Aus dem Institut für Tierzucht und Tierverhalten Mariensee

Detlef Rath

Einsatz von gesextem Sperma in Rinderzuchtprogrammen

Manuskript, zu finden in www.fal.de

Published in: Landbauforschung Völkenrode Sonderheft 242, pp. 37-42

Braunschweig
Bundesforschungsanstalt für Landwirtschaft (FAL)
2002

Einsatz von gesextem Sperma in Rinderzuchtprogrammen

Detlef Rath*

Die Basis für moderne Rinderzuchtprogramme ist die instrumentelle Samenübertragung. Ursprünglich wurde dieses biotechnische Verfahren aus tiermedizinischen Gründen Ende der 40er Jahre entwickelt, um die Infektionskette der Geschlechtskrankheiten, die von den Deckbullen übertragen wurden, zu unterbrechen. Innerhalb weniger Jahre wurden venerische Erkrankungen in den Rinderherden auf ein Minimum reduziert und auch andere übertragbare Seuchen mit Unterstützung der Besamung weitgehend eliminiert. Vorteile durch die Besamung für züchterische Aufgaben lagen auf der Hand und der Einsatz von Frischsperma ermöglichte zunächst die Nutzung hochwertiger Vererber lokaler und nationaler Zuchtressourcen. Voraussetzungen für den internationalen Spermahandel wurden Mitte der 60er Jahre durch die Tiefgefrierkonservierung von Rindersamen geschaffen. Ohne diese Biotechnik gäbe es heute keine weltweite Nutzung der Milchrinderrassen amerikanischer und kanadischer Herkunft.

Als innovatives Instrument für die Rinderzucht steht jetzt eine neue Technik am Abschluss der Laborphase, die es erlaubt, Ejakulate vor der Besamung aufgrund der geschlechtsbestimmenden Eigenschaften der Samenzellen zu sortieren und solche Nachkommen vermehrt zu erzeugen, die für eine bestimmte Produktionsrichtung vorteilhaft sind. Dies dient der Optimierung der Bestandsgrößen, minimiert den Anfall von Reststoffen aus der Tierproduktion, maximiert die Nährstoffnutzung in Bezug auf die Produktmenge, erleichtert das Zuchtmanagement und verbessert die Chancen für den Export tragender Rinder. Besamungen mit gesexten Spermien sind u. a. vorteilhaft bei der Erzeugung von Bullenmüttern, der Vermehrung wertvoller Vererber, der Reduzierung von Bullenkälbern in Milchbetrieben und der Verringerung von Testbesamungen um bis zu 50 %. Aktuell besteht ein erheblicher Mangel an weiblichen Kälbern, der u. a. durch kürzere Nutzungszeiten der Milchkühe und abnehmende Fruchtbarkeit bedingt ist. Durch den Einsatz von gesextem Sperma könnte diese Situation kurzfristig entlastet werden.

Im Mastbetrieb werden vorwiegend Bullenkälber benötigt und bei Zweinutzungsrassen ist die Geschlechtsauswahl aufgrund positiver Merkmale in der Zuchtwertschätzung sinnvoll. Vorteile ergeben sich außerdem beim Aufbau genetischer Ressourcen und der Erhaltung vom Aussterben bedrohter Rinderrassen, insbesondere wenn neben den gesexten Spermien Oozyten tiefgefroren werden könnten.

Biologische Voraussetzungen

Bei Säugetieren wird das Geschlecht der Nachkommen durch die Geschlechtschromosomen in den Spermien bestimmt. Die Oozyten tragen immer ein X-Chromosom, deren Befruchtung mit einem X-chromosomalem Spermium zur Ausbildung des weiblichen Geschlechtsapparates führt. Befruchtungen mit Y-chromosomalen Spermien unterdrücken die Entwicklung des weiblichen Genitaltraktes (Anti-Müller-Horman) und induzieren die Bildung des männlichen Genitaltraktes. Die genetisch primäre Information steuert die Ausbildung der Hodenanlage im Fetus und ist auf dem kurzen Arm des Y-Chromosoms lokalisiert. Die Y-Chromosom tragende Samenzelle enthält etwas weniger DNA als die X-Chromosom tragende. Die relativen speziesspezifischen Unterschiede des DNA-Gehaltes sind in Tabelle 1 aufgeführt.

