche flüssige Phase gedrängt (vgl. Abb.87A-C). Dieses Ergebnis führte zu der Idee, die Kryokonservierung durch eine Mischung aus slow freezing und Vitrifikation zu optimieren.

Wenn es gelingt, die Eisbildung nach Nukleation nur soweit fortschreiten zu lassen, bis die Konzentration insbesondere von DMSO in der restlichen flüssigen Phase ausreichend hoch ist (ca 30%) , um bei Vitrifikation den glasartigen Aggregatzustand dieses Flüssigkeitsraumes

zu erreichen, sollten die dort befindlichen Spermien nicht durch Eiskristalle geschädigt werden. Durch manuelles Seeding, also künstlich herbeigeführter Nukleation, könnte man ausserdem versuchen, den Grad der Unterkühlung zu begrenzen und dadurch das Eiskristallwachstum im extrazellulären Raum zu verlangsamen.

Da bei der Nukleation Kristallisationswärme frei wird und diese einen plötzlichen Temperaturanstieg zur Folge hat (siehe Abb. 88), lässt sich der genaue Zeitpunkt der Nukleation mit einem feinen Temperaturfühler, der in die Probe eingeführt wurde, bestimmen. Anders als bei den Experimenten am Laserscanning-Mikroskop setzte die Eiskristallisation in der konzentrierten Spermaprobe im Kryogefäß erst bei ca. -19°C bis -23°C ein. Eine vorzeitige aber langsamere Eiskristallbildung durch manuelles Seeding (Berühren des Probengefäßes mit einer unterkühlten Metallspitze oder kurzzeitiger Vibration der Probe) konnte nicht erreicht werden. Am LIB Hohen Neuendorf gelang bei einigen Proben ein künstliches Seeding innerhalb des dafür ausgerüsteten und programmierbaren Gefriergerätes bei etwa -14°C . Da durch eine vorzeitige Nukleation aber keine Steigerung der Spermaqualität verzeichnet werden konnte (Ergebnis des LIB; nicht gezeigt) und das Verfahren nicht ausreichend sicher reproduzierbar war, wurde das manuelle Seeding nicht weiter angewandt. Möglicherweise war bei vorzeitiger Nukleation und früherer Vitrifikation die Konzentration insbesondere des DMSOs nicht hoch genug um eine Verglasung zu gewährleisten.

Eine Beobachtung war ausschlaggebend für die Änderung der Kryotechnik, die letztlich zum Durchbruch führte. Es fiel auf, dass Bienenspermien nach dem Auftauen eine starke Motilität aufwiesen, während unbehandelte Bienenspermien erst nach längerer Zeit in aktivierendem Puffer (K^+) eine solche Hypermotilität zeigen. Als Ursache der verstärkten Spermienbewegung kamen vor allem die Verdünnung und das Verrühren mit der DMSO-haltigen Kryolösung vor dem Einfrieren in Frage. Normalerweise liegen Spermien vieler Insekten im frischen Ejakulat in dicht gepackten Bündeln (siehe Abb. 66) vor und sind inaktiv. Osanai und Baccetti (1994) fanden heraus, dass die Zerstörung dieser nativen Form zur Aktivierung der Spermien führt. So wurde vermutet, dass das Verrühren mit dem DMSO-Puffer die Spermienbündel des Bienenspermas zerstört. Das wiederum könnte die Gefrierresistenz und Lagerfähigkeit der Spermien in der Spermatheka der Königin verringern. Mikroskopische Beobachtungen bestätigen diese Annahme, denn aufgetautes Kryosperma zeigt keine parallele Anordnung der Spermien in Bündeln mehr, alle Spermien liegen vielmehr unabhängig voneinander und ungeordnet vor. Deshalb wurde nach einer Methode gesucht, das DMSO schonender und ohne Durchmischung des Spermas

Diskussion

zuzusetzen. Die eigentlich für die DMSO-Entfernung entwickelte Dialysemethode in Mikrokammern wurde so modifiziert, dass sie stattdessen für das Zusetzen des Kryoprotektivums verwendet werden konnte. Damit fiel jedes Verrühren und Verdünnen weg, wodurch die native Form der Spermien (siehe. Abb. 89) in Clustern erhalten blieb. Mikroskopische Aufnahmen von Bienensperma, welches nach Dialyse gegen DMSO-haltiger BSS kryokonserviert wurde, konnten zeigen, dass dieses Verfahren geeignet ist, die Spermienbündel zu erhalten.

In einer Reihe von vergleichenden Kryokonservierungsversuchen mit anschließender Besamung wurde versucht, die DMSO-Zugabe mittels Dialyse weiter zu optimieren (vgl. 90 A-C). Das Ausgangsprotokoll sah eine 32 minütige Dialyse des Bienenspermas gegen BSS+ mit 21% (v/v) DMSO vor. Während dieser Zeit fand aufgrund der Hypertonie des Dialysepuffers eine deutliche Dehydrierung der Spermien statt, was an der klaren Volumenreduzierung des Spermas erkennbar war. Diese Dehydrierung kann in Kombination mit der DMSO-Aufnahme von Vorteil für eine erfolgreiche Kryokonservierung sein. Allerdings ist zu starke Dehydrierung schädlich, weshalb auch versucht wurde durch Reduzierung des DMSO-Gehaltes im Dialysepuffer und gleichzeitiger Verlängerung der Dialysedauer den osmotischen Stress zu verringern. Die Veränderungen des Dialyseverfahrens erbrachten jedoch kein positives Ergebnis, in allen untersuchten Parametern schnitt dieses Verfahren schlechter ab, als die Ausgangsmethode (vgl. Abb. 90A-C).

Das Dialyseverfahren (32 minütige Dialyse gegen 21% DMSO) hat bislang die besten *in vivo* Werte erzielt, nicht nur unter den hier durchgeführten Experimenten, sondern auch im Vergleich zu solchen anderer Arbeitsgruppen. Es konnten durchschnittlich 1,25 Mio. Spermien in den Spermatheken besamter Königinnen gezählt werden. Kaftanoglu und Peng (1984) konnten ca. 0,3 Mio. nachweisen. Auch der Wert für den Anteil motiler Spermien in den Spermatheken lag mit ungefähr 90% sehr hoch. Besonders vielversprechend ist jedoch, dass 79,4% der Brut weiblich und damit befruchtet waren. Ein so hoher Anteil weiblicher Brut stellt wirklich einen Durchbruch dar.

In einem weiteren umfangreichen Besamungsversuch wurde die neu entwickelte Kryomethode inklusive DMSO-Zusatz mittels Dialyse mit der bisherigen Methode (DMSO-Zusatz mittels Verdünnung) und eine weiteren Variation, bei der das neue Verfahren mit anschließender DMSO-Entfernung durch Zentrifugation kombiniert wurde, verglichen. Die Ergebnisse dieser Untersuchung sind in Abb. 91 A-C dargestellt. Zur Kontrolle wurden 3 Königinnen mit unbehandeltem Sperma besamt. Die neu entwickelte Methode erzielte in

allen untersuchten Parametern die besten Resultate. Insgesamt lagen die Werte aber deutlich niedriger, als beim vorherigen Besamungsversuch. So konnten durchschnittlich nur ca. 0,9Mio Spermien in den Spermatheken gezählt werden, was zwar immer noch dem Dreifachen des bisher höchsten Wertes (vgl. 0,3Mio bei Kaftanoglu und Peng) entspricht, doch trotzdem klar unter dem vorherigen Resultat liegt. Auch beim Anteil weiblicher Brut konnten nur 47,5% statt der zuvor erreichten 79,4% erzielt werden. Die Motilität und Membranintegrität der aus den Spermatheken entnommenen Spermien entsprach auch nicht den Ergebnissen des vorherigen Besamungsexperimentes, differierten jedoch nicht so stark. Beim genauen Vergleich der Vorgehensweisen beider Besamungsexperimente stellte sich heraus, dass bei dem ersten Besamungsversuch eine größere Menge Sperma im Kryoröhrchen eingefroren wurde. Im zweiten Experiment wurden nur für die Besamung jeweils einer Königin ausreichende Portionen eingefroren. Das hatte vermutlich einen erhöhten oxydativen Stress zur Folge, denn bei einer stärkeren Portionierung sind vermehrte Luftblasen und damit verbunden ein verstärkter Kontakt mit Sauerstoff wahrscheinlich.

Die Kombination des neu entwickelten Verfahren des DMSO-Zusatzes durch Dialyse vor Kryokonservierung mit einer DMSO-Entfernung mittels Zentrifugation nach Auftauen resultierte in einer verminderten Anzahl an Spermien in den Spermatheken und in einem deutlich geringeren Anteil weiblicher Brut. Auch die Membranintegrität und Motilität der aus den Spermatheken entnommenen Spermien lag niedriger als ohne Reinigungsschritt. Obwohl die Schädigung der Spermien durch die Zentrifugation und die damit verbundene Verringerung der Fruchtbarkeit nicht geringfügig ist, kann die Entfernung des DMSOs und seiner schädlichen Wirkung auf Königin und Nachkommen von großer Bedeutung sein und sollte weiter verfolgt werden.

4.4. Prüfung auf DNA-Schäden an Bienenspermien nach Kryokonservierung

Spermien-DNA unterscheidet sich sehr von der DNA somatischer Zellen, sie ist extrem kompakt und daher sehr resistent gegen chemische und physikalische Einflüsse (Shen und Ong, 2000; Lopes et al., 1998). Dennoch bekräftigen einige Studien die Ansicht, dass eine Kryokonservierung von Spermien zum Teil massive DNA-Schäden mit sich bringt (Zribi et al., 2010; Lopez-Fernandez et al., 2008; Baumber et al., 2003; Thomson et al., 2009). Der genaue Mechanismus, durch den die DNA-Schäden zu Stande kommen, ist jedoch noch nicht vollständig geklärt. Thomson et al. (2009) beschreiben zwei mögliche Prozesse, die zu den DNA-Schäden während der Kryokonservierung führen könnten. Es werden oxidativer

Diskussion

Stress und apoptotische Vorgänge als Ursache in Betracht gezogen. Es konnte gezeigt werden, dass eine Kryokonservierung zu einer verstärkten Aktivierung von Caspasen führt (Paasch et al., 2004a und b; Martin et al., 2004). Diese Cysteinproteasen besitzen eine Schlüsselfunktion in der zellulären Apoptose-Kaskade (Grunewald et al., 2009) und die Konzentration aktiver Caspasen korreliert mit dem Gehalt an DNA-Fragmentierung (Weng et al., 2002) in manchen Ejakulatfraktionen. Dennoch kann Apoptose nicht als der alleinige Grund für DNA-Schäden gesehen werden. So konnten Martin et al. (2004) in kryokonservierten Rinderspermien zwar eine verstärkte Caspasenaktivität nicht jedoch eine dadurch bedingte Erhöhung an DNA-Fragmentierung feststellen. Auch Paasch et al. (2004b) beschreibt, dass nur ein Teil der DNA-Fragmentierung auf apoptotische Prozesse zurückzuführen ist. Als weitere mögliche Ursache für eine DNA-Fragmentierung wird vielfach oxidativer Stress angegeben (Paasch et al., 2004b; Peris et al., 2007). Beispielsweise konnten Thomas et al. (2009) in Humanspermien eine positive Korrelation zwischen dem Grad an DNA-Fragmentierung und oxidativem Stress vor und nach Kryokonservierung belegen. Weitere Studien an anderen Zellen weisen ebenfalls daraufhin, dass Kryokonservierung mit oxidativem Stress gekoppelt ist (Ball et al., 2001; Bilodeau et al., 2000; Zribi et al., 2007) und oxidativer Stress zu DNA-Schäden führt (Baumber et al., 2003; Tatone et al., 2010).

Um eine mögliche Schädigung der Spermien-DNA durch DMSO oder den Gefriervorgang näher zu beleuchten, wurde der Gehalt fragmentierter DNA mittels TUNEL-Test in drei Spermepools nach Kryokonservierung ermittelt. Der Anteil fragmentierter DNA lag in den Kryoproben stets höher als in den Kontrollen, allerdings nur sehr geringfügig (0,1-0,4%). Eine Probe, die beim Einfrierprozess nicht richtig verschlossen war, zeigte einen deutlich höheren Anteil geschädigter DNA. Diese Probe war vermutlich einem erhöhten oxydativen Stress ausgesetzt. Zusammenfassend lässt sich damit sagen, dass keine schädliche Wirkung der eingesetzten DMSO-Konzentration sowie der entwickelten Kryomethoden auf die Integrität der DNA festzustellen ist. Jedoch scheint oxidativer Stress auch für diesen Parameter ein überaus wichtiger Faktor zu sein, den es zu minimieren gilt.

