

Tierzucht: Durch LASER zum geplanten Geschlecht

D. Rath (Neustadt) und L. A. Johnson (Beltsville, USA)

Bei der Haltung und der Produktion von Nutztieren spielt das Geschlecht der Tiere oft eine wichtige Rolle. Beispielsweise sind in Milchproduzierenden Betrieben in erster Linie weibliche Tiere von Interesse, während bei der Fleischproduktion Mastbullen bevorzugt werden. Seit geraumer Zeit sucht man daher schon nach Möglichkeiten, das Geschlechtsverhältnis in der Nachkommengeneration zu beeinflussen. Dies kann effektiv nur durch Selektion der Spermien vor der Befruchtung erfolgen. Ein zuverlässiges Verfahren zur Spermien Selektion wurde nahezu bis zur Praxisreife entwickelt und wird in diesem Beitrag vorgestellt.

HINTERGRUND

Die Natur kennt verschiedene Mechanismen, um das Geschlecht der Nachkommen zu bestimmen. Bei niederen Tieren kann dies zum Beispiel die Anzahl der X-Chromosomen sein oder bei Reptilien die Umgebungstemperatur während der

lichen Nachkommen entstehen. Die wesentliche Information zur Ausbildung des männlichen Geschlechts (Ausbildung der Hodenanlage und Unterdrückung des weiblichen Geschlechts) ist auf dem kurzen Arm des Y-Chromosoms angelegt. Die entsprechende Gen-Region ist bekannt und durch Erstellung transgener, also gentechnisch veränderter weiblicher Mäuse mit Ausbildung einer Hodenanlage und der entsprechenden Hormonproduktion funktionell nachgewiesen.

VERFAHREN DER GESCHLECHTSERKENNUNG

Auf verschiedene Weisen ist eine Geschlechtererkennung möglich:

■ Durch Ultraschalluntersuchung des Fetus (Darstellung des Geschlechtshöckers bzw. Hoden- oder Gesäugeanlage, vgl. Abb. 1) sowie durch Chromosomenanalyse nach Amniozentese. Beide Verfahren werden vorwiegend beim Menschen eingesetzt. Das Letztere dient insbesondere dazu, geschlechtsgebundene Erkrankungen in der frühen Schwangerschaft zu erkennen. Bei landwirtschaftlichen Nutztieren wird

diese Technik kaum angewandt, da eine Unterbrechung zu diesem Zeitpunkt der Trächtigkeit (Tag 55–100) aus Tierschutzgründen obsolet ist und außerdem erhebliche Probleme bei einer folgenden Trächtigkeit auftreten können.

■ Durch mikrochirurgische Entnahme einzelner Zellen und anschließender molekular-genetischen Aufarbeitung im Rahmen des Embryotransfers. Die Entnahme von Zellen ist zu diesem Zeitpunkt ohne wesentlichen Einfluß auf die Weiterentwicklungsfähigkeit des Embryos, da alle Zellen noch „omnipotent“ sind. Diese Methode der Geschlechtsbestimmung ist vor allem beim Rind bis zur Praxisreife entwickelt worden. Nachteil des mikrochirurgischen Eingriffs in den Embryo ist aber, daß die den Embryo umgebende Hülle, die Zona pellucida, eröffnet wird. Hierdurch wird eine wichtige keimabweisende Barriere des Embryos zerstört. Aufgrund internationaler Regularien dürfen solche Embryonen nur bedingt ex-

