

32. Jahrestagung der Arbeitsgemeinschaft Embryotransfer deutschsprachiger Länder  
(AET-d) am 30. Juni/1. Juli 2005 in Neumünster

## **Experimentelle Untersuchungen zur Verbesserung der Entwicklungsfähigkeit geklonter Schweineembryonen**

*D. Sage, P. Hassel, B. Petersen, W. Mysegades, P. Westermann,  
A. Lucas-Hahn und H. Niemann*

*Forschungsbereich Biotechnologie, Institut für Tierzucht, Mariensee, 31535 Neustadt*

### **Einleitung**

Nach der Geburt der weltweit ersten Klonferkel im Jahre 2000 wurden international erhebliche Anstrengungen unternommen, um die sehr niedrigen Entwicklungsraten (<1%) porziner Embryonen nach somatischem Kerntransfer zu erhöhen. Mit der Etablierung eines funktionierenden Reifungsprotokolls stellen aus Schlachthofovarien gewonnene, In vitro-gereifte Oozyten mittlerweile eine nahezu äquivalente Alternative zu in vivo gereiften Eizellen dar und stehen für den Kerntransfer in ausreichender Menge zur Verfügung. Jedoch sind beim Embryotransfer geklonter Embryonen auf Empfängertiere immer noch 100-120 Kerntransferkomplexe unmittelbar nach Aktivierung pro Empfängersau nötig, um eine Trächtigkeit zu etablieren und vitale Klonferkel zu erhalten.

Ziel dieser Arbeit war es, eine Methode zu entwickeln, mit der eine Vorauswahl an entwicklungs-kompetenten Kerntransferkomplexen möglich ist. Hierbei galt als Maßstab die In vitro-Entwicklung bis zur Blastozyste, wobei Kerntransferembryonen mit parthenogenetischen und in vitro produzierten Embryonen verglichen wurden.

### **Material und Methoden**

Die Oozyten wurden nach 40- stündiger In vitro- Reifung entkumuliert und auf die Anwesenheit eines Polkörpers selektiert. Als Kernspenderzellen dienten serumreduzierte fetale Fibroblasten.

Zur Erstellung der *Fibroblasten-Oozyten-Komplexe* wurde mit Hilfe von Mikromanipulatoren jeweils ein einzelner fetaler Fibroblast im Perivitellarraum der gereiften, entkumulierten Oozyte abgesetzt, nachdem bei dieser das gesamte Genom (Polkörper und Metaphase) entfernt wurde. Hiernach wurde die Spenderzelle mit der Eizelle fusioniert und elektrisch sowie chemisch aktiviert.

Zeitgleich mit der Aktivierung der Kerntransfer-Komplexe wurden auch entkumulierte Oozyten zur Erstellung *parthenogenetischer Embryonen* elektrisch und chemisch aktiviert.

Die *IVF-Embryonen* wurden erstellt, indem entkumulierte Oozyten (derselben Reifungscharge der o.g. Eizellen) für ca. 12h mit aufbereitetem Nebenhodenschwanzsperma kokultiviert und anschließend zeitgleich mit den anderen Embryonengruppen in vitro kultiviert wurden.

Im **ersten Versuch** wurde die bisherige Sauerstoffkonzentration von 20% mit einer reduzierten Sauerstoffkonzentration von 5% während der In vitro- Kultur verglichen.

Im **zweiten Versuch** wurde in den Versuchsgruppen ein modifiziertes Kulturmedium (mNCSU 23) mit Pyruvat/Lactat und *ohne* Glucose verwendet, welchem an Tag 3 nach Beginn der Kultivierung Glucose zugesetzt wurde. Die Kontrollgruppen wurden in NCSU 23 kultiviert.

Zur Ermittlung des Entwicklungspotentials wurden die Embryonen aller Gruppen nach 6 Tagen hinsichtlich ihrer Morphologie (Blastozyste) und Kernzahlen ausgewertet.