Obwohl weitere Prüfungen der Toxizität von DMSO und Sauerstoff sowie Untersuchungen zur Dauer der Legeleistung befruchteter Eier notwendig sind, stellt die neu entwickelte Methode zur Kryokonservierung von Bienenspermien einen erheblichen Fortschritt für die Bienenzucht dar. Sicherlich ist die Methode noch nicht geeignet, um Wirtschaftsvölker zu generieren, aber für die Züchtung, den Genaustausch über Ländergrenzen, die Lagerung von genetischer Information und Konservierung der Biodiversität ist sie bereits jetzt gut geeignet.

Zusammenfassung

Die westliche Honigbiene (*Apis mellifera*) ist von großer ökologischer und ökonomischer Bedeutung. Durch ihre Bestäuberleistung trägt sie zum Erhalt der Biodiversität bei und ist ökonomisch gesehen ebenso bedeutend, denn 84% aller in Europa kultivierten Nutzpflanzen sind direkt auf Insektenbestäubung angewiesen. Seit Jahren zeichnen sich rückläufige Bienenvölkerzahlen und eine abnehmende Artenvielfalt innerhalb der Bienenfamilie in Nordamerika sowie in manchen Teilen Europas ab. Mittlerweile ist von einer globalen Bestäuberkrise die Rede und es wird verstärkt nach Möglichkeiten gesucht, um dieser Krise entgegenzuwirken. Als eine Hauptursache für den Bienenrückgang wird die fast weltweit verbreitete Milbe *Varroa destructor* angesehen. Deshalb wird in der Bienenzucht intensiv an der Züchtung varroaresistenter Bienenvölker gearbeitet. Eine Kryokonservierung für Bienenspermien ohne Fruchtbarkeitsreduzierung würde die Bienenzucht revolutionieren und stark beschleunigen, da räumliche und zeitliche Restriktionen bei der Wahl des Bienenspermas wegfielen. Zudem wäre eine Möglichkeit zur Sicherung der genetischen Diversität geschaffen.

Ziel dieser Arbeit, die als Teil eines vom Bundeslandwirtschaftsministerium geförderten Projektes durchgeführt wurde, war es, eine Methode zur Konservierung von Bienenspermien in flüssigem Stickstoff zu erarbeiten. Um mit den geringen Spermamengen (1µL/Drohne) ressourcensparend Tests durchführen zu können, wurden zunächst geeignete *in vitro*-Tests entwickelt, die dann gemeinsam mit dem Kooperationspartner (Institut für Bienenkunde, Hohen Neundorf, AG Prof. Bienefeld) durch parallel durchgeführte *in vitro* und *in vivo* Untersuchungen validiert wurden. Durch einen fluorimetrischen Aktivitätstest der Glucosephosphat-Isomerase (GPI, zytoplasmatisches Enzym) sowie durch eine mikroskopische Fluoreszenzfärbemethode konnte die Integrität der Plasmamembran beurteilt werden. Insbesondere der GPI-Aktivitätstest ist aussagekräftig, anwenderfreundlich und zeitsparend und deshalb zur standardmäßigen Qualitätsbewertung von kryokonserviertem Bienensperma ideal.

Umfangreiche Abkühl- und Einfrierversuche zeigten, dass eine Vitrifikation für die Kryokonservierung von Bienensperma nicht geeignet ist. Deshalb wurde dem Einfrieren in flüssigem Stickstoff eine kontinuierliche Abkühlung mit partieller extrazellulärer Eisbildung durch Unterkühlung vorgeschaltet (slow freezing).

Bei der Wahl des Kryoprotektivums erwies sich nur DMSO als geeignet und konnte weder teilweise noch komplett durch andere Kryoprotektiva ersetzt werden. Die entwickelte

Kryomethode erzielte zwar in den *in vitro* Tests gute Ergebnisse, jedoch nicht bei anschließenden Besamungsversuchen (geringe Anzahl von Spermien in der Spermatheka, geringe weibliche Brut). Versuche, eine mögliche toxische Wirkung von DMSO zu minimieren, blieben aber erfolglos.

Der Durchbruch gelang erst nach Dialyse des Bienenspermas gegen DMSO-haltiges Konserviermedium. Hierdurch blieben die nativen Spermiencluster auch nach anschließender Kryokonservierung weitgehend erhalten. Die Erhaltung dieser nativen Spermacluster bis zur Besamung führte zu bisher unerreichten Besamungserfolgen. Es konnten durchschnittlich 1,25 Mio. Spermien in den Spermatheken besamter Königinnen gezählt werden und davon waren ungefähr 90% motil. Besonders vielversprechend ist jedoch, dass 79,4% der Brut weiblich waren. Ein so hoher Anteil weiblicher Brut konnte bislang nicht erreicht werden und wäre für züchterische Zwecke ausreichend. Weitere Besamungsversuche werden zurzeit durchgeführt. Auch andere Bieneninstitute und Bienenzüchter testen bereits die Kryo-Methode für die Praxis.

Summary

The European honeybee (*apis mellifera*) is of great ecological and economic value. As important pollinators they help to maintain biodiversity. Economically bees are essential because the majority of crops in Europe depend on bee pollination. In North America and in some parts of Europe bee populations and the diversity of species in the *Apis*-family have been declining for years. Experts now fear a global pollination crisis and intensely search a solution. A main cause of the crisis is the almost worldwide distributed mite *Varroa destructor*. Beekeepers work intensely to breed *Varroa*-resistant honeybees. Breeding would be much faster and more efficacious if bee sperm could be conserved for artificial insemination. In my work a method for long-term preservation of honeybee semen was developed. Initially, *in vitro*-tests for assessing the quality of bee semen were developed and validated by parallel performed *in vivo* studies to yield a time-, cost- and resource-efficient test of sperm quality. A fluorimetric activity test of a cytosolic enzyme (GPI, glucose phosphate isomerase) and a labeling technique with fluorescent dyes provided information about the integrity of the plasma membrane and both are easy and quick, and hence suitable as standard test for quality assessment of bee semen. Extensive cooling and freezing experiments showed that vitrification (a freezing method without ice segregation) is not suitable for the cryopreservation of bee semen. Therefore slow freezing with controlled extracellular ice formation and optimized cooling and thawing rates was developed. Of several tested cryoprotectants the only suitable was DMSO (dimethyl sulfoxide). However, in insemination experiments the developed method failed to yield satisfactory results because both the number of spermathecae-reaching sperm and the fractions of female brood are significantly reduced. As DMSO exerts a toxic effect on bee sperm as well as on queens inseminated with the DMSO-containing sperm, centrifugation and dialysis methods for DMSO removal after cryopreservation and before insemination were performed. The aim was to reduce at least the toxic effect of the DMSO to queens. Although *in vitro* experiments were promising, the protocol extended with a DMSO-removal yielded no better results during insemination attempts. A breakthrough was a new and extremely gentle way of DMSO-addition by means of dialysis. In contrast to previous techniques, dialysis does not destroy the native form of bee semen. In native semen, inactive sperms are packed parallel in tight bundles surrounded by an extracellular matrix. The conservation of this native form during cryopreservation resulted in great insemination success. On average 1.25 million sperm were found in the spermathecae of artificially inseminated queens and approximately 90% of these were motile. Most promising, however, is that 79.4% of the brood were females. Such a high proportion of female brood

Summary

has not yet been achieved and would be sufficient for breeding purposes. Additional more insemination experiments to fully establish the method are still pending, but the novel cryopreservation could be a suitable tool for beekeeping and would help to maintain the genetic diversity of bees.

Literaturverzeichnis

- Abou-Haila, A and DRP Tulsiani. "Mammalian Sperm Acrosome: Formation, Contents, and Function." *Archives of biochemistry and biophysics* 379, no. 2 (2000): 173-182.
- Afzelius, BA. "Preformed Acrosome Filaments. A Chronicle." *Braz. J. morphol. Sci* 23, no. 3-4 (2006): 279-285.
- Agca, Y. "Cryopreservation of Oocyte and Ovarian Tissue." *Ilar Journal* 41, no. 4 (2000): 207-220.
- Aires, VA, KD Hinsch, F Mueller-Schloesser, K Bogner, S Mueller-Schloesser and E Hinsch. "*In Vitro* and *in Vivo* Comparison of Egg Yolk-Based and Soybean Lecithin-Based Extenders for Cryopreservation of Bovine Semen." *Theriogenology* 60, no. 2 (2003): 269-279.
- Aisen, EG, VH Medina and A Venturino. "Cryopreservation and Post-Thawed Fertility of Ram Semen Frozen in Different Trehalose Concentrations." *Theriogenology* 57, no. 7 (2002): 1801-1808.
- Aitken, RJ and L Bennetts. "Reactive Oxygen Species: Friend or Foe." *The sperm cell: Production, Maturation, Fertilization, Regeneration* 1, (2006): 170-93.
- Aizen, MA and LD Harder. "The Global Stock of Domesticated Honey Bees Is Growing Slower Than Agricultural Demand for Pollination." *Current biology* 19, no. 11 (2009): 915-918.
- Al-Lawati, H, G Kamp and K Bienefeld. "Characteristics of the Spermathecal Contents of Old and Young Honeybee Queens." *Journal of insect physiology* 55, no. 2 (2009): 117-122.
- Alaux, C, JL Brunet, C Dussaubat, F Mondet, S Tchamitchan, M Cousin, J Brillard, A Baldy, LP Belzunces and Y Le Conte. "Interactions between Nosema Microspores and a Neonicotinoid Weaken Honeybees (*Apis Mellifera*)." *Environmental microbiology* 12, no. 3 (2010): 774-782.
- Ambrosini, G, A Andrisani, E Porcu, E Rebellato, A Revelli, D Caserta, E Cosmi, R Marci and M Moscarini. "Oocytes Cryopreservation: State of Art." *Reproductive toxicology* 22, no. 2 (2006): 250-262.
- Amdam, GV and SW Omholt. "The Regulatory Anatomy of Honeybee Lifespan." *Journal of Theoretical Biology* 216, no. 2 (2002): 209-228.

- Anchordoguy, TJ, CA Cecchini, JH Crowe and LM Crowe. "Insights into the Cryoprotective Mechanism of Dimethyl Sulfoxide for Phospholipid Bilayers." *Cryobiology* 28, no. 5 (1991): 467-473.
- Annoscia, D, F Del Piccolo and F Nazzi. "How Does the Mite *Varroa Destructor* Kill the Honeybee *Apis Mellifera*? Alteration of Cuticular Hydrocarbons and Water Loss in Infested Honeybees." *Journal of insect physiology* 58, no. 12 (2012): 1548-1555.
- Antúnez, K, R Martín-Hernández, L Prieto, A Meana, P Zunino and M Higes. "Immune Suppression in the Honey Bee (*Apis Mellifera*) Following Infection by *Nosema Ceranae* (Microsporidia)." *Environmental microbiology* 11, no. 9 (2009): 2284-2290.
- Arakawa, T, JF Carpenter, YA Kita and JH Crowe. "The Basis for Toxicity of Certain Cryoprotectants: A Hypothesis." *Cryobiology* 27, no. 4 (1990): 401-415.
- Arav, A. "Cryopreservation of Oocytes and Embryos." *Theriogenology* 81, no. 1 (2014): 96-102.
- Arav, A, M Pearl and Y Zeron. "Does Membrane Lipid Profile Explain Chilling Sensitivity and Membrane Lipid Phase Transition of Spermatozoa and Oocytes?" *Cryo letters* 21, no. 3 (1999): 179-186.
- Arav, A, Y Zeron, SB Leslie, E Behboodi, GB Anderson and JH Crowe. "Phase Transition Temperature and Chilling Sensitivity of Bovine Oocytes." *Cryobiology* 33, no. 6 (1996): 589-599.
- Arav, A, S Yavin, Y Zeron, D Natan, I Dekel and H Gacitua. "New Trends in Gamete's Cryopreservation." *Molecular and cellular endocrinology* 187, no. 1 (2002): 77-81.
- Arav, A and R Zvi. "Do Chilling Injury and Heat Stress Share the Same Mechanism of Injury in Oocytes?" *Molecular and cellular endocrinology* 282, no. 1 (2008): 150-152.
- Armitage, WJ, SC Hall and C Routledge. "Recovery of Endothelial Function after Vitrification of Cornea at -110 C." *Investigative ophthalmology & visual science* 43, no. 7 (2002): 2160-2164.
- Ashiralieva, A and E Genersch. "Reclassification, Genotypes and Virulence of *Paenibacillus Larvae*, the Etiological Agent of American Foulbrood in Honeybees-a Review." *Apidologie* 37, no. 4 (2006): 411-420.
- Baccetti, B, AG Burrini, R Dallai, V Pallini, P Periti, F Piantelli, F Rosati and G Selmi. "Structure and Function in the Spermatozoon of *Bacilus Rossius*: The Spermatozoon of Arthropoda. Xix." *Journal of ultrastructure research* 44, (1973): 1-73.

