

Einfluß verschiedener Kerntransferprotokolle auf das mRNA-Expressionsmuster in geklonten Rinderblastozysten ^a

C. Wrenzycki¹, D. Wells², D. Herrmann¹, K. Korsawe¹, K.-G. Haderer¹, A. Miller², J. Oliver², R. Tervit² und H. Niemann¹

¹Forschungsbereich Biotechnologie, Institut für Tierzucht und Tierverhalten (FAL),
31535 Neustadt, Germany

²AgResearch, Ruakura Research Centre, Hamilton, New Zealand

^aGefördert durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG Ni 256/12-2)

Die erfolgreiche Produktion geklonter Rinderembryonen unter der Verwendung somatischer Zellen ist von einer Vielzahl an Faktoren, wie z.B. dem Zeitpunkt der Aktivierung, der Herkunft, dem Zellzyklusstadium und der Passagenzahl der Spenderzellen, abhängig. Trotz der enormen Fortschritte, die in den letzten Jahren erzielt wurden, sind die Entwicklungsraten nach Kerntransfer nicht zufriedenstellend. Eine ungestörte Embryonalentwicklung nach Kerntransfer ist nur dann gewährleistet, wenn der Kern der Spenderzelle korrekt reprogrammiert wird. Ziel unserer Untersuchungen war es, den Einfluß verschiedener Kerntransferprotokolle auf das mRNA-Expressionsmuster geklonter Rinderblastozysten im Vergleich zu in vivo und in vitro gewonnenen Embryonen zu ermitteln.

Die Embryonen wurden nach Standardprotokollen für den Kerntransfer und die In vitro-Produktion erzeugt (Wells et al., Biol. Reprod. 1999; 60:996-1005). Die Gewinnung in vivo generierter Blastozysten erfolgte nach Superovulation (Wrenzycki et al., J. Reprod. Fert. 1996; 108:17-24). Mittels eines semi-quantitativen RT-PCR-Assays (Wrenzycki et al., Mol. Reprod. Dev. 53:8-18) wurde der relative Gehalt folgender acht Gentranskripte in einzelnen Blastozysten bestimmt: DNA-Methyltransferase (DNMT), Mash2, Glukosetransporter-1 (Glut-1), Hitzeschockprotein 70.1 (Hsp), Desmocollin II (Dc II), E-cadherin (E-cad), Interferon τ (IF) und den Rezeptor des insulin-ähnlichen Wachstumsfaktors 2 (IGF2r). Die Experimente wurden mindestens achtmal mit verschiedenen Embryonen durchgeführt.

In Experiment 1 wurden zur Erstellung der geklonten Rinderblastozysten zwei unterschiedliche Aktivierungsprotokolle verwendet: Fusion vor der Aktivierung (FBA) oder Fusion und Aktivierung gleichzeitig (AFS). Im zweiten Experiment erfolgte die Produktion der geklonten Embryonen unter der Verwendung von Spenderzellen, die sich entweder in der G₀- oder G₁-Phase des Zellzyklus befunden haben; während in Experiment 3 Spenderzellen im Kerntransfer verwendet wurden, die aus unterschiedlichen Passagen stammten (Passage 5/6 vs. Passage 8). In Experiment 4 wurden Blastozysten aus den unterschiedlichen Systemen zur In vitro-Produktion verglichen.

Zusammenfassend konnten wir feststellen, daß in Abhängigkeit vom verwendeten Kerntransferprotokoll geklonte Rinderblastozysten ausgeprägte Unterschiede in ihrem mRNA-Expressionsmuster verglichen mit dem in vitro oder in vivo erzeugter Embryonen aufweisen. Signifikante Unterschiede wurden im relativen Gehalt von Gentranskripten gefunden, die während der frühen Embryonalentwicklung eine wichtige Rolle bei der DNA-Methylierung (DNMT), der Streßantwort (Hsp) und der Funktion des Trophoblasten (Mash2, IF) spielen.