

## **Handmade Cloning<sup>TM</sup>, ein Vergleich von klonierten Embryonen mit Embryonen aus IVP beim Rind: Erste Ergebnisse im FBN-Dummerstorf**

BHOJWANI S., PÖHLAND R., KANITZ W.

FBN, Forschungsbereich Fortpflanzungsbiologie, Dummerstorf, Germany

seit der Geburt des Schafes „Dolly“ hat die Methode des somatischen Kerntransfers (SKT) eine beeindruckende Entwicklung erfahren. Trotz der Vielzahl bisher erfolgreich klonierter Spezies und der generellen Fortschritte auf diesem Gebiet ist die Effizienz des Gesamtverfahrens nach wie vor sehr gering. Weniger als 1% der SKT-Embryonen führen zu lebenden Nachkommen. Gesundheitliche Probleme, wie z.B. zu hohe Geburtsgewichte (Large-Offspring-Syndrome), kongenitale Missbildungen und Störungen treten mit hoher Wahrscheinlichkeit auf. Auch das im FBN erzeugte Bullenkalb aus SKT zeigte ein zu hohes Geburtsgewicht (ca. 75 kg) und starb 52 Stunden nach der Geburt (Bhojwani et al. AETE Newsletter, 12: 9-13, 2003). Bisherige eigene Arbeiten zum Kerntransfer führten nur zu einer geringen Blastozystenrate (2%). Die Ursache dafür schien nicht in der Effizienz des Kerntransfers selbst (ca. 95% Erfolgsrate) und auch nicht in der Aktivierung der Embryonen (Teilungsrate ca. 70%) zu liegen. Dennoch zeigte sich mit fortschreitender Kultivierungsdauer ein Abfall des Anteils vitaler Embryonen. Dabei war der stärkste Verlust an Embryonen jenseits des 8-Zell-Stadiums zu verzeichnen. Während noch 50% der geteilten Embryonen das 8-Zell-Stadium erreichten, entwickelten sich nur 5% dieser Embryonen weiter. Dieser hohe Verlust nach dem 8-Zell-Stadium könnte zwei Ursachen haben. Ein Grund kann in der fehlerhaften Reprogrammierung des somatischen Zellkernes zu finden sein. Dies führt nach der Aktivierung des embryonalen Genoms mit dem Einsetzen von Differenzierungsprozessen in den Blastomeren zu Störungen und zum Absterben dieser. Eine zweite mögliche Ursache kann aber auch im SKT-Verfahren an sich begründet sein. Das Entfernen der Zona pellucida, das Schneiden der Oozyten, sowie die Elektrofusionen stellen einen nicht zu unterschätzenden Stress für die Zellen, insbesondere die Membranen und das Zytoskelett dar. Bereits Lichtmikroskopisch haben wir festgestellt, dass eine hoher Anteil der Embryonen aus SKT unregelmäßig große, mehr oder weniger geschädigte Blastomeren und Teilkeimstadien aufweist. Diese Beobachtungen führten uns zu der Annahme, dass Veränderungen im Zytoskelett der Blastomeren in Folge der Manipulationen beim Kerntransfer auftreten könnten.

Der SKT wurde mit der HMC-Methodik nach Vajta et al. (Biol. Reprod. 68: 105-113, 2003) bzw. Bhojwani et al. (AETE Newsletter, 12: 9-13, 2003) durchgeführt. Zu Vergleichszwecken wurden IVP-Embryonen nach der im Labor etablierten Standardmethode erzeugt. Die Zytoskelettfärbung erfolgte mittels Phalloidin (Aktin) bzw. Immunzytochemisch (Tubulin). Die Auswertung fand mittels Konfokaler-Laserscanning-Mikroskopie statt.

Insgesamt wurden 4027 SKT- und 1402 IVP-Embryonen erzeugen. In allen getesteten Embryonen konnten Tubulin und Aktin nachgewiesen werden. Dabei traten jedoch unterschiedliche Verteilungsmuster auf. Bei intakten Blastomeren (sowohl SKT- als auch IVP-Embryonen) wurde eine randständig Verteilung in den Blastomeren mit zonalen Ausbreitungen in das Zytoplasma beobachtet. Andere Blastomeren wiesen abweichende Verteilungen auf. So war z.B. die Färbung homogen im Zytoplasma verteilt oder fiel sehr schwach aus. Embryonen aus SKT wiesen dabei einen signifikant höheren Anteil Blastomeren mit abweichenden Verteilungsmustern auf.

Diese Untersuchungen zeigen eine deutliche Beeinflussung der Blastomeren im Ergebnis des Kerntransfers. Ob diese jedoch ursächlich zur geringeren Entwicklungskompetenz dieser Embryonen beitragen, kann erst mit weiteren Untersuchungen geklärt werden.