- Baicu, S, MJ Taylor, Z Chen and Y Rabin. "Cryopreservation of Carotid Artery Segments Via Vitrification Subject to Marginal Thermal Conditions: Correlation of Freezing Visualization with Functional Recovery." *Cryobiology* 57, no. 1 (2008): 1-8.
- Bale, JS. "Insects and Low Temperatures: From Molecular Biology to Distributions and Abundance." *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 357, no. 1423 (2002): 849-862.
- Ball, BA, AT Vo and J Baumber. "Generation of Reactive Oxygen Species by Equine Spermatozoa." *American journal of veterinary research* 62, no. 4 (2001): 508-515.
- Barbas, JP and RD Mascarenhas. "Cryopreservation of Domestic Animal Sperm Cells." *Cell and tissue banking* 10, no. 1 (2009): 49-62.
- Bassiri, F, M Tavalaei and MH Nasr Esfahani. "Correlation between Different Patterns of Hypo-Osmotic Swelling and Sperm Functional Tests." *International journal of fertility & sterility* 7, no. 3 (2013): 193.
- Baudot, A, L Alger and P Boutron. "Glass-Forming Tendency in the System Water–Dimethyl Sulfoxide." *Cryobiology* 40, no. 2 (2000): 151-158.
- Baumber, J, BA Ball, JJ Linfor and SA Meyers. "Reactive Oxygen Species and Cryopreservation Promote DNA Fragmentation in Equine Spermatozoa." *Journal of Andrology* 24, no. 4 (2003): 621-628.
- Baxter, SJ and GH Lathe. "Biochemical Effects on Kidney of Exposure to High Concentrations of Dimethyl Sulphoxide." *Biochemical pharmacology* 20, no. 6 (1971): 1079-1091.
- Becker-Silva, SC. "Limites De Tolerância Do Espermatóide Caprino a Soluções Hiperosmóticas De Sacarose E Taxa De Sobrevivência Após Criopreservação Em Diluentes Contendo Sacarose Ou Trealose E Concentrações Reduzidas De Crioprotetores Permeantes." Universidade de São Paulo, 2004.
- Benoit, JB, G Lopez-Martinez, MA Elnitsky, RE Lee and DL Denlinger. "Dehydration-Induced Cross Tolerance of Belgica Antarctica Larvae to Cold and Heat Is Facilitated by Trehalose Accumulation." *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology* 152, no. 4 (2009): 518-523.
- Benson, EE. "Cryopreservation Theory." *Plant cryopreservation: a practical guide*, (2008): 15-32.
- Benson, JD, AJ Kearsley and AZ Higgins. "Mathematical Optimization of Procedures for Cryoprotectant Equilibration Using a Toxicity Cost Function." *Cryobiology* 64, no. 3 (2012): 144-151. a)

- Benson, JD, EJ Woods, EM Walters and John K Critser. "The Cryobiology of Spermatozoa." *Theriogenology* 78, no. 8 (2012): 1682-1699. b)
- Bergeron, A and P Manjunath. "New Insights Towards Understanding the Mechanisms of Sperm Protection by Egg Yolk and Milk." *Molecular reproduction and development* 73, no. 10 (2006): 1338-1344.
- Bianchi, I, K Calderam, ÉF Maschio, EM Madeira, R da R Ulguim, CD Corcini, DC Bongalhardo, ÉK Corrêa, T Lucia and JC Deschamps. "Evaluation of Amides and Centrifugation Temperature in Boar Semen Cryopreservation." *Theriogenology* 69, no. 5 (2008): 632-638.
- Bielanski, A and G Vajta. "Risk of Contamination of Germplasm During Cryopreservation and Cryobanking in Ivf Units." *Human reproduction*, (2009): dep117.
- Biesmeijer, JC, SPM Roberts, M Reemer, R Ohlemüller, M Edwards, T Peeters, AP Schaffers, SG Potts, R Kleukers and CD Thomas. "Parallel Declines in Pollinators and Insect-Pollinated Plants in Britain and the Netherlands." *Science* 313, no. 5785 (2006): 351-354.
- Bilodeau, JF, S Chatterjee, MA Sirard and C Gagnon. "Levels of Antioxidant Defenses Are Decreased in Bovine Spermatozoa after a Cycle of Freezing and Thawing." *Molecular reproduction and development* 55, no. 3 (2000): 282-288.
- Blaheta, RA, M Franz, MKH Auth, A Encke and BH Markus. "Determination of Cell Counts and Cell Proliferation by the Fluorochromes Hoechst 33342 or Hoechst 33258." In *Cell and Tissue Culture Models in Dermatological Research*, 50-57: Springer, 1993.
- Blyth, E and A Farrand. "Reproductive Tourism-a Price Worth Paying for Reproductive Autonomy?" *Critical Social Policy* 25, no. 1 (2005): 91-114.
- Blyth, E and R Landau. *Third Party Assisted Conception across Cultures: Social, Legal and Ethical Perspectives*: Jessica Kingsley Publishers, 2004.
- Borini, A, R Sciajno, V Bianchi, E Sereni, C Flamigni and G Coticchio. "Clinical Outcome of Oocyte Cryopreservation after Slow Cooling with a Protocol Utilizing a High Sucrose Concentration." *Human Reproduction* 21, no. 2 (2006): 512-517.
- Bousseau, S, JP Brillard, B Marquant-Le Guienne, B Guerin, A Camus and M Lechat. "Comparison of Bacteriological Qualities of Various Egg Yolk Sources and the *in Vitro* and *in Vivo* Fertilizing Potential of Bovine Semen Frozen in Egg Yolk or Lecithin Based Diluents." *Theriogenology* 50, no. 5 (1998): 699-706.

- Brockbank, K GM and Ying C Song. "Mechanisms of Bioprosthetic Heart Valve Calcification1." *Transplantation* 75, no. 8 (2003): 1133-1135.
- Brodshneider, R and K Crailsheim. "Völkerverluste Der Honigbiene: Risikofaktoren Für Die Bestäubungssicherheit in Österreich." *Entomologica Austriaca* 18, (2011): 73-86.
- Brown, MJF and RJ Paxton. "The Conservation of Bees: A Global Perspective." *Apidologie* 40, no. 3 (2009): 410-416.
- Buchanan, SS, SA Gross, JP Acker, M Toner, JF Carpenter and DW Pyatt. "Cryopreservation of Stem Cells Using Trehalose: Evaluation of the Method Using a Human Hematopoietic Cell Line." *Stem cells and development* 13, no. 3 (2004): 295-305.
- Busch, W and D Waberski. *Künstliche Besamung Bei Haus-Und Nutztieren: Mit 72 Tabellen;[Abgestimmt Auf Das Neue Tierzuchtgesetz 2006]*: Schattauer Verlag, 2007.
- Casey, PJ, RB Hillman, KR Robertson, AI Yudin, IKM Liu and EZ Drobins. "Validation of an Acrosomal Stain for Equine Sperm That Differentiates between Living and Dead Sperm." *Journal of andrology* 14, no. 4 (1993): 289-297.
- Celeghini, ECC, RP De Arruda, AFC De Andrade, J Nascimento and CF Raphael. "Practical Techniques for Bovine Sperm Simultaneous Fluorimetric Assessment of Plasma, Acrosomal and Mitochondrial Membranes." *Reproduction in domestic animals* 42, no. 5 (2007): 479-488.
- Celeghini, ECC, J Nascimento, CF Raphael, AFC Andrade and RP Arruda. "Simultaneous Assessment of Plasmatic, Acrosomal, and Mitochondrial Membranes in Ram Sperm by Fluorescent Probes." *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia* 62, no. 3 (2010): 536-543.
- Chohan, KR, JT Griffin, M Lafromboise, CJ Jonge and DT Carrell. "Comparison of Chromatin Assays for DNA Fragmentation Evaluation in Human Sperm." *Journal of andrology* 27, no. 1 (2006): 53-59.
- Chu, EHY. "A Two-Factor Hypothesis of Freezing Injury." *Experim. Cell Research* 71, (1972): 345-355.
- Claassens, OE, R Menkveld, DR Franken, E Pretorius, Y Swart, CJ Lombard and TF Kruger. "The Acridine Orange Test: Determining the Relationship between Sperm Morphology and Fertilization *in Vitro*." *Human Reproduction* 7, no. 2 (1992): 242-247.

- Clarke, AG. "The Frozen Ark Project: The Role of Zoos and Aquariums in Preserving the Genetic Material of Threatened Animals." *International Zoo Yearbook* 43, no. 1 (2009): 222-230.
- Clegg, JS. "Cryptobiosis—a Peculiar State of Biological Organization." *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* 128, no. 4 (2001): 613-624.
- Collins, AM and AM Donoghue. "Viability Assessment of Honey Bee, *Apis Mellifera*, Sperm Using Dual Fluorescent Staining." *Theriogenology* 51, no. 8 (1999): 1513-1523.
- Collins, AM, V Williams and JD Evans. "Sperm Storage and Antioxidative Enzyme Expression in the Honey Bee, *Apis Mellifera*." *Insect molecular biology* 13, no. 2 (2004): 141-146.
- Collins, AM. "Survival of Honey Bee (Hymenoptera: Apidae) Spermatozoa Stored at above-Freezing Temperatures." *Journal of economic entomology* 93, no. 3 (2000): 568-571.
- Correa, JR and PM Zavos. "The Hypoosmotic Swelling Test: Its Employment as an Assay to Evaluate the Functional Integrity of the Frozen-Thawed Bovine Sperm Membrane." *Theriogenology* 42, no. 2 (1994): 351-360.
- Cortés-Gutiérrez, EI, MI Dávila-Rodríguez, C López-Fernández, JL Fernández, and J Gosálvez, "Evaluación del daño en el DNA espermático". *Actas Urológicas Españolas*, 31 no.2 (2007), 120-131.
- Costa-Balogh, FO, H Wennerström, L Wadsö and E Sparr. "How Small Polar Molecules Protect Membrane Systems against Osmotic Stress: The Urea-Water-Phospholipid System." *The Journal of Physical Chemistry B* 110, no. 47 (2006): 23845-23852.
- Costanzo, JP and RE Lee. "Cryoprotection by Urea in a Terrestrially Hibernating Frog." *Journal of Experimental Biology* 208, no. 21 (2005): 4079-4089.
- Cross, NL and SK Watson. "Assessing Acrosomal Status of Bovine Sperm Using Fluoresceinated Lectins." *Theriogenology* 42, no. 1 (1994): 89-98.
- Crowe, JH. "Anhydrobiosis: An Unsolved Problem." *Plant, cell & environment* 37, no. 7 (2014): 1491-1493.
- Crowe, JH, JF Carpenter and LM Crowe. "The Role of Vitrification in Anhydrobiosis." *Annual review of physiology* 60, no. 1 (1998): 73-103.

- Crowe, JH, FA Hoekstra and LM Crowe. "Anhydrobiosis." *Annual Review of Physiology* 54, no. 1 (1992): 579-599.
- Crowe, LM. "Lessons from Nature: The Role of Sugars in Anhydrobiosis." *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology* 131, no. 3 (2002): 505-513.
- Crowe, LM, DS Reid and JH Crowe. "Is Trehalose Special for Preserving Dry Biomaterials?" *Biophysical Journal* 71, no. 4 (1996): 2087.
- Cruz-Landim, C. "Organization of the Cysts in Bee (Hymenoptera, Apidae) Testis: Number of Spermatozoa Per Cyst." *Iheringia. Série Zoologia*, no. 91 (2001): 183-189.
- Dainat, B, JD Evans, YP Chen, Laurent Gauthier and Peter Neumann. "Predictive Markers of Honey Bee Colony Collapse." *PLoS one* 7, no. 2 (2012): e32151.
- De Baulny, B Ogier, C Labbé and G Maisse. "Membrane Integrity, Mitochondrial Activity, Atp Content, and Motility of the European Catfish (*Silurus Glanis*) Testicular Spermatozoa after Freezing with Different Cryoprotectants." *Cryobiology* 39, no. 2 (1999): 177-184.
- De Castro, MP Viudes, C Cortell and JS Vicente. "Dextran Vitrification Media Prevents Mucin Coat and Zona Pellucida Damage in Rabbit Embryo." *Theriogenology* 74, no. 9 (2010): 1623-1628.
- De la Rúa, P, R Jaffé, R Dall'Olio, I Muñoz and J Serrano. "Biodiversity, Conservation and Current Threats to European Honeybees." *Apidologie* 40, no. 3 (2009): 263-284.
- Desneux, N, A Decourtye and JM Delpuech. "The Sublethal Effects of Pesticides on Beneficial Arthropods." *Annu. Rev. Entomol.* 52, (2007): 81-106.
- Didion, BA, JR Dobrinsky, JR Giles and CN Graves. "Staining Procedure to Detect Viability and the True Acrosome Reaction in Spermatozoa of Various Species." *Gamete research* 22, no. 1 (1989): 51-57.
- Domínguez-Fandos, D, MI Camejo, JL Balleca and R Oliva. "Human Sperm DNA Fragmentation: Correlation of Tunel Results as Assessed by Flow Cytometry and Optical Microscopy." *Cytometry Part A* 71, no. 12 (2007): 1011-1018.
- Doncaster, L. "Spermatogenesis of the Hive Bee (*Apis Mellifica*)." *Anal. Anz* 29, (1906): 490-491.