Technische Voraussetzungen

Untersuchungen zur Trennung der „weiblichen“ und „männlichen Spermien wurden bereits zu Beginn des letzten Jahrhunderts unternommen. Bis Mitte der 80er Jahre wurde versucht, durch physikalische Verfahren Eigenschaften wie Größe, Geschwindigkeit, Dichte, Polarität usw. zur Trennung der Spermienpopulation anzuwenden oder durch immunologische Verfahren mit entsprechenden Antikörpern geschlechtsspezifische Unterschiede zu ermitteln. Die Versuche waren nicht aussagefähig oder waren nicht reproduzierbar. Der bislang

* PD Dr. Detlef Rath, Forschungsbereich Biotechnologie, Institut für Tierzucht Mariensee, Bundesforschungsanstalt für Landwirtschaft (FAL), 31535 Neustadt, e-mail: rath@tzv.fal.de

einzige wirklich bewiesene Unterschied zwischen X- und Y-Chromosom tragenden Spermien ist deren unterschiedlicher Gehalt an DNA. Mit Hilfe der sogenannten LASER-Flowzytometrie können die feinen Unterschiede der Erbsubstanz im Spermienkopf gemessen und für die Auftrennung der Ejakulate in X- und Y-Chromosom tragenden Samenzellen genutzt werden. Wesentliche Teile des Verfahrens sind als „Beltsville Sperm Sexing Technology“, BSST, patentiert worden.

Tabelle 1
Beispiele für den relativen Unterschied des DNA-Gehaltes in Spermien verschiedener Haustierspezies und des Menschen

Tierart	**Unterschied des relativen DNA-Gehaltes zwischen X- und Y-Chromosom tragenden Spermien**
Mensch	2,9 %
Kaninchen	3,0 %
Maus	3,2 %
Schwein	3,6 %
Rind	3,8 %
Pferd	4,1 %
Schaf	4,2 %

Prinzip der flowzytometrischen Spermientrennung

Frisch gewonnene Ejakulate werden hoch verdünnt und mit einem Fluoreszenzfarbstoff, der sich an die Chromosomen im Spermienkopf anlagert, markiert. Die Menge des gebundenen Farbstoffes hängt direkt von der vorhandenen DNA-Menge ab. Die Messung der Fluoreszenz erfolgt an einzelnen Spermien, die sich in einem feinen Flüssigkeitsstrom an einer starken Laserquelle vorbeibewegen. Die unterschiedlich starken Fluoreszenzsignale werden von Fotozellen erfasst und von einem schnellen Computer analysiert. Um viele Samenzellen einzeln messen zu können, wird der Flüssigkeitsstrom durch Vibrationen in einen Tröpfchenstrom zerteilt, wobei jedes Tröpfchen eine Samenzelle enthält. Für den eigentlichen Trennvorgang werden die Tröpfchen in Abhängigkeit von der Stärke des Fluoreszenzsignals, das sich aus dem relativen DNA-Gehalt ergibt, elektrisch positiv oder negativ aufgeladen. Beim anschließenden Passieren eines elektrischen Feldes bewirkt die elektrische Aufladung eine Ablenkung der Tröpfchen zur einen oder anderen Seite. Die Tröpfchen mit den Spermien werden in Eppendorf-Röhrchen in einem TES-Eidotterverdünner aufgefangen.

