

## **Einfluss von gesextem Sperma auf das mRNA-Expressionsmuster boviner in vitro produzierter Blastozysten**

K.M. Morton<sup>1</sup>, D. Herrmann<sup>2</sup>, B. Sieg<sup>2</sup>, C. Struckmann<sup>2</sup>, W.M.C. Maxwell<sup>1</sup>, D. Rath<sup>2</sup>, G. Evans<sup>1</sup>, K. Korsawe<sup>2</sup>, E. Lemme<sup>2</sup>, A. Lucas-Hahn<sup>2</sup>, H. Niemann<sup>2</sup> und C. Wrenzycki<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Centre for Advanced Technologies in Animal Genetics and Reproduction (ReproGen),  
Faculty of Veterinary Science, The University of Sydney, NSW 2006, Australia

<sup>2</sup>Institut für Tierzucht (FAL), Forschungsbereich Biotechnologie, Mariensee,  
31535 Neustadt, Germany

Spermasexing ist erfolgreich zur Generierung von Embryonen und Kälbern eingesetzt worden. Die Nachkommen entwickeln sich normal und weisen keine Abnormalitäten auf. Hinsichtlich der zeitlichen Entwicklung der Embryonen, die mit gesextem Sperma erstellt worden sind, wurden jedoch in vivo und in vitro Unterschiede zu solchen festgestellt, die mit unsortiertem Sperma produziert worden waren. Ziel unserer Untersuchungen war es, den Einfluß von gesextem Sperma auf das mRNA-Expressionsmuster entwicklungsrelevanter Gene in bovinen in vitro produzierten Blastozysten zu ermitteln.

Die Embryonen wurden nach einem Standardprotokoll für die In vitro-Produktion erstellt. Die In vitro-Maturation (IVM) wurde in TCM-Medium, supplementiert mit BSA und Hormonen, durchgeführt. Die Vorbereitung der sortierten und unsortierten Spermien für die In vitro-Befruchtung (IVF) erfolgte durch eine Percoll-Zentrifugation. Nach 19stündiger IVF schloss sich die Kultur (IVC) der Zygoten in SOF plus BSA an. An einer repräsentativen Stichprobe wurde mittels Lacmoid-Färbung der Befruchtungsstatus (Mono- und Polyspermie) festgestellt. Zweiundsiebzig Std. nach der Insemination erfolgte die Bestimmung der Teilungsrates. An Tag 7 und Tag 8 wurde die Entwicklungsrate zur Blastozyste ermittelt. Durch die Double Dye-Färbemethode erfolgte an einer repräsentativen Stichprobe der an Tag 7 und Tag 8 expandierten Blastozysten die Bestimmung der Gesamtzellzahl und der prozentuale Anteil an ICM-Zellen. Entsprechend des Auftretens der Blastozystenexpansion an Tag 7 oder Tag 8 wurden die Embryonen bei -80°C bis zur mRNA-Analyse eingefroren. Mittels eines semi-quantitativen Endpunkt-RT-PCR-Assays wurde der relative Gehalt folgender Gentranskripte, die am Stoffwechsel (Glukosetransporter-3, Glut-3), der Antwort auf (oxidativen) Stress (Glukose-6-phosphatdehydrogenase, G6PD; Hitzeschockprotein70.1, Hsp) und der X-Chromosom-Inaktivierung (X-inaktives spezifisches Transkript, Xist) eine wichtige Rolle spielen, in einzelnen Blastozysten der unterschiedlichen Gruppen (Tag 7 und Tag 8 expandierte Blastozysten, produziert mit sortiertem und nicht sortiertem Sperma) bestimmt. Die Analysen wurden mindestens sechsmal pro Versuchsgruppe wiederholt. Aus dem Überstand der RNA-Isolation erfolgte bei allen Blastozysten eine Extraktion der DNA, die zur Geschlechtsbestimmung mittels PCR eingesetzt wurde.

Die Penetrationsraten, mono- und polyspermen Befruchtungsraten unterschieden sich nicht signifikant zwischen Zygoten, die mit nicht sortierten sowie X- und Y-Chromosomen tragenden Spermien produziert worden waren (Tabelle 1).