- Donnez, J, B Martinez-Madrid, P Jadoul, A Van Langendonck, D Demylle and MM Dolmans. "Ovarian Tissue Cryopreservation and Transplantation: A Review." *Human Reproduction Update* 12, no. 5 (2006): 519-535.
- Drobnis, EZ, LM Crowe, T Berger, TJ Anchordoguy, JW Overstreet and JH Crowe. "Cold Shock Damage Is Due to Lipid Phase Transitions in Cell Membranes: A Demonstration Using Sperm as a Model." *Journal of Experimental Zoology* 265, no. 4 (1993): 432-437.
- Dulin, F, C Zatylny-Gaudin, C Ballandonne, B Guillet, R Bonafos, R Bureau and MP Halm. "Protecting Honey Bees: Identification of a New Varroacide by *in Silico*, *in Vitro*, and *in Vivo* Studies." *Parasitology research* 113, no. 12 (2014): 4601-4610.
- Dumser, JB. "The Regulation of Spermatogenesis in Insects." *Annual review of entomology* 25, no. 1 (1980): 341-369.
- Dunn, HO, RW Bratton and WJ Collins. "Fertility and Motility of Bovine Spermatozoa in Buffered Whole Egg Extenders." *Journal of Dairy Science* 33, no. 6 (1950): 434-437.
- Eriksson, BM and H Rodriguez-Martinez. "Effect of Freezing and Thawing Rates on the Post-Thaw Viability of Boar Spermatozoa Frozen in Flatpacks and Maxi-Straws." *Animal reproduction science* 63, no. 3 (2000): 205-220.
- Fabbri, R, E Porcu, T Marsella, G Rocchetta, S Venturoli and C Flamigni. "Human Oocyte Cryopreservation: New Perspectives Regarding Oocyte Survival." *Human reproduction* 16, no. 3 (2001): 411-416.
- Fahning, ML and MA Garcia. "Status of Cryopreservation of Embryos from Domestic Animals." *Cryobiology* 29, no. 1 (1992): 1-18.
- Fahrenhorst, H. "Nachweis Übereinstimmender Chromosomenzahlen (N= 16) Bei Allen 4." *Apis*, 1977.
- Fahy, GM. "The Relevance of Cryoprotectant "Toxicity" to Cryobiology." *Cryobiology* 23, no. 1 (1986): 1-13.
- Fahy, GM. "Cryoprotectant Toxicity Neutralization." *Cryobiology* 60, no. 3 (2010): S45-S53.
- Fahy, GM, DI Levy and SE Ali. "Some Emerging Principles Underlying the Physical Properties, Biological Actions, and Utility of Vitrification Solutions." *Cryobiology* 24, no. 3 (1987): 196-213.

- Fahy, GM, Terence H Lilley, Helen Linsdell, Mary St John Douglas and Harold T Meryman. "Cryoprotectant Toxicity and Cryoprotectant Toxicity Reduction: In Search of Molecular Mechanisms." *Cryobiology* 27, no. 3 (1990): 247-268.
- Fahy, GM, B Wowk, R Pagotan, A Chang, J Phan, B Thomson and L Phan. "Physical and Biological Aspects of Renal Vitrification." *Organogenesis* 5, no. 3 (2009): 167-175.
- Fahy, GM, B Wowk and J Wu. "Cryopreservation of Complex Systems: The Missing Link in the Regenerative Medicine Supply Chain." *Rejuvenation research* 9, no. 2 (2006): 279-291.
- Fahy, GM, B Wowk, J Wu, J Phan, C Rasch, A Chang and E Zendejas. "Cryopreservation of Organs by Vitrification: Perspectives and Recent Advances." *Cryobiology* 48, no. 2 (2004): 157-178.
- Fazeli, A, WJ Hage, FP Cheng, WF Voorhout, A Marks, MM Bevers and B Colenbrander. "Acrosome-Intact Boar Spermatozoa Initiate Binding to the Homologous Zona Pellucida *in Vitro*." *Biology of reproduction* 56, no. 2 (1997): 430-438.
- Fernandez, JL, L Muriel, MT Rivero, V Goyanes, R Vazquez and JG Alvarez. "The Sperm Chromatin Dispersion Test: A Simple Method for the Determination of Sperm DNA Fragmentation." *Journal of andrology* 24, no. 1 (2003): 59-66.
- Flesch, FM and BM Gadella. "Dynamics of the Mammalian Sperm Plasma Membrane in the Process of Fertilization." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Biomembranes* 1469, no. 3 (2000): 197-235.
- Fluri, P. "Die Regulation Der Lebensdauer Bei Bienenarbeiterinnen." *Agrarforschung*, (1994).
- Fluri, P. "Regulation Der Lebensdauer Bei Arbeiterinnen Der Honigbienen: Bedeutung Der Brutpflege, Des Nachwuchses Und Der Volksgrösse." (2012).
- Fontaine, C, I Dajoz, J Meriguet and M Loreau. "Functional Diversity of Plant–Pollinator Interaction Webs Enhances the Persistence of Plant Communities." *PLoS biology* 4, no. 1 (2005): e1.
- Freimark, D, C Sehl, C Weber, K Hudel, P Czermak, N Hofmann, R Spindler and B Glasmacher. "Systematic Parameter Optimization of a Me 2 So-and Serum-Free Cryopreservation Protocol for Human Mesenchymal Stem Cells." *Cryobiology* 63, no. 2 (2011): 67-75.
- Fries, I. "Nosema Ceranae in European Honey Bees (*Apis Mellifera*)." *Journal of invertebrate pathology* 103, (2010): S73-S79.

- Fuller, BJ. "Cryoprotectants: The Essential Antifreezes to Protect Life in the Frozen State." *CryoLetters* 25, no. 6 (2004): 375-388.
- Fyg, W. "Über Den Einfluss Von Metamorphose-Häutungsstörungen Und Ligaturen Auf Die Spermatogenese Der Honigbiene (*Apis Mellifica* L.)." *Apidologie* 4, no. 3 (1973): 227-265.
- Gadea, J, F García-Vazquez, C Matás, JC Gardón, S Cánovas and D Gumbao. "Cooling and Freezing of Boar Spermatozoa: Supplementation of the Freezing Media with Reduced Glutathione Preserves Sperm Function." *Journal of andrology* 26, no. 3 (2005): 396-404.
- Gallai, N, JM Salles, J Settele and BE Vaissière. "Economic Valuation of the Vulnerability of World Agriculture Confronted with Pollinator Decline." *Ecological economics* 68, no. 3 (2009): 810-821.
- Gangal, S. "Computer-Assisted Semen Analysis (Casa)." *A Workbook on Human Spermatozoa and Assisted Conception* 15, (2011).
- Gao, DY and JK Critser. "Mechanisms of Cryoinjury in Living Cells." *Ilar Journal* 41, no. 4 (2000): 187-196.
- Gao, DY, J Liu, C Liu, LE McGann, PF Watson, FW Kleinhans, P Mazur, ES Critser and JK Critser. "Andrology: Prevention of Osmotic Injury to Human Spermatozoa During Addition and Removal of Glycerol." *Human Reproduction* 10, no. 5 (1995): 1109-1122.
- Garcia, JC, JC Dominguez, FJ Pena, B Alegre, R Gonzalez, MJ Castro, GG Habing and RN Kirkwood. "Thawing Boar Semen in the Presence of Seminal Plasma: Effects on Sperm Quality and Fertility." *Animal reproduction science* 119, no. 1 (2010): 160-165.
- Garratt, MPD, TD Breeze, N Jenner, C Polce, JC Biesmeijer and SG Potts. "Avoiding a Bad Apple: Insect Pollination Enhances Fruit Quality and Economic Value." *Agriculture, ecosystems & environment* 184, (2014): 34-40.
- Genersch, E. "American Foulbrood in Honeybees and Its Causative Agent, *Paenibacillus* Larvae." *Journal of invertebrate pathology* 103, (2010): S10-S19. a)
- Genersch, E. "Honey Bee Pathology: Current Threats to Honey Bees and Beekeeping." *Applied microbiology and biotechnology* 87, no. 1 (2010): 87-97. b)
- Genersch, E, W Von Der Ohe, H Kaatz, A Schroeder, C Otten, R Büchler, S Berg, W Ritter, W Mühlen and S Gisder. "The German Bee Monitoring Project: A Long Term Study to

- Understand Periodically High Winter Losses of Honey Bee Colonies." *Apidologie* 41, no. 3 (2010): 332-352.
- Ghazoul, J. "Buzziness as Usual? Questioning the Global Pollination Crisis." *Trends in ecology & evolution* 20, no. 7 (2005): 367-373.
- Ghetler, Y, S Yavin, R Shalgi and A Arav. "The Effect of Chilling on Membrane Lipid Phase Transition in Human Oocytes and Zygotes." *Human reproduction* 20, no. 12 (2005): 3385-3389.
- Gilmore, JA, J Liu, DY Gao and JK Critser. "Determination of Optimal Cryoprotectants and Procedures for Their Addition and Removal from Human Spermatozoa." *Human Reproduction* 12, no. 1 (1997): 112-118.
- Glasmacher, B, F Evertz, I Bernemann, H Sun, D Pogozhikh, R Spindler, N Hofmann. "New Cryopreservation Strategies: A View from Biothermal and Biomedical Process Technology." *7th International Conference of Boar Semen Preservation*, (2011).
- Grunewald, S, R Sharma, U Paasch, HJ Glander and A Agarwal. "Impact of Caspase Activation in Human Spermatozoa." *Microscopy research and technique* 72, no. 11 (2009): 878-888.
- Gutierrez, A, C GaArtiga, J Garde and B Pintado. "Effect of Equilibration Period and Cryoprotectant in Quick Freezing of Mouse Morulae." *Theriogenology* 39, no. 1 (1993): 229.
- Guzman-Novoa, E, B Emsen, P Unger, LG Espinosa-Montaño and T Petukhova. "Genotypic Variability and Relationships between Mite Infestation Levels, Mite Damage, Grooming Intensity, and Removal of Varroa Destructor Mites in Selected Strains of Worker Honey Bees (*Apis Mellifera* L.)." *Journal of invertebrate pathology* 110, no. 3 (2012): 314-320.
- Hanada, A and H Nagase. "Cryoprotective Effects of Some Amides on Rabbit Spermatozoa." *Journal of reproduction and fertility* 60, no. 1 (1980): 247-252.
- Harbo, JR. "Survival of Honey Bee Spermatozoa in Liquid Nitrogen." *Annals of the Entomological Society of America* 70, no. 2 (1977): 257-258.
- Harbo, JR. "Survival of Honey Bee (Hymenoptera: Apidae) Spermatozoa after Two Years in Liquid Nitrogen (-196 C)." *Annals of the Entomological Society of America* 76, no. 5 (1983): 890-891.
- Harbo, JR. "Sterility in Honey Bees Caused by Dimethyl Sulfoxide." *Journal of Heredity* 77, no. 2 (1986): 129-130.

- Harbo, JR. "Storage of Honeybee Spermatozoa at-196 Deg C." *Journal of Apicultural Research*, (1979).
- Harrison, C. *The Book of the Honey Bee*. Vol. 14: J. Lane, 1903.
- Harrison, RAP and SE Vickers. "Use of Fluorescent Probes to Assess Membrane Integrity in Mammalian Spermatozoa." *Journal of Reproduction and Fertility* 88, no. 1 (1990): 343-352.
- Hasler, JF. "The Current Status and Future of Commercial Embryo Transfer in Cattle." *Animal reproduction science* 79, no. 3 (2003): 245-264.
- Hayes Jr, J, RM Underwood and J Pettis. "A Survey of Honey Bee Colony Losses in the Us, Fall 2007 to Spring 2008." *PloS one* 3, no. 12 (2008): e4071.
- Higes, M, R Martín-Hernández and A Meana. "Nosema Ceranae in Europe: An Emergent Type C Nosemosis." *Apidologie* 41, no. 3 (2010): 375-392.
- Higes, M, R Martín-Hernández, C Botías, EG Bailón, AV González-Porto, L Barrios, M Jesus del Nozal, JL Bernal, JJ Jiménez and P García Palencia. "How Natural Infection by Nosema Ceranae Causes Honeybee Colony Collapse." *Environmental microbiology* 10, no. 10 (2008): 2659-2669.
- Higes, M, R Martín and A Meana. "Nosema Ceranae, a New Microsporidian Parasite in Honeybees in Europe." *Journal of invertebrate pathology* 92, no. 2 (2006): 93-95.
- Hinsch, E, K-D Hinsch, JG Boehm, W-B Schill and F Mueller-Schloesser. "Functional Parameters and Fertilization Success of Bovine Semen Cryopreserved in Egg-Yolk Free and Egg-Yolk Containing Extenders." *Reproduction in Domestic Animals* 32, no. 3 (1997): 143-149.
- Hoage, TR and RG Kessel. "An Electron Microscope Study of the Process of Differentiation During Spermatogenesis in the Drone Honey Bee (*Apis Mellifera* L.) with Special Reference to Centriole Replication and Elimination." *Journal of ultrastructure research* 24, no. 1 (1968): 6-32.
- Hochi, S, E Semple and SP Leibo. "Effect of Cooling and Warming Rates During Cryopreservation on Survival of *in Vitro*-Produced Bovine Embryos." *Theriogenology* 46, no. 5 (1996): 837-847.
- Höing, M. "Strukturelle Und Funktionelle Untersuchungen an Substratbindeproteinen Aus Abc-Transportern Zur Aufnahme Von Kompatiblen Soluten." Philipps-Universität Marburg, 2008.