Mit den neusten Hochgeschwindigkeits-Flowzytometern und spezieller Software, die für die Sortierung von Spermien entwickelt wurde, können pro Sekunde bis zu 30.000 Samenzellen identifiziert werden und hiervon ca. 20 % sicher auf ihren chromosomalen Gehalt überprüft und sortiert werden. Entscheidend ist dabei, wie genau die Samenzellen vor dem Laserstrahl ausgerichtet werden. Bei Einstellung auf hohe Trenngenauigkeit liegt die Reinheit der Spermientrennung zwischen 92 und 98 %. Damit stehen pro Stunde 22 bis 25 Millionen „gesexte“ Spermien für die Besamung zur Verfügung. Durch eine unmittelbar an den Sortiervorgang durchgeführte Reanalyse liegt die Information über die Reinheit der jeweils getrennten Samenprobe bereits vor, bevor die Spermien tiefgefroren werden.

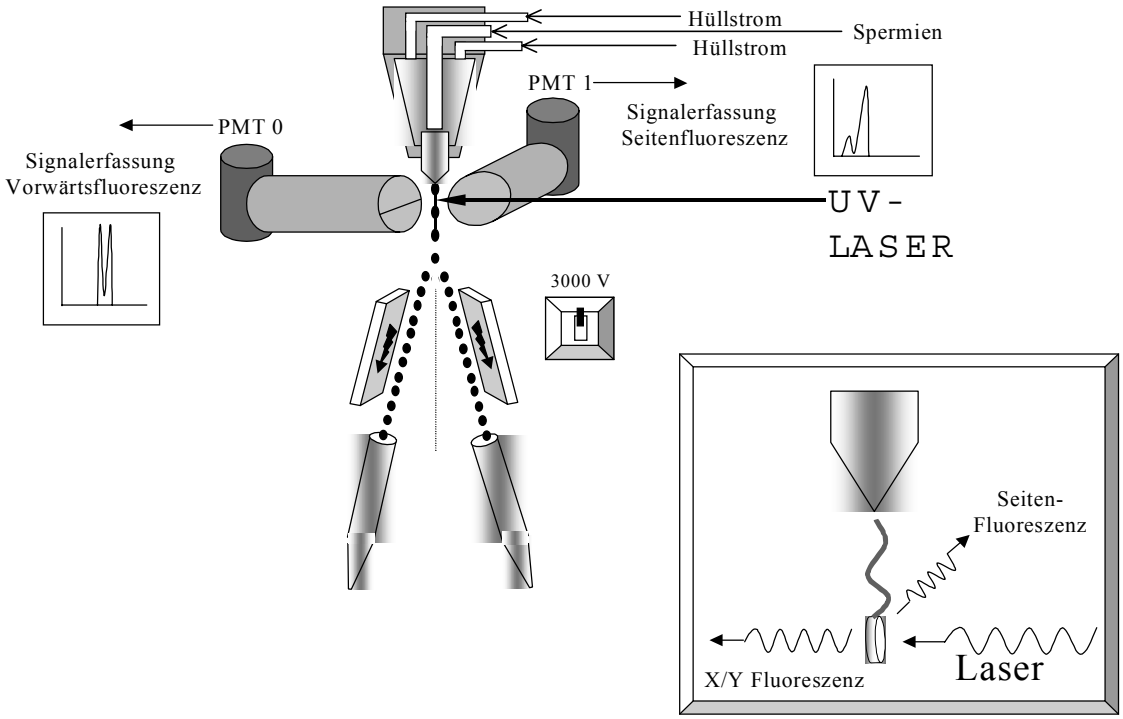

Abbildung 1
Prinzip der Flowzytometrie

Abbildung 2
Hochgeschwindigkeits-Flowzytometer (TZV Mariensee)

