

# Einsatz von fetalen und adulten Fibroblasten im Kerntransfer beim Rind -Vergleichende Untersuchungen-

A. Lucas-Hahn, E. Lemme, L. Schindler, K.G. Hadeler, C. Wrenzycki,  
D. Herrmann und H. Niemann

Institut für Tierzucht und Tierverhalten (FAL) Mariensee  
Forschungsbereich Biotechnologie, D - 31535 Neustadt

Im Kerntransfer beim Rind werden mittlerweile die unterschiedlichsten Zelltypen als Spenderzellen erfolgreich eingesetzt. Das erste in Mariensee geklonte Kalb, geboren im März 2000, war aus der Fusion eines fetalen Fibroblasten mit einer enukleierten Oozyte hervorgegangen. Ziel der vorliegenden Arbeit war, adulte und fetale Fibroblasten hinsichtlich ihrer Effizienz im Kerntransfer zu untersuchen.

Fetale und adulte Fibroblasten wurden von einem 61 Tage alten Fetus bzw. aus Biopsien des Ohrunterhautgewebes eines weiblichen erwachsenen Rindes gewonnen. Nach Trypsinisierung bzw. Zerkleinerung des Gewebes wurden die Zellen in DMEM + 10% FCS kultiviert und mehrfach passagiert. Fibroblastenkulturen ab Passagengnummer 3 wurden durch 3-7 tägigem Serumentzug (0,5% FCS) synchronisiert. Die Fibroblasten wurden in enukleierte Oozyten eingebracht und fusioniert. Anschließend erfolgte die Aktivierung und 7-tägige in vitro-Kultur in SOF+BSA. Morulae, Blastozysten und expandierte Blastozysten wurden entweder auf Empfängertiere übertragen oder für molekularbiologische Analysen tiefgefroren.

Es konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen geklonten Embryonen aus adulten bzw. fetalen Fibroblasten hinsichtlich ihrer in vitro Entwicklungskompetenz gefunden werden. Die durchschnittlichen Teilungs- bzw. Blastozystenraten waren für fetale Fibroblasten 70% bzw. 23,5 %, für adulte Fibroblasten 76,3% bzw. 26,2%. Aus Transfers von insgesamt 18 Blastozysten, die von fetalen Zellen stammten, auf 13 Empfängertiere, wurden 4 Trächtigkeiten (30,8%) etabliert, die nach Kaiserschnitt zu lebenden Kälbern führten. Das durchschnittliche Geburtsgewicht lag bei 68,4 kg. Ein Kalb verstarb nach einem Tag infolge einer schweren Fehlbildung des Herzens. In der Gruppe der adulten Fibroblasten wurden 16 Embryonen auf 16 Empfängertiere übertragen, woraus 7 Trächtigkeiten (43,7%) resultierten. 2 Feten wurden im ersten Drittel der Trächtigkeit abortiert. Ein Kalb wurde durch Eihautwassersucht im 7. Trächtigkeitsmonat verloren. Bisher ist ein geklontes Kalb aus adulten Fibroblasten geboren. Es wog 43 kg und erscheint völlig normal. Weitere 3 Kühe stehen im Sommer/Herbst zur Kalbung an.

Parallel zu den Transferversuchen wurden molekularbiologische Analysen der Genexpression bei den Blastozysten fetalen und adulten Ursprungs durchgeführt. Hier wurden beispielsweise für das Xist (X- Chromosominaktivierungstranskript) signifikant höhere Werte bei den adulten im Vergleich zu den fetalen geklonten Embryonen gefunden.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass gute In-vitro Kultur Ergebnisse noch keine ausreichend sichere Hinweise für lebensfähige geklonte Kälber geben. Für eine Erklärung des Phänomens wie das Large Offspring Syndrom mit dem relativ hohen Anteil an Missbildungen bei geklonten Nachkommen sind weitere vergleichende Untersuchungen des Expressionsmusters entwicklungsrelevanter Gene bei den Embryonen und / oder der verwendeten Spenderzellen nötig.