- Holt, WV, LM Penfold, P Chenoweth and S Lorton. "Fundamental and Practical Aspects of Semen Cryopreservation." *Animal Andrology: Theories and Applications*, (2014): 76.
- Holt, WV. "Basic Aspects of Frozen Storage of Semen." *Animal reproduction science* 62, no. 1 (2000): 3-22.
- Honadel, TE and GJ Killian. "Cryopreservation of Murine Embryos with Trehalose and Glycerol." *Cryobiology* 25, no. 4 (1988): 331-337.
- Hopkins, BK, C Herr and WS Sheppard. "Sequential Generations of Honey Bee (*Apis Mellifera*) Queens Produced Using Cryopreserved Semen." *Reproduction, Fertility and Development* 24, no. 8 (2012): 1079-1083.
- Hopkins, BK and C Herr. "Factors Affecting the Successful Cryopreservation of Honey Bee (*Apis Mellifera*) Spermatozoa." *Apidologie* 41, no. 5 (2010): 548-556.
- Hoshi, K, H Katayose, K Yanagida, Y Kimura and A Sato. "The Relationship between Acridine Orange Fluorescence of Sperm Nuclei and the Fertilizing Ability of Human Sperm." *Fertility and sterility* 66, no. 4 (1996): 634-639.
- Hrassnigg, N and K Crailsheim. "Differences in Drone and Worker Physiology in Honeybees (*Apis Mellifera*)." *Apidologie* 36, no. 2 (2005): 255-277.
- Hu, JH, ZL Jiang, RK Lv, QW Li, SS Zhang, LS Zan, YK Li and X Li. "The Advantages of Low-Density Lipoproteins in the Cryopreservation of Bull Semen." *Cryobiology* 62, no. 1 (2011): 83-87.
- Huang, TTF, AD Fleming and R Yanagimachi. "Only Acrosome-Reacted Spermatozoa Can Bind to and Penetrate Zona Pellucida: A Study Using the Guinea Pig." *Journal of Experimental Zoology* 217, no. 2 (1981): 287-290.
- Huang, WF, JH Jiang, YW Chen and CH Wang. "A *Nosema Ceranae* Isolate from the Honeybee *Apis Mellifera*." *Apidologie* 38, no. 1 (2007): 30-37.
- Huang, ZY and GE Robinson. "Regulation of Honey Bee Division of Labor by Colony Age Demography." *Behavioral Ecology and Sociobiology* 39, no. 3 (1996): 147-158.
- Iaffaldano, N, M Di Iorio and M Pina Rosato. "The Cryoprotectant Used, Its Concentration, and the Equilibration Time Are Critical for the Successful Cryopreservation of Rabbit Sperm: Dimethylacetamide Versus Dimethylsulfoxide." *Theriogenology* 78, no. 6 (2012): 1381-1389.

- Imdorf, A, K Ruoff and P Fluri. "Volksentwicklung Bei Der Honigbiene." In *ALP Forum*, 68, 1-88, 2009.
- Isachenko, E, V Isachenko, II Katkov, S Dessole and F Nawroth. "Vitrification of Mammalian Spermatozoa in the Absence of Cryoprotectants: From Past Practical Difficulties to Present Success." *Reproductive biomedicine online* 6, no. 2 (2003): 191-200.
- Ishimori, H, Y Takahashi and H Kanagawa. "Viability of Vitrified Mouse Embryos Using Various Cryoprotectant Mixtures." *Theriogenology* 37, no. 2 (1992): 481-487.
- Jeruss, JS and TK Woodruff. "Preservation of Fertility in Patients with Cancer." *New England Journal of Medicine* 360, no. 9 (2009): 902-911.
- Jeyendran, RS, HH Van der Ven, M Perez-Pelaez, BG Crabo and LJD Zaneveld. "Development of an Assay to Assess the Functional Integrity of the Human Sperm Membrane and Its Relationship to Other Semen Characteristics." *Journal of reproduction and fertility* 70, no. 1 (1984): 219-228.
- Jeyendran, RS, HH Van der Ven and LJD Zaneveld. "The Hypoosmotic Swelling Test: An Update." *Systems Biology in Reproductive Medicine* 29, no. 2 (1992): 105-116.
- Johnson, LA. "In Memoriam: Ernest John Christopher Polge (1926–2006)." *Theriogenology* 70, no. 8 (2008): 1172-1173.
- Jouannet, P. "[Evolution of Assisted Reproductive Technologies]." *Bulletin de l'Academie nationale de medecine* 193, no. 3 (2009): 573-582.
- Kaftanoglu, O and YS Peng. "Preservation of Honeybee Spermatozoa in Liquid Nitrogen." *Journal of Apicultural Research (UK)*, (1984).
- Kaiser, F. „Mehring, Johannes“, *Neue Deutsche Biographie*, 16 (1990): 625 f. [Onlinefassung]; URL: <http://www.deutsche-biographie.de/pnd136774040.html>
- Kagawa, N, S Silber and M Kuwayama. "Successful Vitrification of Bovine and Human Ovarian Tissue." *Reproductive biomedicine online* 18, no. 4 (2009): 568-577.
- Karlsson, JOM and M Toner. "Long-Term Storage of Tissues by Cryopreservation: Critical Issues." *Biomaterials* 17, no. 3 (1996): 243-256.
- Kasai, M and T Mukaida. "Cryopreservation of Animal and Human Embryos by Vitrification." *Reproductive BioMedicine Online* 9, no. 2 (2004): 164-170.

- Keeling, CI, KN Slessor, HA Higo and ML Winston. "New Components of the Honey Bee (*Apis Mellifera* L.) Queen Retinue Pheromone." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100, no. 8 (2003): 4486-4491.
- Keiner-Stoehr, W "Versuche Zur Eignung Verschiedener Puffer Bei Der Instrumentellen Besamung Der Bienenkönigin (*Apis Mellifera*)." Universitätsbibliothek Giessen, 2004.
- Kennedy, WP, JM Kaminski, HH Ven, RS Jeyendran, DS Reid, J Blackwell, P Bielfeld and LJD Zaneveld. "A Simple, Clinical Assay to Evaluate the Acrosin Activity of Human Spermatozoa." *Journal of andrology* 10, no. 3 (1989): 221-231.
- Kim, S, YJ Lee, DB Ji and YJ Kim. "Evaluation of Different Cryoprotectants (Cpas) in Boar Semen Cryopreservation." *Journal of Veterinary Medical Science* 73, no. 7 (2011): 961-963.
- Klatt, BK, A Holzschuh, C Westphal, Y Clough, I Smit, E Pawelzik and T Tschardt. "Bee Pollination Improves Crop Quality, Shelf Life and Commercial Value." *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 281, no. 1775 (2014): 20132440.
- Klein, AM, BE Vaissiere, JH Cane, I Steffan-Dewenter, SA Cunningham, C Kremen and T Tschardt. "Importance of Pollinators in Changing Landscapes for World Crops." *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 274, no. 1608 (2007): 303-313.
- Kluser, S, P Neumann, MP Chauzat, JS Pettis, P Peduzzi, R Witt, N Fernandez and M Theuri. "Global Honey Bee Colony Disorders and Other Threats to Insect Pollinators." (2010).
- Knapp, S, R Ladenstein and EA Galinski. "Extrinsic Protein Stabilization by the Naturally Occurring Osmolytes B-Hydroxyectoine and Betaine." *Extremophiles* 3, no. 3 (1999): 191-198.
- Kosior, A, W Celary, P Olejniczak, J Fijał, W Krol, W Solarz and P Plonka. "The Decline of the Bumble Bees and Cuckoo Bees (Hymenoptera: Apidae: Bombini) of Western and Central Europe." *Oryx* 41, no. 01 (2007): 79-88.
- Kovacs, A and RH Foote. "Viability and Acrosome Staining of Bull, Boar and Rabbit Spermatozoa." *Biotechnic & histochemistry* 67, no. 3 (1992): 119-124.
- Kraft, LA, CW Foley, B Howarth, MS Blum and AD Johnson. "Radiorespirometric Studies of Carbohydrate Metabolism by Washed Spermatozoa of Various Species." *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry* 60, no. 3 (1978): 233-238.

Krause, W, W Weidner, H Sperling, and T Diemer." *Andrologie: Krankheiten der männlichen Geschlechtsorgane.*" (2011) Georg Thieme Verlag.

Kuleshova, LL and A Lopata. "Vitrification Can Be More Favorable Than Slow Cooling." *Fertility and sterility* 78, no. 3 (2002): 449-454.

Kumi-Diaka, J. "Subjecting Canine Semen to the Hypo-Osmotic Test." *Theriogenology* 39, no. 6 (1993): 1279-1289.

Kundu, CN, K Das and GC Majumder. "Effect of Amino Acids on Goat Cauda Epididymal Sperm Cryopreservation Using a Chemically Defined Model System." *Cryobiology* 42, no. 1 (2001): 21-27.

Kuwayama, M. "Highly Efficient Vitrification for Cryopreservation of Human Oocytes and Embryos: The Cryotop Method." *Theriogenology* 67, no. 1 (2007): 73-80.

Le Conte, Y and M Navajas. "Climate Change: Impact on Honey Bee Populations and Diseases." *Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)*, no. 27 (2008): 485-97, 499-510.

Le Conte, Y, M Ellis and W Ritter. "Varroa Mites and Honey Bee Health: Can Varroa Explain Part of the Colony Losses?" *Apidologie* 41, no. 3 (2010): 353-363.

Le Gal, F and A Massip. "Cryopreservation of Cattle Oocytes: Effects of Meiotic Stage, Cycloheximide Treatment, and Vitrification Procedure." *Cryobiology* 38, no. 4 (1999): 290-300.

Leibo, SP and Thomas B Pool. "The Principal Variables of Cryopreservation: Solutions, Temperatures, and Rate Changes." *Fertility and sterility* 96, no. 2 (2011): 269-276.

Lensky, Y, E Ben-David and H Schindler. "Ultrastructure of the Spermatozoon of the Mature Drone Honeybee." *Journal of apicultural research*, (1979).

Lensky, Y and H Schindler. *Motility and Reversible Inactivation of Honeybee Spermatozoa in Vivo and in Vitro*: Institut national de la recherche agronomique, 1967.

Lentzen, G and T Schwarz. "Kompatible Solute: Mikrobielle Herstellung Und Anwendung." In *Angewandte Mikrobiologie*, 355-371: Springer, 2006.

Lermen, D, B Blömeke, R Browne, A Clarke, PW Dyce, T Fixemer, GR Fuhr, WV Holt, K Jewgenow and RE Lloyd. "Cryobanking of Viable Biomaterials: Implementation of New Strategies for Conservation Purposes." *Molecular ecology* 18, no. 6 (2009): 1030-1033.

- Leuvenink, HGD. "Novel Organ Preservation Methods: Not Only Cool but Supercool!" *Transplantation* 99, no. 4 (2015): 647-648.
- Lino-Neto, J, SN Báo and H Dolder. "Sperm Ultrastructure of the Honey Bee (*Apis Mellifera*)(L)(Hymenoptera, Apidae) with Emphasis on the Nucleus-Flagellum Transition Region." *Tissue and Cell* 32, no. 4 (2000): 322-327.
- Lippert, K and EA Galinski. "Enzyme Stabilization Be Ectoine-Type Compatible Solutes: Protection against Heating, Freezing and Drying." *Applied Microbiology and Biotechnology* 37, no. 1 (1992): 61-65.
- Locke, B, Y Le Conte, D Crauser and I Fries. "Host Adaptations Reduce the Reproductive Success of *Varroa Destructor* in Two Distinct European Honey Bee Populations." *Ecology and evolution* 2, no. 6 (2012): 1144-1150.
- Locke, SJ, YS Peng and NL Cross. "A Supravital Staining Technique for Honey Bee Spermatozoa." *Physiological entomology* 15, no. 2 (1990): 187-192.
- Lopes, S, A Jurisicova, JG Sun and RF Casper. "Reactive Oxygen Species: Potential Cause for DNA Fragmentation in Human Spermatozoa." *Human Reproduction* 13, no. 4 (1998): 896-900.
- López-Fernández, C, JL Fernández, A Gosálbez, F Arroyo, JM Vázquez, WV Holt and J Gosálvez. "Dynamics of Sperm DNA Fragmentation in Domestic Animals: Iii. Ram." *Theriogenology* 70, no. 6 (2008): 898-908.
- Lovelock, JE and MWH Bishop. "Prevention of Freezing Damage to Living Cells by Dimethyl Sulphoxide." (1959).
- Martin, G, O Sabido, P Durand and R Levy. "Cryopreservation Induces an Apoptosis-Like Mechanism in Bull Sperm." *Biology of Reproduction* 71, no. 1 (2004): 28-37.
- Martino, A, N Songsasen and SP Leibo. "Development into Blastocysts of Bovine Oocytes Cryopreserved by Ultra-Rapid Cooling." *Biology of Reproduction* 54, no. 5 (1996): 1059-1069.
- Martins, CF, MN Dode, SN Báo and R Rumpf. "The Use of the Acridine Orange Test and the Tunel Assay to Assess the Integrity of Freeze-Dried Bovine Spermatozoa DNA." *Genet Mol Res* 6, no. 1 (2007): 94-104.
- Massip, A. "Cryopreservation of Embryos of Farm Animals." *Reproduction in Domestic Animals* 36, no. 2 (2001): 49-55.