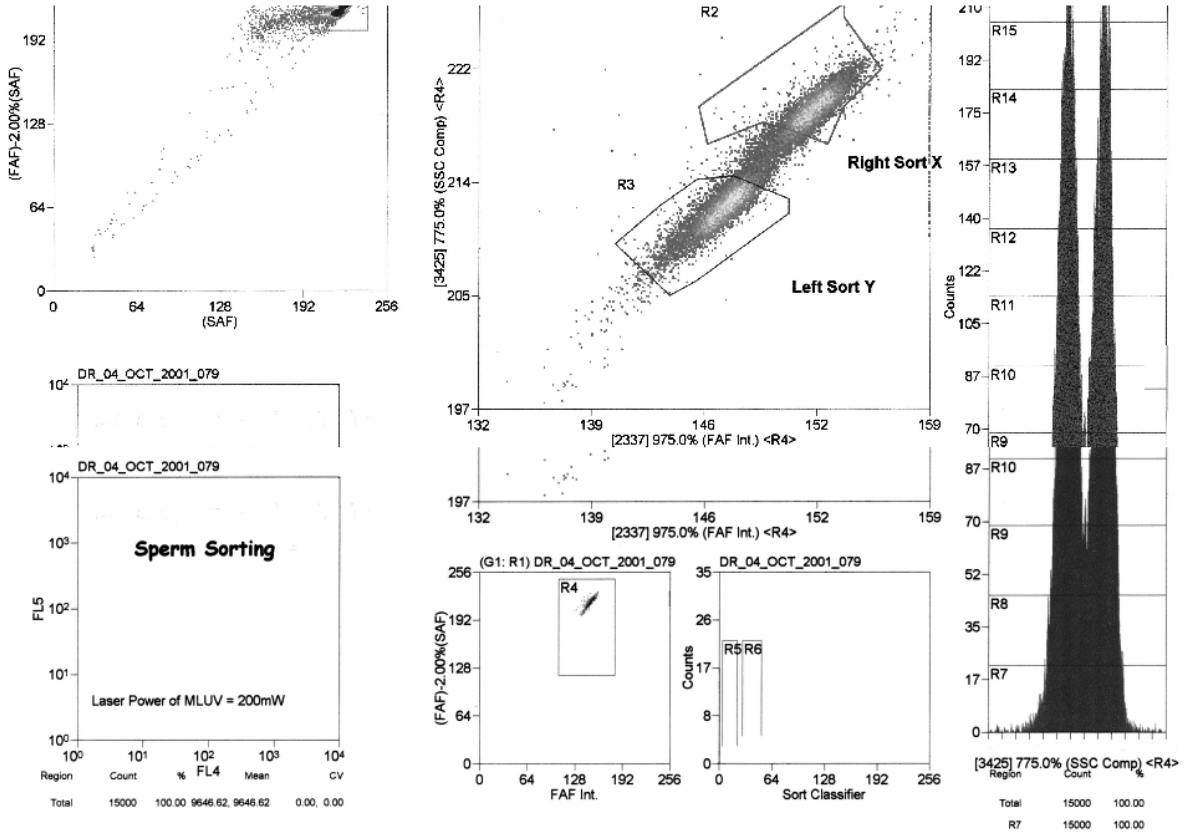

Abbildung 3
Diagramm des Sortierprozesses

Oben links ist die gesamte vom Gerät erkannte Spermienpopulation zu erkennen (jeder Punkt repräsentiert eine Samenzelle). Die dunkleren Bereiche kennzeichnen die Anhäufung von vor dem Laser richtig orientierten Spermien, wobei der obere Bereich X-chromosomale, der untere Y-chromoso-male Spermien zeigt. Im mittleren Histogramm wird die zu sortierende Spermienpopulation nach elektronischer Bearbeitung und Fokussierung dargestellt. Die beiden Rahmen geben die jeweilige Sortierrichtung vor. Im rechten Histogramm ist die Auftrennung der Spermienpopulation dargestellt. Der linke Peak repräsentiert die Y-chromosomalen, der rechte Peak die X-chromosomalen Spermien. Je tiefer der Einschnitt zwischen den Peaks erscheint, umso schneller und genauer können die Spermien sortiert werden.