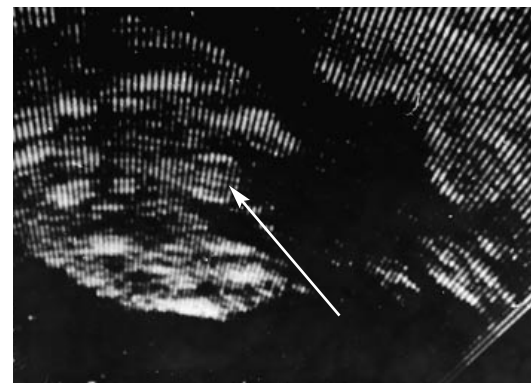
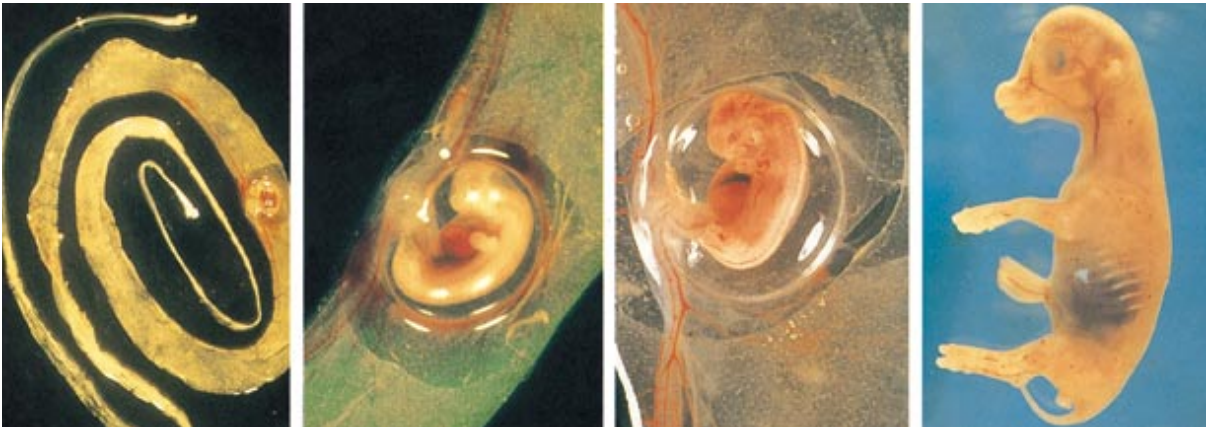


Abb. 1: Ultraschallaufnahme eines männlichen Rinderfetuses. Nebenstern ist der Hodensack (Skrotum) erkennbar (vgl. nebenstern).

Tab. 1: Abhängigkeit der Sortiergenauigkeit von der DNA-Differenz zwischen X- und Y-Chromosom

Tierart	X-Y-DNA Differenz (%)	% Y-Spermien bei Selektion nach Y	% X-Spermien bei Selektion nach X
Eber	3,7	91,2 ± 2,6	92,7 ± 1,6
Bulle	3,9	92,8 ± 0,9	90,4 ± 1,4
Kaninchen	3,0	84,3 ± 5,7	88,0 ± 2,2

Embryonalphase. Bei Säugetieren wird das Geschlecht durch die Kombination der Geschlechtschromosomen festgelegt. Eizellen sind immer X-chromosomal; Spermien tragen entweder ein X- oder ein Y-Chromosom. Das Spermium bestimmt also das Geschlecht des Nachkommens: Die Befruchtung einer Eizelle mit einer X-Chromosom-tragenden Samenzelle erzeugt einen weiblichen Nachkommen, Y-Chromosom-tragende Spermien lassen einen männ-



Die Entwicklung des Rinderembryos. Am 29. Tag ist er etwa 10 mm groß (2. Bild), wächst in 10 Tagen um weitere 10 mm und zeigt am 65. Tag eine Größe von 9 cm

portiert werden. Auch die Möglichkeit der Langzeitlegerung mikrochirurgisch behandelter Embryonen ist eingeschränkt. Schließlich werden bei dieser Methode nur die Embryonen mit dem gewünschten Geschlecht auf Empfängertiere übertragen; die verbleibenden rund 50% werden vernichtet.