- Mazur, P. "The Role of Intracellular Freezing in the Death of Cells Cooled at Supraoptimal Rates." *Cryobiology* 14, no. 3 (1977): 251-272.
- Mazur, P. "Limits to Life at Low Temperatures and at Reduced Water Contents and Water Activities." In *Limits of Life*, 1-23: Springer, 1980.
- Mazur, P. "Freezing of Living Cells: Mechanisms and Implications." *American Journal of Physiology-Cell Physiology* 247, no. 3 (1984): C125-C142.
- Mazur, P, Ulrich Schneider and Anthony P Mahowald. "Characteristics and Kinetics of Subzero Chilling Injury in Drosophila Embryos." *Cryobiology* 29, no. 1 (1992): 39-68.
- McClellan, R, YP Zee, WV Holt and SD Johnston. "Cryopreservation of Kangaroo Spermatozoa Using Alternative Approaches That Reduce Cytotoxic Exposure to Glycerol." *Cryobiology* 57, no. 3 (2008): 304-307.
- Medeiros, CMO, F Forell, ATD Oliveira and JL Rodrigues. "Current Status of Sperm Cryopreservation: Why Isn't It Better?" *Theriogenology* 57, no. 1 (2002): 327-344.
- Medicine, Practice Committee of the American Society for Reproductive. "Ovarian Tissue and Oocyte Cryopreservation." *Fertility and Sterility* 82, no. 4 (2004): 993-998.
- Mehring, J. *Das Neue Einwesensystem, Als Grundlage Zur Bienenzucht: Oder Wie Der Rationelle Imker Den Höchsten Ertrag Von Seinen Bienen Erzielt: Auf Selbsterfahrungen Gegründet*: Albeck, 1869.
- Meixner, MD. "A Historical Review of Managed Honey Bee Populations in Europe and the United States and the Factors That May Affect Them." *Journal of invertebrate pathology* 103, (2010): S80-S95.
- Melnichenko, AN and IL Vavilov. "Long Term Storage of Drone Sperm by Freezing in Liquid Nitrogen." In *Apimondia (conference proceedings)*, 311-14, 1975.
- Meryman, HT. "Freezing Injury and Its Prevention in Living Cells." *Annual Review of Biophysics and Bioengineering* 3, no. 1 (1974): 341-363.
- Meryman, HT. "Cryopreservation of Living Cells: Principles and Practice." *Transfusion* 47, no. 5 (2007): 935-945.
- Meryman, HT. "Cryoprotective Agents." *Cryobiology* 8, no. 2 (1971): 173-183.

- Meves, F. "Die Spermatocytenteilungen Bei Der Honigbiene (*Apis Meliifica* L) Nebst Bemerkungen Über Chromatinreduktion." *Archiv für mikroskopische Anatomie* 70, no. 1 (1907): 414-491.
- Migishima, F, R Suzuki-Migishima, SY Song, T Kuramochi, S Azuma, M Nishijima and M Yokoyama. "Successful Cryopreservation of Mouse Ovaries by Vitrification." *Biology of Reproduction* 68, no. 3 (2003): 881-887.
- Miyamoto, H and T Ishibashi. "Survival of Frozen-Thawed Mouse and Rat Embryos in the Presence of Ethylene Glycol." *Journal of reproduction and fertility* 50, no. 2 (1977): 373-375.
- Miyamoto, H and T Ishibashi. "The Protective Action of Glycols against Freezing Damage of Mouse and Rat Embryos." *Journal of reproduction and fertility* 54, no. 2 (1978): 427-432.
- Mônica, C, J Lino-Neto and H Dolder. "Spermatogenesis of *Melipona Quadrifasciata* Anthidioides (Hymenoptera: Apidae): Fate of the Atypical Spermatids." *Caryologia* 58, no. 2 (2005): 183-188.
- Morris, GJ and E Acton. "Controlled Ice Nucleation in Cryopreservation—a Review." *Cryobiology* 66, no. 2 (2013): 85-92.
- Morris, GJ, E Acton, Benjamin J Murray and Fernanda Fonseca. "Freezing Injury: The Special Case of the Sperm Cell." *Cryobiology* 64, no. 2 (2012): 71-80.
- Morris, GJ. "Rapidly Cooled Human Sperm: No Evidence of Intracellular Ice Formation." *Human Reproduction* 21, no. 8 (2006): 2075-2083.
- Morris, GJ, K Faszler, JE Green, D Draper, BWW Grout and F Fonseca. "Rapidly Cooled Horse Spermatozoa: Loss of Viability Is Due to Osmotic Imbalance During Thawing, Not Intracellular Ice Formation." *Theriogenology* 68, no. 5 (2007): 804-812.
- Morris, JP, S Berghmans, D Zahrieh, DS Neuberg, JP Kanki and AT Look. "Zebrafish Sperm Cryopreservation with N, N-Dimethylacetamide." *Biotechniques* 35, no. 5 (2003): 956-967.
- Moussa, M, V Martinet, A Trimeche, D Tainturier and M Anton. "Low Density Lipoproteins Extracted from Hen Egg Yolk by an Easy Method: Cryoprotective Effect on Frozen–Thawed Bull Semen." *Theriogenology* 57, no. 6 (2002): 1695-1706.
- Muldrew, K, JP Acker, JAW Elliott and LE McGann. "The Water to Ice Transition: Implications for Living Cells." *Life in the frozen state*, (2004): 67-108.

- Münch, D and GV Amdam. "The Curious Case of Aging Plasticity in Honey Bees." *FEBS letters* 584, no. 12 (2010): 2496-2503.
- Muratori, M, P Pioboni, E Baldi, E Filimberti, P Pecchioli, E Moretti, L Gambera, B Baccetti, R Biagiotti and G Forti. "Functional and Ultrastructural Features of DNA-Fragmented Human Sperm." *Journal of andrology* 21, no. 6 (2000): 903-912.
- Nagy, S, J Jansen, EK Topper and BM Gadella. "A Triple-Stain Flow Cytometric Method to Assess Plasma-and Acrosome-Membrane Integrity of Cryopreserved Bovine Sperm Immediately after Thawing in Presence of Egg-Yolk Particles." *Biology of reproduction* 68, no. 5 (2003): 1828-1835.
- Naug, D. "Nutritional Stress Due to Habitat Loss May Explain Recent Honeybee Colony Collapses." *Biological Conservation* 142, no. 10 (2009): 2369-2372.
- Neild, D, G Chaves, M Flores, N Mora, M Beconi and A Agüero. "Hypoosmotic Test in Equine Spermatozoa." *Theriogenology* 51, no. 4 (1999): 721-727.
- Neumann, P, O Yañez, I Fries and JR de Miranda. "Varroa Invasion and Virus Adaptation." *Trends in parasitology* 28, no. 9 (2012): 353-354.
- Oehninger, S, NK Duru, C Srisombut and M Morshedi. "Assessment of Sperm Cryodamage and Strategies to Improve Outcome." *Molecular and Cellular Endocrinology* 169, no. 1 (2000): 3-10.
- Orief, Y, A Schultze-Mosgau, K Dafopoulos and S Al-Hasani. "Review-Vitrification: Will It Replace the Conventional Gamete Cryopreservation Techniques?", (2005).
- Ozkavukcu, S and E Erdemli. "Cryopreservation: Basic Knowledge and Biophysical Effects." *J Ankara Medical School* 24, (2002): 187-196.
- Paasch, U, S Grunewald, A Agarwal and HJ Glandera. "Activation Pattern of Caspases in Human Spermatozoa." *Fertility and sterility* 81, (2004): 802-809.
- Paasch, U, RK Sharma, AK Gupta, S Grunewald, EJ Mascha, AJ Thomas, HJ Glander and A Agarwal. "Cryopreservation and Thawing Is Associated with Varying Extent of Activation of Apoptotic Machinery in Subsets of Ejaculated Human Spermatozoa." *Biology of Reproduction* 71, no. 6 (2004): 1828-1837.
- Parks, JE and JK Graham. "Effects of Cryopreservation Procedures on Sperm Membranes." *Theriogenology* 38, no. 2 (1992): 209-222.
- Parks, JE and DV Lynch. "Lipid Composition and Thermotropic Phase Behavior of Boar, Bull, Stallion, and Rooster Sperm Membranes." *Cryobiology* 29, no. 2 (1992): 255-266.

- Pegg, DE. "Principles of Cryopreservation." In *Cryopreservation and Freeze-Drying Protocols*, 39-57: Springer, 2007.
- Pegg, DE. "The History and Principles of Cryopreservation." In *Seminars in reproductive medicine*, 5-13, 2002.
- Peng, CYS, CM Yin and LRS Yin. "Ultrastructure of Honey Bee, *Apis Mellifera*, Sperm with Special Emphasis on the Acrosomal Complex Following High-Pressure Freezing Fixation." *Physiological entomology* 18, no. 1 (1993): 93-101.
- Pereira, CS and PH Hünenberger. "Interaction of the Sugars Trehalose, Maltose and Glucose with a Phospholipid Bilayer: A Comparative Molecular Dynamics Study." *The Journal of Physical Chemistry B* 110, no. 31 (2006): 15572-15581.
- Pereira, CS, RD Lins, I Chandrasekhar, LCG Freitas and PH Hünenberger. "Interaction of the Disaccharide Trehalose with a Phospholipid Bilayer: A Molecular Dynamics Study." *Biophysical journal* 86, no. 4 (2004): 2273-2285.
- Peris, SI, JF Bilodeau, M Dufour and JL Bailey. "Impact of Cryopreservation and Reactive Oxygen Species on DNA Integrity, Lipid Peroxidation, and Functional Parameters in Ram Sperm." *Molecular reproduction and development* 74, no. 7 (2007): 878-892.
- Peters, K, H Schmidt, RE Unger, M Otto, G Kamp and CJ Kirkpatrick. "Software-Supported Image Quantification of Angiogenesis in an *in Vitro* Culture System: Application to Studies of Biocompatibility." *Biomaterials* 23, no. 16 (2002): 3413-3419.
- Petersen, A, H Schneider, G Rau and B Glasmacher. "A New Approach for Freezing of Aqueous Solutions under Active Control of the Nucleation Temperature." *Cryobiology* 53, no. 2 (2006): 248-257.
- Petrunkewitsch, A. "Die Richtungkörper Und Ihr Schicksal Im Befruchteten Und Unbefruchteten Bienenei." *Zool Jahrb Abt Anat Ontog Tiere* 14, (1901): 573-608.
- Petrunkina, AM. "Fundamental Aspects of Gamete Cryobiology." *Journal für Reproduktionsmedizin und Endokrinologie-Journal of Reproductive Medicine and Endocrinology* 4, no. 2 (2007): 78-91.
- Pettis, JS, J Johnson and G Dively. "Pesticide Exposure in Honey Bees Results in Increased Levels of the Gut Pathogen Nosema." *Naturwissenschaften* 99, no. 2 (2012): 153-158.
- Phillips, DM. "Insect Sperm: Their Structure and Morphogenesis." *The Journal of Cell Biology* 44, no. 2 (1970): 243.