Die ersten Kälber wurden 1992 aus In-vitro-Befruchtung mit gesextem Sperma geboren. Fünf Jahre später gelang die erste Besamung mit frisch sortiertem Bullensperma und seit 1999 wird das gesexte Bullensperma tiefgefroren. Im Vergleich zu den Spermienmengen, die üblicherweise in der Besamung eingesetzt werden, erscheint die Zahl gesexter Spermien, die pro Zeiteinheit isoliert werden kann, relativ gering. Bei Färsen reicht aber lt. amerikanischen Studien die Verlegung des Besamungsortes von der Zervix in das Uterushorn aus, um statt mit 20 Millionen mit 1 bis 2 Millionen lebenden Spermien erfolgreich zu besamen. Dabei sinken die Non-Returnraten gegenüber normalen Besamungen um ca. 15 % ab. Bei Kühen weist die Besamung mit gesextem Sperma noch Mängel auf, denn die Variabilität im Zyklusgeschehen scheint höher zu sein. Gegenwärtig laufen Untersuchungen im Institut für Tierzucht, um den optimalen Zeitpunkt für die Besamung von Kühen mit gesextem Sperma zu ermitteln. Offensichtlich lassen sich nicht alle Bullen verwenden, denn durch die starke Reduzierung der Spermien pro Besamungsdosis entfällt die Kompensation von Spermamängeln. Ein Einfluss wurde auch für den „Besamer“ in amerikanischen Studien nachgewiesen, der evtl. mit der veränderten Besamungstechnik im Zusammenhang steht. Bislang wurden mehr als 3.000 Kälber mit gesextem Sperma erzeugt. Das Nachkommengeschlecht war in allen Untersuchungen mit den Ergebnissen der Reanalyse hoch korreliert.

Patente und Lizenzen

Die Technik der flowzytometrischen Spermientrennung ist durch eine Reihe von Patenten geschützt. Ein wesentliches Patent wurde vom USDA in Washington erworben und die Lizenzrechte für die Nutzung bei Tieren an ein amerikanisches Unternehmen (XY Inc. Colorado) vergeben. Für die kommerzielle Nutzung ist daher ein Lizenzerwerb erforderlich.

Perspektiven zur Integration des Sperma Sexing in Rinderzuchtprogramme des Jahres 2025

Drei unterschiedliche Szenarien sind für die Entwicklung der Techniken zur Geschlechtsbeeinflussung möglich.

1. *Es bleibt bei der Notwendigkeit, Spermien einzeln zu identifizieren und zu sortieren.*

Das flowzytometrische Verfahren ist im Hinblick auf die Trenngenauigkeit sehr zuverlässig und ermöglicht durch Reanalyse der Spermienproben unmittelbar nach dem Sortiervorgang eine genaue Voraussage der Geschlechtsverschiebung in der Nachkommenpopulation. Die Technik ist relativ einfach zu handhaben und lässt sich in bestehende Besamungsregime integrieren. Begrenzt wird das Verfahren durch die Notwendigkeit, jede Samenzelle einzeln zu identifizieren und zu sortieren. Technische Verbesserungen der flowzytometrischen Spermientrennung sind zwar zu erwarten und können evtl. die Sortierrate nochmals verdoppeln. Damit sind die physikalischen Grenzen aber erreicht. Änderungen im Besamungsregime, die auf eine deutliche Spermienreduzierung in der Besamungsdosis ausgerichtet sind, können diesen Nachteil teilweise auffangen. Positive Ergebnisse wurden über In-vitro-Produktionsverfahren mit gesextem Sperma und anschließendem Embryotransfer berichtet. Die erforderlichen Oozyten können unchirurgisch durch Follikelpunktion in fast jedem Reproduktionsstatus von Kälbern, Rindern und Kühen gewonnen werden, ohne das Reproduktionsverhalten der Spendertiere zu beeinflussen