BEEINFLUSSUNG DES GESCHLECHTS (SEXING)

Eleganter wäre daher ein Verfahren, mit dem sich das Geschlecht bereits im Vorfeld gezielt festlegen läßt, also zum Zeitpunkt der Befruchtung. Hierzu wurden in den vergangenen Jahrzehnten die unterschiedlichsten Ansätze geprüft. Geschlechtsgebundene Geschwindigkeitsmuster wurden ebenso unter-

sucht wie verschiedene Oberflächenladungen oder die unterschiedlichen Größen- und Gewichtsverhältnisse zwischen X- und Y-Chromosom-tragenden Spermien. Diese auf rein physikalischen Merkmalen basierenden Verfahren führten aber alle nicht zum gewünschten Erfolg.

Einen erfolgreicherer Ansatz verfolgten Forscher des USDA (United States Department of Agriculture) in Beltsville, USA. Ausgehend von dem unterschiedlichen DNA-Gehalt von X- bzw. Y-Chromosom-tragenden Spermien entwickelten sie in den letzten 10 Jahren ein Verfahren, diese Unterschiede meßbar zu machen und für die Steuerung einer Sortier-einrichtung zu nutzen. Mittlerweile hat man dort die sogenannte „Beltsville Sperm Sexing Technology (BSST)“ soweit verfeinert, daß in Kombination mit anderen Biotechniken bislang circa 300 Nachkommen vor allem bei Rind, Schwein und Kaninchen erzeugt werden konnten (Das Kaninchen diente in den jeweiligen Untersuchungsphasen als Modelltier für die Techniken, die später an den landwirtschaftlichen Nutztieren zum Einsatz kamen).

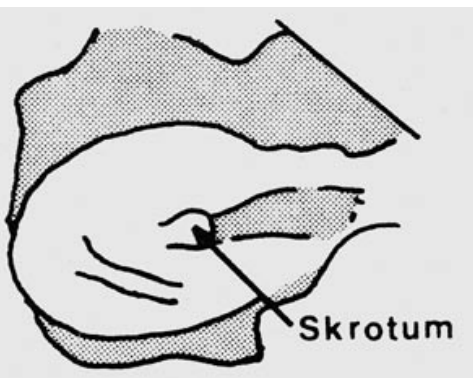
Das Institut für Tierzucht und Tierverhalten Mariensee der Bundesforschungsanstalt für Landwirtschaft (FAL) beteiligt sich an den Untersuchungen im Rahmen der von BML und USDA geförderten deutsch-amerikanischen Kooperation seit 1990,

wobei insbesondere die Erzeugung von Nachkommen beim Schwein durch in-vitro-Befruchtung und alternative Besamungsverfahren im Blickpunkt stehen.

DNA-GEHALT KANN GEMESSEN WERDEN

Der Chromosomensatz eines Spermiums besteht aus den sogenannten Autosomen, die die genetischen Informationen aller Körperzellen beinhalten, und einem von zwei möglichen Heterosomen (Geschlechts-Chromosomen), die nach ihrer Form als X- und Y-Chromosom bezeichnet werden. Der DNA-Gehalt von „männlichen“ Spermien ist etwas geringer als der von „weiblichen“ Spermien, da das Y-Chromosom kleiner als das X-Chromosom ist und dementsprechend weniger DNA enthält. Bei den landwirtschaftlichen Nutztieren beträgt der Unterschied etwa 3–4% (vgl. Tab. 1). Der DNA-Gehalt der Autosomen ist relativ konstant.