Tabelle 1: Mono- und polysperme Befruchtung nach IVF mit unsortiertem und sortiertem (X-, Y-Spermien) Tiefgefriersperma eines Bullen

	Oozyten (n)	Monosperme Befruchtung (%)	Polysperme Befruchtung (%)
Unsortiert	183	153 (83.6)	2 (1.1)
X-Spermien	345	256 (74.2)	4 (1.2)
Y-Spermien	269	197 (73.2)	5 (1.9)

In allen Gruppen hatten sich 72 Std. nach der Insemination 70% und mehr der Zygoten geteilt (Tabelle 2). Auch die Teilungsraten waren in den Gruppen ähnlich (Tabelle 2). Während die Blastozystenrate an Tag 7 keinen Unterschied zwischen den Gruppen aufwies, entwickelten sich signifikant mehr expandierte Blastozysten an Tag 8 in der Gruppe, die mit ungesextem Sperma befruchtet wurde, im Vergleich zu denen, wo sortiertes Sperma eingesetzt wurde (Tabelle 2).

Tabelle 2: Entwicklungsraten boviner Zygoten, die mit unsortiertem und sortiertem (X-, Y-Spermien) Tiefgefriersperma eines Bullen erstellt worden

	Oozyten (n)	Geteilte Oozyten an Tag 3 (%)	Entwicklung zur Blastozyste (%)		Gesamtzell- zahl	Anteil der ICM-Zellen (%)
			Day 7	Day 8		
Unsortiert	160	134 (83.8)	19 (11.9)	67 (41.9) <sup>a</sup>	157.4±8.8	30.8±1.1
X-Spermien	295	236 (80.0)	28 (9.5)	74 (25.8) <sup>b</sup>	153.6±9.2	31.7±1.3
Y-Spermien	223	177 (79.4)	17 (7.6)	57 (25.6) <sup>b</sup>	156.0±9.3	31.2±0.7

a:b p≤0.05 (ANOVA)

Das prozentuale Geschlechtsverhältnis (weiblich:männlich) bei den Blastozysten, die mit unsortiertem Sperma produziert wurden, lag an Tag 7 bei 54:46 und an Tag 8 bei 52:48. Embryonen, die mit sortiertem Sperma erzeugt worden, wiesen zu 96% (46/48) das vorherbestimmte Geschlecht auf.

Die relative Häufigkeit der Glut3-Transkripte war in Tag 7- Blastozysten durch das Geschlecht der Embryonen (höher in männlichen) und den Sortierprozess (niedriger in Embryonen aus gesortetem Sperma) signifikant verändert, während sich in Tag 8- Blastozysten keine Unterschiede zeigten. Das Sorting beeinflusste die Transkriptmenge des G6PD-Gens in Tag 7-Blastozysten signifikant (niedriger in Embryonen aus gesortetem Sperma), während in Tag 8-Blastozysten männliche Embryonen eine signifikante Erniedrigung im Vergleich zu weiblichen aufwiesen. Für die relative Häufigkeit der Xist-Transkripte konnte festgestellt werden, dass das Geschlecht sowohl in Tag 7- als auch in Tag 8-Blastozysten eine signifikante Erniedrigung hervorruft. Ein signifikanter Effekt des Spermasexings wird nur in weiblichen Embryonen an Tag 7 erkennbar. Die relative Häufigkeit der Hsp-Transkripte war in weiblichen Tag 7- und Tag 8-Blastozysten signifikant höher als in männlichen.

Diese Ergebnisse zeigen, dass die Verwendung sortierten Spermas in der IVP keinen Einfluss auf die Zellzahl und die Teilungsrate hat. Ein Effekt zeigt sich bei der Blastozystenrate an Tag 8 und in der relativen Häufigkeit der Glut-3-, G6PD- und Xist-Transkripte (nur weibliche) in Tag7-Blastozysten. Erstmals konnten somit Unterschiede auf molekularer Ebene aufgezeigt werden, die auf die Verwendung geschlechtsbestimmten Spermas in der IVF zurückzuführen sind.