

Etablierung eines Kokultursystems von bovinen Präimplantationsembryonen mit Eileiterepithelzellen vom Rind sowie dessen Einfluß auf Entwicklung, Metabolismus und Genexpression der Embryonen

S. Rief, M. Stojkovic, R. Einspanier¹, E. Wolf und K. Prella
Lehrstuhl für Molekulare Tierzucht und Biotechnologie, LMU München, 85764
Oberschleissheim; ¹Institut für Physiologie, TU München-Weihenstephan, 85350 Freising

Der Eileiter stellt für Transport und endgültige Reifung der Gameten sowie für Fertilisation und frühembryonale Entwicklung *in vivo* die erforderlichen Bedingungen bereit und ist somit Ort zentraler Reproduktionsgeschehnisse. Dabei führen die komplexen Interaktionen zwischen Gameten bzw. die Kommunikation zwischen Embryo und Muttertier, die hauptsächlich auf der Sekretion von Proteinen beruhen, zur physiologischen Entwicklung des Embryos. Nachdem festgestellt wurde, daß bovine Embryonen *in vitro* während des 8- bis 16-Zellstadiums einem Entwicklungsblock unterliegen, wurden Möglichkeiten zu dessen Überwindung gesucht, indem den Embryonen auch während der *in vitro*-Kultur möglichst physiologische Bedingungen geboten werden. Dafür wurden in verschiedenen Labors Eileiterepithelzellkulturen etabliert, mit deren Hilfe eine Kultur bis zum Blastozystenstadium möglich ist. Dieses *in vitro*-System, welches die embryonale Entwicklung durch Simulation der *in vivo*-Bedingungen unterstützt, erlaubt ferner eine nähere Untersuchung der Interaktion zwischen Embryo und maternaler Umgebung.

In den eigenen Untersuchungen wurde ein Kokultursystem entwickelt, welches die *in vivo*-Verhältnisse so gut wie möglich reproduziert und dabei den Ansprüchen beider Komponenten, Epithelzellen wie Embryonen, gerecht wird. Dabei wurde besonders darauf geachtet die physiologischen Eigenschaften der bovinen Eileiterepithelzellen (BOEC) zu erhalten und eine Dedifferenzierung zu verhindern, um so durch Produktion embryotropher Faktoren die Entwicklung der Embryonen positiv beeinflussen zu können.

Im Rahmen zweier Vorversuche wurde der Einfluß verschiedener Medienzusammensetzungen, kombiniert mit unterschiedlichen Seren in absteigenden Konzentrationen, auf den Epithelzellmonolayer verglichen. Bei Beurteilung morphologischer Kriterien stellte sich SOF + OCS als überlegene Kombination heraus, welche die epithelzelltypischen Charakteristika weitestgehend konservierte. Morphologische Unterschiede bei den verschiedenen Seren wurde beim Gebrauch von DCC-FKS besonders deutlich, welches eine Dedifferenzierung der BOEC effektiver zu verhindern und die Ziliogenese zu fördern schien. Ergänzend zeigten molekularbiologische Untersuchungen zur Genexpression des eileiterspezifischen Gens GP 85-97 deutliche Einflüsse des Basismediums (TCM und SOF) und Serumgehaltes (2, 5, 10% FKS und OCS) auf den Differenzierungsgrad der Oviduktepithelzellen. Während bei den verschiedenen OCS-Konzentrationen kein signifikanter Unterschied auftrat, verhielt sich der GP 85-97-Expressionslevel umgekehrt proportional zur eingesetzten FKS-Konzentration. Die Expressionsstudien mit Hilfe der RT-Real time-PCR machten ferner eine signifikante Überlegenheit des Basismediums SOF deutlich.

In den eigentlichen Kokulturversuchen zeigte sich eine erhöhte Teilungsrate der auf BOEC kultivierten IVP-Embryonen an Tag 3 gegenüber den im zellfreien Standardkultursystem kultivierten. Dieser positive Effekt der BOEC bei Kurzzeit-Kokultur setzte sich allerdings nicht bis ins Blastozystenstadium fort. Bei Untersuchungen des Energiehaushaltes der 2 Tage

kokultivierten Embryonen an Tag 8 wurde im Vergleich zur Kontrolle ein niedrigerer ATP Gehalt festgestellt.

Eine 8-tägige Kokultur von Embryonen mit Semi-Mediumwechsel führte unabhängig von Serumart und -konzentration zu einer niedrigeren Blastozystenrate. Die Schlupfrate wurde ferner durch den Gebrauch von DCC-FKS deutlich eingeschränkt. Die genauere Beurteilung der Embryonenqualität mittels RT-Real time-PCR zeigte durch eine erhöhte Glut-1-Expression bei Verwendung von SOF + 5% OCS und SOF + 10% DCC-FKS eine Überlegenheit der kokultivierten Blastozysten. Die HSP-Expression war bei der Kokultur in SOF + 5% OCS im Vergleich zum Kontrollsystem deutlich erhöht, was zum einen auf eine Stresssituation des Embryos im System hinweisen kann, aber auch durch erhöhte de novo-Proteinsynthese ausgelöst werden kann, welche bei der physiologischen Embryonalentwicklung regulär stattfindet. Die im Gegensatz dazu weniger deutlichen Genexpressionsunterschiede zwischen Blastozysten aus Kokultur und Kontrolle bei Verwendung von 10% OCS wiesen außerdem auf einen Einfluß der Serumkonzentration auf die embryotrophe Wirkung der BOEC hin.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, daß eine Kultur von Embryonen mit BOEC zwar eine gewisse Annäherung an die Verhältnisse in vivo darstellt, ein solches System jedoch sehr detailliert auf die Bedürfnisse der somatischen wie der embryonalen Komponenten zugeschnitten werden muß. Die Erkenntnisse aus den Untersuchungen deuten darauf hin, daß eine Basis für ein Modell geschaffen wurde, welches nach weiterer Optimierung für Studien der embryo-maternalen Kommunikation genutzt werden kann.