Dieser kleine, aber entscheidende Unterschied läßt sich mit Hilfe moderner fluoreszierender Vitalfarbstoffe optisch darstellen und kann zur Steuerung einer Sortier-einrichtung genutzt werden. Als Basisgerät dient ein sogenanntes Flowzytometer mit Zellsortierer, das an die besonderen morphologischen Bedingungen von Spermien angepaßt werden mußte (Abb. 2, S. 30).



nach ca. 100 Tagen Trächtigkeit. Zwischen den Hinterbeihende schematische Abbildung)

Flowzytometer dienen zur Erkennung von DNA-Gehalten in Zellen und werden zum Beispiel zur Bestimmung von Zell- und Partikelgrößen oder Zellzahlen verwendet. Das Grundgerät besteht aus einer energiereichen Lichtquelle wie einem Laser, einem Fotomultiplier, einem Light Scatter sowie der eigentlichen Durchflußeinrichtung, die es erlaubt, einen gerichteten Flüssigkeitsstrom mit den zu untersuchenden Zellen an einer Lichtquelle entlangfließen zu lassen. Zur Sortierung der Zellen werden elektrostatische oder piezoelektrische Sortiereinrichtungen verwendet.

Für unsere Zwecke wurde der Light Scatter Detektor durch eine zweite Fotozelle (0° Detektor) ersetzt und statt der üblicherweise zylindrischen Einsaugdüse eine abgeschrägte, rechteckig geformte Düse verwendet. Für den Sortiervorgang wurden die Ejakulate auf 10×10^6 Spermien/ml verdünnt und mit einem Fluoreszenzfarbstoff (Bisbenzimid Hoechst 33342) angefärbt. Der Farbstoff durchdringt die Spermienmembran bei 32 °C innerhalb von 30 Minuten und lagert sich direkt an die Spermien-DNA an. Die gefärbten Samenzellen werden anschließend in das Flowzytometer angesaugt. Durch die beschriebene Düsenform lassen sich die Spermien im Flüssigkeitsstrom weitgehend so orientieren, daß ihre flache Seite möglichst senkrecht zu dem Laserstrahl des Flowzytometers ausgerichtet ist. Das energiereiche Laserlicht regt die Spermien zur Aussendung eines Fluoreszenzsignals an. Dieses Sig-