- Pinho, RO, DMA Lima, HH Shiomi, JB Siqueira, HT Silva, PS Lopes, SEF Guimarães and JD Guimarães. "Effect of Different Cryo-Protectants on the Viability of Frozen/Thawed Semen from Boars of the Piau Breed." *Animal reproduction science* 146, no. 3 (2014): 187-192.
- Polge, C, AU Smith and AS Parkes. "Revival of Spermatozoa after Vitrification and Dehydration at Low Temperatures." *Nature* 164, no. 4172 (1949): 666.
- Potts, SG, JC Biesmeijer, C Kremen, P Neumann, O Schweiger and WE Kunin. "Global Pollinator Declines: Trends, Impacts and Drivers." *Trends in ecology & evolution* 25, no. 6 (2010): 345-353. a)
- Potts, SG, SPM Roberts, R Dean, G Marris, MA Brown, R Jones, P Neumann and J Settele. "Declines of Managed Honey Bees and Beekeepers in Europe." *Journal of Apicultural Research* 49, no. 1 (2010): 15-22. b)
- Purdy, PH. "A Review on Goat Sperm Cryopreservation." *Small Ruminant Research* 63, no. 3 (2006): 215-225.
- Quinn, PJ. "A Lipid-Phase Separation Model of Low-Temperature Damage to Biological Membranes." *Cryobiology* 22, no. 2 (1985): 128-146.
- Rall, WF and GM Fahy. "Ice-Free Cryopreservation of Mouse Embryos at- 196 C by Vitrification." (1985).
- Ramos, L and AMM Wetzels. "Low Rates of DNA Fragmentation in Selected Motile Human Spermatozoa Assessed by the Tunel Assay." *Human Reproduction* 16, no. 8 (2001): 1703-1707.
- Rao, HV and NT Davis. "Sperm Activation and Migration in Bed Bugs." *Journal of insect physiology* 15, no. 10 (1969): 1815-1832.
- Robinson, GE. "Regulation of Division of Labor in Insect Societies." *Annual review of entomology* 37, no. 1 (1992): 637-665.
- Robinson, GE and ZY Huang. "Colony Integration in Honey Bees: Genetic, Endocrine and Social Control of Division of Labor." *Apidologie* 29, no. 1-2 (1998): 159-170.
- Rodriguez-Martinez, H and M Wallgren. "Advances in Boar Semen Cryopreservation." *Veterinary medicine international* 2011, (2010).

- Rortais, A, G Arnold, MP Halm and F Touffet-Briens. "Modes of Honeybees Exposure to Systemic Insecticides: Estimated Amounts of Contaminated Pollen and Nectar Consumed by Different Categories of Bees." *Apidologie* 36, no. 1 (2005): 71-83.
- Rosenkranz, P, P Aumeier and B Ziegelmann. "Biology and Control of Varroa Destructor." *Journal of invertebrate pathology* 103, (2010): S96-S119.
- Rothschild, L. "The Spermatozoa of the Honey-Bee." *Transactions of the Royal Entomological Society of London* 107, no. 1-14 (1955): 289-294.
- Rowley, SD. "Hematopoietic Stem Cell Cryopreservation: A Review of Current Techniques." *Journal of hematotherapy* 1, no. 3 (1992): 233-250.
- Rudolph, AS and JH Crowe. "Membrane Stabilization During Freezing: The Role of Two Natural Cryoprotectants, Trehalose and Proline." *Cryobiology* 22, no. 4 (1985): 367-377.
- Ruknudin, A and VV Raghavan. "Initiation, Maintenance and Energy Metabolism of Sperm Motility in the Bed Bug, Cimex Hemipterus." *Journal of insect physiology* 34, no. 2 (1988): 137-142.
- Ruttner, F and VV Tryasko. "Anatomy and Physiology of Reproduction." *The instrumental insemination of the queen bee, Apimondia, Bucharest*, (1976): 11-24.
- Ruttner, F. "Zur Frage Der Spermaübertragung Bei Der Bienenkönigin." *Insectes sociaux* 3, no. 2 (1956): 351-359.
- Ruttner, F and G Koeniger. "Die Füllung Der Spermatheka Der Bienenkönigin." *Zeitschrift für vergleichende Physiologie* 72, no. 4 (1971): 411-422.
- Rzymiski, P, A Langowska, M Fliszkiewicz, B Poniedziałek, J Karczewski and K Wiktorowicz. "Flow Cytometry as an Estimation Tool for Honey Bee Sperm Viability." *Theriogenology* 77, no. 8 (2012): 1642-1647.
- Sanderson, AR and DW Hall. "The Cytology of the Honey Bee, Apis Mellifica L." *Nature* 162, no. 4105 (1948): 34-34.
- Santos, NC, J Figueira-Coelho, J Martins-Silva and C Saldanha. "Multidisciplinary Utilization of Dimethyl Sulfoxide: Pharmacological, Cellular, and Molecular Aspects." *Biochemical pharmacology* 65, no. 7 (2003): 1035-1041.
- Scheinkönig, C. "Untersuchungen Zur Kryokonservierung Hämatopoetischer Stammzellen Aus Menschlichem Knochenmark Mit Trehalose." Imu, 2005.

- Schleuning, WD and H Fritz. "[27] Sperm Acrosin." *Methods in enzymology* 45, (1976): 330-342.
- Scott, KL, J Lecak and JP Acker. "Biopreservation of Red Blood Cells: Past, Present, and Future." *Transfusion medicine reviews* 19, no. 2 (2005): 127-142.
- Seeley, TD. "Honey Bee Colonies Are Group-Level Adaptive Units." *The American Naturalist* 150, no. S1 (1997): s22-S41.
- Senel, B. "Immunfluoreszenz-mikroskopische Untersuchungen der Plasmamembran von Eberspermien während Flüssigkonservierung." Bachelorarbeit durchgeführt bei AMP-Lab GmbH, vorgelegt Feb. 2015
- Sharma, V. "Sperm Storage for Cancer Patients in the UK: A Review of Current Practice." *Human reproduction* 26, no. 11 (2011): 2935-2943.
- Shaw, JM and GM Jones. "Terminology Associated with Vitrification and Other Cryopreservation Procedures for Oocytes and Embryos." *Human Reproduction Update* 9, no. 6 (2003): 583-605.
- Shen, HM and CN Ong. "Detection of Oxidative DNA Damage in Human Sperm and Its Association with Sperm Function and Male Infertility." *Free Radical Biology and Medicine* 28, no. 4 (2000): 529-536.
- Smith, AU. "Biological Effects of Freezing and Supercooling. With Foreword by as Parkes." *Monographs. Physiological Society*, no. 9 (1961).
- Sommerfeld, V and H Niemann. "Cryopreservation of Bovine in Vitro produced Embryos Using Ethylene Glycol in Controlled Freezing or Vitrification." *Cryobiology* 38, no. 2 (1999): 95-105.
- Steffan-Dewenter, I, SG Potts and L Packer. "Pollinator Diversity and Crop Pollination Services Are at Risk." *Trends in ecology & evolution* 20, no. 12 (2005): 651-652.
- Steponkus, PL and SC Wiest. "Freeze-Thaw Induced Lesions in the Plasma Membrane." In *Low Temperature Stress in Crop Plants: The Role of the Membrane*, 231-254: Academic Press New York, 1979.
- Sukardi, S, MR Curry and PF Watson. "Simultaneous Detection of the Acrosomal Status and Viability of Incubated Ram Spermatozoa Using Fluorescent Markers." *Animal reproduction science* 46, no. 1 (1997): 89-96.
- Sun, H, B Glasmacher and N Hofmann. "Compatible Solutes Improve Cryopreservation of Human Endothelial Cells." *CryoLetters* 33, no. 6 (2012): 485-493.

- Sutkeviciene, N, V Riskeviciene, A Januskauskas, H Zilinskas and M Andersson. "Assessment of Sperm Quality Traits in Relation to Fertility in Boar Semen." *Acta Veterinaria Scandinavica* 51, no. 1 (2009): 53.
- Sztejn, JM, K Noble, JS Farley and LE Mobraaten. "Comparison of Permeating and Nonpermeating Cryoprotectants for Mouse Sperm Cryopreservation." *Cryobiology* 42, no. 1 (2001): 28-39.
- Tarelho, Z. "Effects of Low and High Temperatures on the Spermatogenesis of *Apis Mellifera* L." *Revista Brasileira de Genetica* 4, (1981): 193-212.
- Tatone, C, G Di Emidio, M Vento, R Ciriminna and P Giovanni Artini. "Cryopreservation and Oxidative Stress in Reproductive Cells." *Gynecological endocrinology* 26, no. 8 (2010): 563-567.
- Tautz, J and HR Heilmann. *Phänomen Honigbiene*: Elsevier, 2007.
- Taylor, MA, E Guzmán-Novoa, N Morfin and MM Buhr. "Improving Viability of Cryopreserved Honey Bee (*Apis Mellifera* L.) Sperm with Selected Diluents, Cryoprotectants, and Semen Dilution Ratios." *Theriogenology* 72, no. 2 (2009): 149-159.
- Tejada, RI, J Cameron Mitchell, A Norman, JJ Marik and S Friedman. "A Test for the Practical Evaluation of Male Fertility by Acridine Orange (Ao) Fluorescence." *Fertility and sterility* 42, no. 1 (1984): 87-91.
- Thompson, CE, JC Biesmeijer, TR Allnutt, S Pietravalle and GE Budge. "Parasite Pressures on Feral Honey Bees (*Apis Mellifera* Sp.)." *PloS one* 9, no. 8 (2014): e105164.
- Thomson, LK, SD Fleming, RJ Aitken, GN De Iuliis, J-A Zieschang and AM Clark. "Cryopreservation-Induced Human Sperm DNA Damage Is Predominantly Mediated by Oxidative Stress Rather Than Apoptosis." *Human Reproduction* 24, no. 9 (2009): 2061-2070.
- Travis, AJ, JA Foster, NA Rosenbaum, PE Visconti, GL Gerton, GS Kopf and SB Moss. "Targeting of a Germ Cell-Specific Type 1 Hexokinase Lacking a Porin-Binding Domain to the Mitochondria as Well as to the Head and Fibrous Sheath of Murine Spermatozoa." *Molecular biology of the cell* 9, no. 2 (1998): 263-276.
- Tselutin, K, F Seigneurin and E Blesbois. "Comparison of Cryoprotectants and Methods of Cryopreservation of Fowl Spermatozoa." *Poultry Science* 78, no. 4 (1999): 586-590.

- Tulsiani, Daulat RP, Aida Abou-Haila, Christoph R Loeser and Ben MJ Pereira. "The Biological and Functional Significance of the Sperm Acrosome and Acrosomal Enzymes in Mammalian Fertilization." *Experimental cell research* 240, no. 2 (1998): 151-164.
- Van der Zee, R, L Pisa, S Andonov, R Brodschneider, JD Charriere, R Chlebo, MF Coffey, B Dahle, A Gajda and A Gray. "Managed Honey Bee Colony Losses in Canada, China, Europe, Israel and Turkey, for the Winters of 2008-9 and 1009-10." *Journal of Apicultural Research and Bee World* 51, no. 1 (2012): 100-114.
- van Dooremalen, C, L Gerritsen, B Cornelissen, JJM van der Steen, F van Langevelde and T Blacquièrre. "Winter Survival of Individual Honey Bees and Honey Bee Colonies Depends on Level of Varroa Destructor Infestation." *PLoS one* 7, no. 4 (2012): e36285.
- Vanbergen, AJ, M Baude, JC Biesmeijer, NF Britton, MJF Brown, M Brown, J Bryden, GE Budge, JC Bull and C Carvell. "Threats to an Ecosystem Service: Pressures on Pollinators." *Frontiers in Ecology and the Environment* 11, (2013): 251-259.
- Vázquez, JM, E Martínez, LM Pastor, J Roca, C Matas and A Calvo. "Lectin Histochemistry During *in Vitro* Capacitation and Acrosome Reaction in Boar Spermatozoa: New Lectins for Evaluating Acrosomal Status of Boar Spermatozoa." *Acta histochemica* 98, no. 1 (1996): 93-100.
- Verma, LR. "Biology of Honeybee (*Apis Mellifera* L.) Spermatozoa. 1. Effect of Different Diluents on Motility and Survival."
- Vicente, JS and F Garcia-Ximenez. "Osmotic and Cryoprotective Effects of a Mixture of DmsO and Ethylene Glycol on Rabbit Morulae." *Theriogenology* 42, no. 7 (1994): 1205-1215.
- Vidau, C, M Diogon, J Aufauvre, R Fontbonne, B Viguès, JL Brunet, C Texier, DG Biron, N Blot and H El Alaoui. "Exposure to Sublethal Doses of Fipronil and Thiacloprid Highly Increases Mortality of Honeybees Previously Infected by *Nosema Ceranae*." *PLoS one* 6, no. 6 (2011): e21550.
- Virant-Klun, I, T Tomazevic and H Meden-Vrtovec. "Sperm Single-Stranded DNA, Detected by Acridine Orange Staining, Reduces Fertilization and Quality of Icsi-Derived Embryos." *Journal of assisted reproduction and genetics* 19, no. 7 (2002): 319-328.
- Voelkel, SA and YX Hu. "Direct Transfer of Frozen-Thawed Bovine Embryos." *Theriogenology* 37, no. 1 (1992): 23-37.
- Ware, CB, AM Nelson and CA Blau. "Controlled-Rate Freezing of Human Es Cells." *Biotechniques* 38, no. 6 (2005): 879.