Anschließend wurden in vier Versuchsdurchgängen Embryotransfers geklonter porziner Embryonen auf insgesamt 5 Empfängertiere durchgeführt. Hierbei wurden die Embryonen entweder nach 3- oder 6- tägiger In vitro- Kultur auf synchronisierte Empfängertiere übertragen.

## Ergebnisse

Im **ersten Versuch** konnte bei allen Gruppen eine Verbesserung der Entwicklung unter reduzierter Sauerstoffkonzentration (5% O<sub>2</sub>) festgestellt werden, was sowohl in den Blastozystenraten als auch durch die Kernzahlen deutlich wurde (Tab.1).

Embryonengruppe		Gesamt	Fusionsrate [%]	Teilungsrate [%]	Blastozystenrate [%]	Ø-Kernzahl Blastozysten
NT	20% O <sub>2</sub>	n= 279	85,5	74,2	6,8	17,7
	5% O <sub>2</sub>	n= 250	85,5	79,2	19,6	25,8
IVF	20% O <sub>2</sub>	n= 710	-	77,4	22,8	27,1
	5% O <sub>2</sub>	n= 701	-	77,9	30,5	33,8
Parth.	20% O <sub>2</sub>	n= 723	-	81,6	28,8	25,1
	5% O <sub>2</sub>	n= 729	-	84,9	39,6	29,8

**Tabelle 1: Einfluss der Sauerstoffkonzentration auf Blastozystenrate und durchschnittliche Blastozystenkerzahl**

Im **zweiten Versuch** konnte insbesondere bei den Kerntransferembryonen in der modifizierten In vitro-Kultur eine weitere Optimierung der Entwicklung festgestellt werden, wobei die durchschnittlichen Kernzahlen sich zwischen den einzelnen Gruppen kaum unterschieden. Bei den parthenogenetischen und IVF-Embryonen ergaben sich jeweils keine Unterschiede bezüglich der Kernzahlen; die Blastozystenraten waren hier in der Kontrollgruppe geringfügig höher (Tab.2).

Embryonengruppe		Gesamt	Fusionsrate [%]	Teilungsrate [%]	Blastozystenrate [%]	Ø-Kernzahl Blastozysten
NT	NCSU23	n= 242	86,2	83,9	22,7	29,2
	mNCSU23	n= 271	86,2	87,1	32,5	31,5
IVF	NCSU23	n= 506	-	88,5	35,9	28,4
	mNCSU23	n= 521	-	91,2	33,0	26,7
Parth.	NCSU23	n= 511	-	86,7	43,4	26,7
	mNCSU23	n= 549	-	94,5	44,3	25,9

**Tabelle 2: Einfluss des Kulturmediums auf Blastozystenrate und durchschnittliche Blastozystenkerzahl**

Bei den In vivo- Versuchen konnten sowohl nach Embryotransfer geklonter 4- bis 8- Zeller als auch nach der Übertragung von Blastozysten keine Trächtigkeiten etabliert werden.

## Zusammenfassung und Diskussion

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass eine verminderte Sauerstoffkonzentration während der In vitro-Kultur das Entwicklungspotential von Schweineembryonen positiv beeinflussen kann. Dies gilt für alle Gruppen (Kerntransfer, IVF, Parthenogenese).

Desweiteren konnte durch die Veränderung des Kulturmediums insbesondere bei den geklonten Embryonen durch die zeitlich verzögerte Glucosezugabe ein positiver Effekt auf die Qualität der Embryonen beobachtet werden; die Blastozystenrate der geklonten Embryonen war mit der der IVF- bzw. Parthenogenese-Embryonen nahezu vergleichbar.

Bei den am Anschluss an die In vitro- Versuche durchgeführten Transfers geklonter Embryonalstadien auf synchronisierte Empfängertiere konnten keine Trächtigkeiten etabliert werden. Hier sind weitere Versuche vorgesehen.