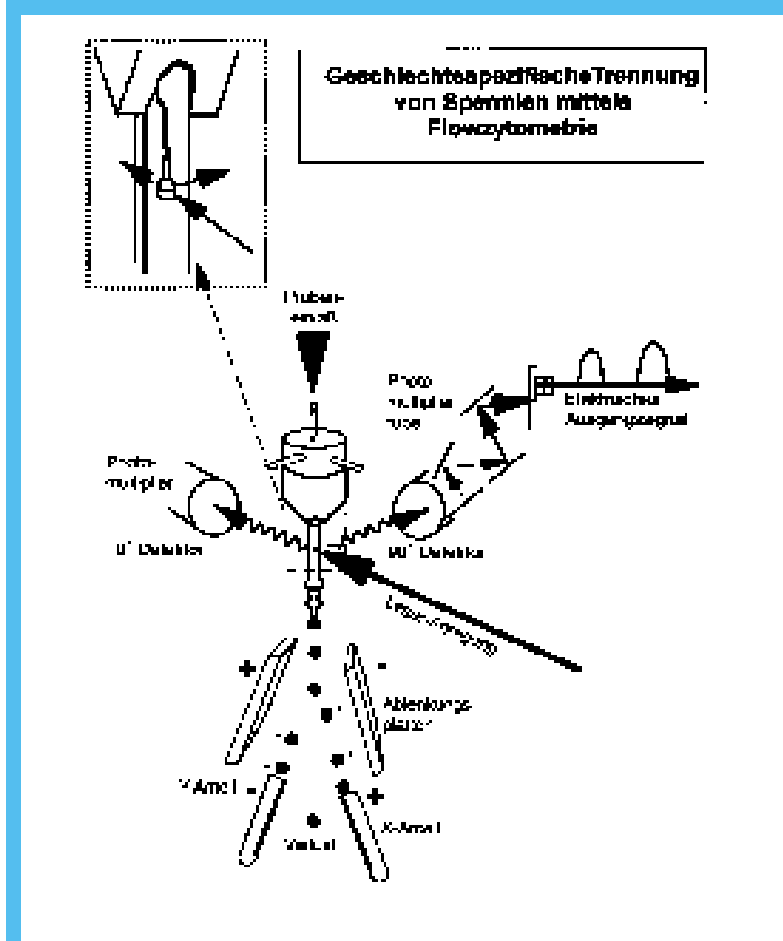


Abb. 2: Sortiervorgang für Spermien mit Hilfe eines Flowzytometers mit Zellsortierer (oben Schema, rechts Bild der Anlage). Die Tröpfchen, die jeweils ein Spermium enthalten, werden abhängig vom Geschlechtschromosom unterschiedlich elektrisch geladen, abgelenkt und in den blauen bzw. rosa Röhrchen aufgefangen

nal, dessen Stärke proportional zum DNA-Gehalt der Samenzelle ist, wird von einer im 0° Winkel installierten Fotozelle registriert und einem schnellen Rechner zugeführt.

Eine Besonderheit von Spermien ist, daß sie von ihrem Rand zusätzlich ein zweites Fluoreszenzsignal aussenden. Dieses ist nicht proportional zum DNA-Gehalt, sondern kommt aufgrund des hohen Brechungsindex der paddelförmigen Spermien gegenüber dem Flüssigkeitsstrom zustande. Dieses Signal wird von der zusätzlich installierten

Fotozelle (90° Detektor) registriert und dient zur Ermittlung der Orientierung der Samenzellposition zum Laserlicht. Nur Samenzellen, die ein hohes Randsignal aussenden (Schwellwertmessung) und die mit ihrer flachen Seite senkrecht zu dem auftreffenden Laserlicht orientiert sind, werden für den eigentlichen Sortiervorgang berücksichtigt. Alle nicht eindeutig erfaßbaren oder nicht optimal orientierten Spermien werden vom eigentlichen Sortierprozess ausgeschlossen und in einem getrennten Sammelgefäß aufgefangen.

Der Flüssigkeitsstrom ist diskontinuierlich: Es entstehen Tröpfchen, die maximal eine Samenzelle enthalten. Je nach Stärke des vom Flowzytometer erkannten (DNA)-Signals werden diese Tröpfchen elektrisch mehr oder weniger stark geladen. Beim anschließenden Passieren eines elektrostatischen Feldes werden die Tröpfchen in ihrer Flugrichtung entsprechend ihrer Ladung seitlich abgelenkt und können getrennt entsprechend ihres DNA-Gehaltes in Eppen-

Tab. 2: Biotechnische Verfahren zur Erzeugung von Nachkommen mit gesex-tem Sperma

Tierart	intradutale Samenübertragung	Keimzellentransfer in den Eileiter GIFT	In-vitro-Befruchtung IVF	un chirurgische Besamung IUI
Kaninchen	+	-	+	-
Rind	+	-	+	+
Schwein	+	+*	+	-

+ = Verfahren erprobt; - = nicht getestet oder Untersuchungen noch nicht abgeschlossen; * nur bis zum späten Embryonalstadium überprüft



dorf-Röhrchen aufgefangen werden. Die Röhrchen sind mit einem für die Samenzellen geeigneten Kulturmedium gefüllt (Abb. 2).

Üblicherweise werden in einem etwa zweistündigen Durchlauf ca. 150 Millionen Spermien sortiert. Hiervon lassen sich mit modernen Hochgeschwindigkeits-Flowzytometern circa 10 Millionen Spermien je Geschlecht nach ihren chromosomalen Eigenschaften sortieren („sexen“). Die Sortiergenauigkeit wird maßgeblich von der DNA-Differenz beeinflusst und schwankt bei den landwirtschaftlichen Nutztieren zwischen 85 und 95 % (Tab. 1). Dies läßt sich sehr genau durch eine Rück-Analyse unmittelbar nach dem eigentlichen Sortiervorgang ermitteln.