- Wegener, J and K Bienefeld. "Toxicity of Cryoprotectants to Honey Bee Semen and Queens." *Theriogenology* 77, no. 3 (2012): 600-607.
- Wegener, J, T May, G Kamp and K Bienefeld. "A Successful New Approach to Honeybee Semen Cryopreservation." *Cryobiology* 69, no. 2 (2014): 236-242.
- Wegener, J, T May, U Knollmann, G Kamp, K Müller and K Bienefeld. "In Vivo Validation of in Vitro Quality Tests for Cryopreserved Honey Bee Semen." *Cryobiology* 65, no. 2 (2012): 126-131.
- Weng, SL, SL Taylor, M Morshedi, A Schuffner, EH Duran, S Beebe and S Oehninger. "Caspase Activity and Apoptotic Markers in Ejaculated Human Sperm." *Molecular human reproduction* 8, no. 11 (2002): 984-991.
- Werner, M, D Zissler and K Peschke. "Structure and Energy Pathways of Spermatozoa of the Rove Beetle Aleochara Bilineata (Coleoptera, Staphylinidae)." *Tissue and Cell* 31, no. 4 (1999): 413-420.
- Werner, M and LW Simmons. "Insect Sperm Motility." *Biological Reviews* 83, no. 2 (2008): 191-208.
- White, IG. "Lipids and Calcium Uptake of Sperm in Relation to Cold Shock and Preservation: A Review." *Reproduction, Fertility and Development* 5, no. 6 (1993): 639-658.
- Widiasih, D, CH Yeung, A Junaidi and TG Cooper. "Multistep and Single-Step Treatment of Human Spermatozoa with Cryoprotectants." *Fertility and sterility* 92, no. 1 (2009): 382-389.
- Wildt, DE. "Genome Resource Banking for Wildlife Research, Management, and Conservation." *ILAR Journal* 41, no. 4 (2000): 228-234.
- Wildt, DE, WF Rall, JK Critser, SL Monfort and US Seal. "Genome Resource Banks." *Bioscience*, (1997): 689-698.
- Woelders, H, A Matthijs and B Engel. "Effects of Trehalose and Sucrose, Osmolality of the Freezing Medium, and Cooling Rate on Viability and Intactness of Bull Sperm after Freezing and Thawing." *Cryobiology* 35, no. 2 (1997): 93-105.
- Wolf, BE. "Eine Nachuntersuchung Zur Cytologie Der Honigbiene." *Zool. Beitr* 5, (1960): 373-391.
- Wolfe, J and G Bryant. "Freezing, Drying, and/or Vitrification of Membrane-Solute-Water Systems." *Cryobiology* 39, no. 2 (1999): 103-129.

- Wolfe, J and G Bryant. "Cellular Cryobiology: Thermodynamic and Mechanical Effects." *International Journal of Refrigeration* 24, no. 5 (2001): 438-450.
- Wolkers, WF, F Tablin and JH Crowe. "From Anhydrobiosis to Freeze-Drying of Eukaryotic Cells." *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology* 131, no. 3 (2002): 535-543.
- Woods, EJ, JD Benson, Y Agca and JK Critser. "Fundamental Cryobiology of Reproductive Cells and Tissues." *Cryobiology* 48, no. 2 (2004): 146-156.
- Woyke, J and W Skowronek. "Spermatogenesis in Diploid Drones of the Honey Bee." *Journal of Apicultural research* 13, no. 3 (1974): 183-190.
- Wright, GA. "Bee Pheromones: Signal or Agent of Manipulation?" *Current Biology* 19, no. 14 (2009): R547-R548.
- Wright, WD. *The Honey Bee*. Vol. 49: Department of agriculture Bulletin, 1913.
- Wusteman, MC, J Simmonds, D Vaughan and DE Pegg. "Vitrification of Rabbit Tissues with Propylene Glycol and Trehalose." *Cryobiology* 56, no. 1 (2008): 62-71.
- Yang, X and D Cox-Foster. "Effects of Parasitization by Varroa Destructor on Survivorship and Physiological Traits of Apis Mellifera in Correlation with Viral Incidence and Microbial Challenge." *Parasitology* 134, no. 03 (2007): 405-412.
- Yu, ZW and PJ Quinn. "The Modulation of Membrane Structure and Stability by Dimethyl Sulphoxide (Review)." *Molecular membrane biology* 15, no. 2 (1998): 59-68.
- Zee, YP, WV Holt, J Gosalvez, CD Allen, V Nicolson, M Pyne, M Burridge, FN Carrick and SD Johnston. "Dimethylacetamide Can Be Used as an Alternative to Glycerol for the Successful Cryopreservation of Koala (Phascolarctos Cinereus) Spermatozoa." *Reproduction, Fertility and Development* 20, no. 6 (2008): 724-733.
- Zeron, Y, M Tomczak, J Crowe and A Arav. "The Effect of Liposomes on Thermotropic Membrane Phase Transitions of Bovine Spermatozoa and Oocytes: Implications for Reducing Chilling Sensitivity." *Cryobiology* 45, no. 2 (2002): 143-152.
- Zhang, LH, Y Qiu, KH Wang, Q Wang, G Tao and LG Wang. "Measurement of Sperm DNA Fragmentation Using Bright-Field Microscopy: Comparison between Sperm Chromatin Dispersion Test and Terminal Uridine Nick-End Labeling Assay." *Fertility and sterility* 94, no. 3 (2010): 1027-1032.

Zribi, N, NF Chakroun, H El Euch, J Gargouri, A Bahloul and LA Keskes. "Effects of Cryopreservation on Human Sperm Deoxyribonucleic Acid Integrity." *Fertility and sterility* 93, no. 1 (2010): 159-166.

Links:

http://www.planet-wissen.de/natur_technik/insekten_und_spinnentiere/bienen/bienensterben.jsp

<http://www.br.de/themen/wissen/bienen-bienensterben-varroamilbe100.html>

<https://www2.hu-berlin.de/bienenkunde/index.php?id=110>

<https://www2.hu-berlin.de/bienenkunde/index.php?id=111>

http://www.focus.de/wissen/natur/tiere-und-pflanzen/die-vier-groessten-gefahren-fuer-bienen-wie-das-bienensterben-uns-menschen-gefaehrdet_id_2540411.html

http://www.bund.net/themen_und_projekte/chemie/pestizide/gefahr_fuer_die_natur/tiere/bienen/

<http://www.sueddeutsche.de/wissen/geheimnisvolles-bienensterben-der-leise-tod-1.1072108>

http://de.wikipedia.org/wiki/Honigbienen#mediaviewer/File:Apis_distribution_map.svg

<http://www.bienenstockkaefer.de/fix/docs/files/Pechhacker%20Text%20Bienenhandel.doc>

<http://www.bienenschade.de/Honigbienen/Sprache/Sinnesorgane%20Bienen.htm>

www.bmel.de/SharedDocs/Downloads/Broschueren/Bienen.pdf?__blob=publicationFile

https://bienenkunde.uni-hohenheim.de/uploads/media/Skript_Biologie_Honigbiene.pdf

<http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/pub/154r.htm>

<https://mecklenburg-vorpommern.nabu.de/natur-und-landschaft/aktionen-und-projekte/18597.html>

<http://faostat3.fao.org/home/E>

<http://www.bienenschade.de/Bestaebung/bestaebungsleistung>

<http://www.imkerverein-reutlingen.de/index.php/bienen>

http://www.bmel.de/SharedDocs/Downloads/Tier/TierzuchtTierhaltung/Bienen_LeitlinieAmerikanischeFaulbrut.pdf?__blob=publicationFile

http://www.bmel.de/DE/Landwirtschaft/Pflanzenbau/Pflanzenschutz/pflanzenschutzmittel_node.html

http://www.bmel.de/DE/Tier/Nutztierhaltung/Bienen/_texte/BienenImkerei.html

https://www.fli.bund.de/fileadmin/dam_uploads/Publikationen/Methodensammlung_0905.pdf

<http://www.step-project.net/>

http://ec.europa.eu/food/animals/live_animals/bees/docs/bee-report_2012_2014_en.pdf

http://www.gesetze-im-internet.de/cgi-bin/htsearch?config=Gesamt_bmjhome2005&method=and&words=bienenschutzverordnung&susuc=Suchen

<http://www.lifetechnologies.com/de/de/home/life-science/cell-analysis/labeling-chemistry/fluorescence-spectraviewer.html>

http://ec.europa.eu/food/animals/live_animals/bees/pesticides/index_en.htm

<http://www.bee-doc.eu/>

<http://www.coloss.org/>

<http://www.fabretp.org>

<http://cryo-brehm.de/index.php?task=Startseite>

www.uni-ulm.de/IT/Scripte/biotech_kompatible-solute.pdf

https://www.ipmc.cnrs.fr/fichiers/recherche/microscopie/Sondes/Hoechst_33342.pdf

<https://www.ipmc.cnrs.fr/fichiers/recherche/microscopie/Sondes/PI.pdf>

<http://www.chemnet.com>

<http://ezcatdb.cbrc.jp/EzCatDB/>

<http://www.ecmdb.ca/>

<http://www.scbt.com/datasheet-253302.html>

<http://www.ebi.ac.uk/chebi/searchId.do?chebiId=CHEBI:16810>

http://www.statistics4u.info/fundstat_germ/cc_corr_coeff.html

<http://de.academic.ru/dic.nsf/dewiki/28811>

Publikationen und Patente

May T, L Zografidou, N Scheiermann, H Schmidt, G Kamp. "Simultaneous evaluation of boar sperm number, motility and plasma membrane integrity using fluorescent microscopy." *Reproduction* – submitted

Wegener, J, T May, G Kamp and K Bienefeld. "A Successful New Approach to Honeybee Semen Cryopreservation." *Cryobiology* 69, no. 2, (2014): 236-242.

Wegener, J, T May, G Kamp, and K Bienefeld. "New Methods and Media for the Centrifugation of Honey Bee (Hymenoptera: Apidae) Drone Semen." *Journal of economic entomology*, 107(1), (2014) 47-53.

Wegener, J, T May, U Knollmann, G Kamp, K Müller and K Bienefeld. "In Vivo Validation of in Vitro Quality Tests for Cryopreserved Honey Bee Semen." *Cryobiology* 65, no. 2, (2012): 126-131.

Schmidt H, P Manthey, S Diez-Presedo, T May and G Kamp "Introducing a novel CASA System for semen analysis." *Reproduction in domestic animals* 46, Special Issue Supplement 2, (2011) 100.

Während des Projektes wurden zwei Patente angemeldet.

Erstens zum Verfahren der Kryokonservierung von Insekten-Sperma (Patentnr.: DE 102012021900 A1).

Und zweitens über ein Verfahren und Vorrichtung zur Bestimmung der Fertilität von Spermien (DE 102010010526 A1). Das dabei neu entwickelte Programm CASAnova® ist nicht auf die Motilitätsmessung von Bienenspermien beschränkt, sondern kann universal für Spermien unterschiedlicher Spezies angewendet werden

Danksagung

Herrn Prof. Dr. [REDACTED] möchte ich für das äußerst interessante Projektthema, das in mich gelegte Vertrauen und die stets kompetente und freundliche Betreuung danken.

Bei Herrn Prof. Dr. [REDACTED], Herrn Prof. Dr. [REDACTED] und Herrn Prof. Dr. [REDACTED] bedanke ich mich für das große Interesse an meiner Arbeit und die sympathische Unterstützung.

Ein großer Dank gilt dem BMELV und dem BMEL, ohne deren finanzielle Unterstützung dieses wichtige Projekt in dieser Form nicht möglich gewesen wäre.

Für eine produktive und freundschaftliche Zusammenarbeit bedanke ich mich sehr herzlich beim LIB Hohen Neuendorf, besonders bei Herrn Dr. [REDACTED].

Beim Fraunhofer-Institut für Biomedizinische Technik (IBMT), insbesondere bei Frau Dr. [REDACTED] bedanke ich mich für die fachkundige Auskunft, hilfreiche Anregungen und faszinierende Einblicke in die Kryotechnik.

Danken möchte ich auch Frau [REDACTED], Herrn Dr. [REDACTED] und besonders Herrn Dipl. Biol. [REDACTED] für das gute Arbeitsklima, die zahlreichen interessanten Diskussionen und die große Hilfsbereitschaft.

Besonders großer Dank geht an meine Eltern, die immer an mich glauben, mich in meinem Tun bestärken und nie im Stich lassen. Ihr seid einfach klasse!

Meinem Ehemann [REDACTED], den ich über alles liebe, danke ich für die Unterstützung, den Halt, den er mir gibt und das große Glück, dass ich durch ihn erfahren darf. Du bist wirklich ein ganz besonderer Mensch.

Ich danke auch meinen lieben Geschwistern, die stets hinter mir und mit Rat und Tat beiseite stehen. Auf Euch kann ich mich immer verlassen!

Den vielen lieben Menschen, die ich „Freunde“ nennen darf, insbesondere Frau [REDACTED], danke ich für weise Ratschläge, eine große Hilfsbereitschaft und ein immer offenes Ohr.

Curriculum Vitae

Aus Datenschutzgründen gelöscht.