

Trennung von bovinen und porcinen Spermien in X- und Y-Chromosom-tragende Fraktionen auf Basis differentieller Oberflächenladungen?

Marc Boelhauve^{1,2}, Horst-Dieter Reichenbach³ und Eckhard Wolf^{1,2}

¹Lehrstuhl für Molekulare Tierzucht und Biotechnologie der Ludwig-Maximilians Universität, München

²Bayerisches Forschungszentrum für Fortpflanzungsbiologie (BFZF), Oberschleissheim

³Landesamt für Landwirtschaft (LfL), Grub

Durch die neuen Entwicklungen der Reproduktionsbiotechniken in der Tierzucht, wie der *In-vitro* Produktion von Embryonen, dem Embryotransfer, der *Ex-vivo* Gewinnung von Eizellen, dem Embryo-Sexing, dem Embryosplitting zur Erzeugung identischer Nachkommen und der Spermientrennung in männlich und weiblich determinierende Fraktionen stehen Techniken zur Verfügung, die die Selektionsintensität erhöhen und damit den Zuchtfortschritt beschleunigen können. Die *flow*-zytometrische Spermientrennung, basierend auf unterschiedlichen DNA-Gehalten zwischen X- und Y-Chromosom-tragenden Spermien, ist das bis heute einzig funktionierende Spermientrennverfahren. Einen breiten Einsatz in der tierzüchterischen Praxis findet diese Technik (und die anderen oben genannten) wegen der arbeits- und vor allem kostenintensiven Verfahrensanteile nicht. Die Festlegung des Geschlechts der Nachkommen vor der Befruchtung könnte bei ausreichender Trennschärfe und hoher Trennkapazität einen wichtigen Beitrag für die Tierzucht leisten und so Einzug in die tierzüchterische Praxis erlangen. In einer Vielzahl von wissenschaftlichen Arbeiten finden sich weitere Möglichkeiten zur Trennung von Spermien in männlich und weiblich determinierende Fraktionen, die aber in der Reproduzierbarkeit, in der Motilität der getrennten Spermien, in der Trennschärfe bzw. vor allem in der Trennleistung unbefriedigend sind.

Mit einer deutlichen technischen Verbesserung der sog. *Free-Flow* Elektrophorese (FFE), die Zellen auf Basis unterschiedlicher Oberflächenladungen trennen kann (Abb. 1), wurden die Möglichkeiten und Grenzen einer Spermientrennung in X- und Y-Chromosom-tragende Fraktionen von Bullen- und Eberspermien untersucht. Für die Eignung der FFE zur Trennung mussten u.a. mehrere Einflußfaktoren untersucht werden: Der Einfluß der Trenntemperatur, der Medienleitfähigkeit, der Spermienvorbehandlung, der Mediengeschwindigkeit, der Stromstärke, des pH-Wertes, usw. Für die Untersuchung dieser Einflussfaktoren wurde ein *Fluoreszenz-in-situ*

Hybridisierungsverfahren (FISH) etabliert, das eine schnelle und vor allem sichere Evaluierung der Trennungsergebnisse durch direkten Nachweis der Geschlechterverschiebung in den getrennten Spermienfraktionen ermöglichte. Bei mehr als 35 ungetrennten Bullen- und Eberejakulaten lag die Verteilung des Y-Chromosomen-Anteils zwischen 48,5 und 51,5%.

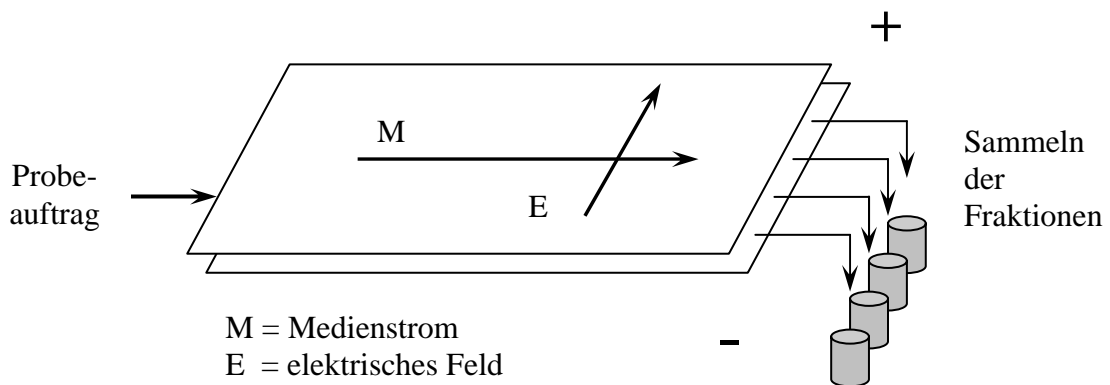


Abb. 1: Schema der *Free-Flow* Elektrophorese (FFE)

Es zeigte sich, dass die Trenntemperatur und die Medienkomposition einen entscheidenden Einfluss auf die Trennung aus übten. Spermien, deren Oberfläche durch ein spezielles Protokoll vom Seminalplasma gereinigt wurden, konnten reproduzierbar im elektrischen Feld abgelenkt werden und ermöglichten eine Geschlechterverschiebung bis zu 65% zugunsten der Y-Chromosom-tragenden Spermien. Ein weiterer wichtiger Aspekt der Untersuchungen war die Befruchtungsfähigkeit der Spermien, die den Trennvorgang durchschritten hatten, mit *In-vitro* produzierten Embryonen zu untersuchen und das Geschlecht der erzeugten Embryonen zu bestimmen. Hierbei zeigte sich, dass die FFE-getrennten Spermien mit nur geringer Einschränkung Eizellen befruchten konnten.

Zusammenfassend ist die FFE eine interessante Technik, die einen sehr hohen Durchsatz von lebenden und befruchtungsfähigen Spermien (bis zu 1 Milliarde pro Stunde) erlauben würde, aber durch die bis heute geringe Trennschärfe nicht für die Praxis geeignet ist.