NOCH ZU GERINGE ANZAHL VON SPERMIIEN

Auch wenn intensive Forschungsarbeiten in Zukunft eine hohe Zahl gesexter Spermien in Aussicht stellen,

kann zur Zeit die begrenzte Ausbeute pro Ausgangsprobe noch nicht befriedigen. Für eine instrumentelle Samenübertragung, wie sie bei Rind und Schwein üblich ist, werden 20 Millionen (Rind) bzw. 2 Milliarden Samenzellen (Schwein) benötigt. Das bedeutet: Um genügend gesexete Spermien für eine einzige Samenübertragung beim Rind zu bekommen, müßte ein Flowzytometer rund 2 Stunden laufen. Das ist nicht wirtschaftlich. In der jüngsten Vergangenheit wurden jedoch biotechnische Verfahren entwickelt, mit denen auch mit geringen Spermienzahlen Nachkommen erstellt werden können. Hierzu zählen:

- die intra-tubale Samenübertragung, d. h. die chirurgische Besamung in dem Eileiter,
- der sogenannte „Gamete intra fallopian transfer (GIFT)“, bei dem Eizellen und gesexete Spermien in den Eileiter eines Empfängertieres übertragen werden,
- die in-vitro-Befruchtung (künstliche Befruchtung „im Reagenzglas“) mit anschließendem Embryotransfer,
- und die hoch intra-uterine, nicht chirurgische Samenübertragung (IUI), die zur Zeit in Beltsville, Fort Collins und am FAL-Institut in Mariensee für Rind und Schwein untersucht wird. Hierzu werden die Spermien in die Spitze des Uterushorns an dem Übergang zum Eileiter übertragen.

Tabelle 2 faßt die Übertragungsmöglichkeiten bei verschiedenen Tierarten zusammen. In Tabelle 3 sind einige Ergebnisse aufgeführt, wie sie beispielhaft für den Einsatz von gesextem Sperma beim Schwein erzielt wurden.

Gegenwärtige Untersuchungen zielen auf die Verbesserung der Spermienorientierung im Flowzytometer (Beltsville), die Verbesserung der in-vitro-Methoden (Mariensee und Beltsville) und die hoch intra-uterine Besamung bei Rind und Schwein. Verschiedene Institutionen in den USA, England, den Niederlanden und Australien beteiligen sich an weiteren Detailfragen. Es ist abzusehen, daß die „Beltsville Sperm Sexing Technology (BSST)“ in Kürze Eingang in moderne Zuchtkonzeptionen finden wird. In den USA ist bereits ein Unternehmen gegründet worden, daß sich ausschließlich mit dem Vertrieb des patentierten BSST-Verfahrens, der erforderlichen Geräte und dem Verkauf von gesextem Sperma beschäftigen wird. ■

Dr. D. Rath, Bundesforschungsanstalt für Landwirtschaft (FAL), Institut für Tierzucht und Tierverhalten Mariensee, 31535 Neustadt

Dr. L. A. Johnson, U.S. Department of Agriculture, Agricultural Research Service, Germplasm and Gamete Physiology Laboratory, Beltsville, MD 20705, USA

Tab. 3: Geschlecht der Ferkel, die aus Befruchtungen mit gesextem Schweinesperma hervorgingen. A: nach intra-tubaler Besamung mit gesextem Schweinesperma. B: nach in-vitro-Befruchtung mit gesextem Schweinesperma

Behandlung	Wurfgröße	Nachkommen		Vorhersage*	
		real weiblich	real männlich	X	Y
A					
sortiert für Y (männl.)	7	1 (= 14%)	6 (= 86%)	15%	85%
sortiert für X (weibl.)	8	7 (= 88%)	1 (= 12%)	89%	11%
B					
sortiert für X (weibl.)	6	6	0	89%	11%
sortiert für X (weibl.)	4	4	0	89%	11%

* aufgrund der Rück-Analyse sortierter Spermien