2. *Es werden alternative Verfahren entwickelt, die keine individuelle Spermienanalyse erfordern.*

Zweifelsohne wäre es günstiger, ein Trennverfahren zu verwenden, dass eine Identifizierung der einzelnen Samenzellen überflüssig macht und es erlaubt, das gesamte Ejakulat geschlechtsspezifisch auftrennen. Dies setzt voraus, dass auf der Spermienoberfläche Strukturen vorhanden sind, die eindeutig geschlechtsspezifisch sind, nicht zwischen Samenspendern variieren und technische Lösungen der Identifizierung und Trennung zulassen. Geeignet wären hierfür geschlechtsspezifische Proteine auf der Spermienoberfläche, gegen die Antikörper produziert werden und die zur Ausfällung des nicht gewünschten Geschlechtes führen. Sollen nur Spermien für ein Nachkommengeschlecht verwendet werden, würde es ausreichen, ein Membranprotein zu finden, das nur auf einer Spermienart vorkommt. Soll für beide Geschlechtsmerkmale eine Auftrennung möglich sein, müssten zwei unterschiedliche Proteine vorhanden sein. Immunologische Untersuchungen, um derartige Oberflächenproteine eindeutig nachzuweisen und für eine sichere Trennung mittels monoklonaler Antikörper zu verwenden, hat es in der Vergangenheit mehrfach gegeben. Bis heute sind weder einsatzfähige Sortierverfahren, die auf immunologischen Prinzipien basieren, erfolgreich gewesen, noch sind Nachkommen mit prognostiziertem Geschlecht bislang hieraus geboren worden. Alle wissenschaftlichen Publikationen, bei denen Oberflächenproteine z. B. mittels hochsensibler 2D- Elektrophorese identifiziert wurden, haben bislang keinen geschlechtsspezifischen Unterschied erkennen lassen.

Andere Spermienmembranbestandteile wie Lipide oder Zucker sind am Bindungsgeschehen von Samenzelle und Eizelle beteiligt. Eine mögliche Geschlechtsspezifität dieser Strukturen wird derzeit im Rahmen eines gemeinsamen DFG-Projektes des Instituts für Tierzucht der FAL, des Instituts für Reproduktionsmedizin der Tierärztlichen Hochschule Hannover und der Universität Göttingen untersucht.

Ein anderer Ansatz bezieht sich auf die Beeinflussung der Geschwindigkeit von Samenzellen. Kürzlich wurde auf dem Chromosom 17 bei Mäusen ein geschlechtsspezifisches Gen gefunden, dass scheinbar die Geschwindigkeit von Samenzellen beeinflusst. Ob dieses Gen auch bei anderen Säugern vorhanden ist, ist nicht bekannt. Man müsste für die Beeinflussung der Spermiengeschwindigkeit allerdings zunächst ein transgenes Vatertier erstellen. Ob dessen Nachkommen züchterisch dann noch interessant sind, ist fraglich.

3. *Die Verschiebung des Geschlechtsverhältnisses erfolgt nicht mehr durch Spermienselektion*

Das Geschlechtsverhältnis kann auch unabhängig von einer Spermienselektion erfolgen, indem beispielsweise im Rahmen des Embryotransfers das Embryonengeschlecht molekulargenetisch bestimmt wird und nur die Embryonen übertragen

werden, die das gewünschte Geschlecht besitzen. Dieses Verfahren wird von den Besamungsstationen seit mehreren Jahren kommerziell angeboten, beinhaltet aber eine Reihe von ökonomischen und technischen Nachteilen.

Ein anderer Ansatz wäre die Erstellung transgener Tiere. Allerdings ist die fetale Entwicklung der Geschlechtsorgane und deren Funktion nicht monogen. Weibliche Mäuse, die für das sry-Gen transgen gemacht wurden, entwickelten zwar den männlichen Genitalapparat, blieben aber steril.

Durch Klonen ließen sich ebenfalls Nachkommen mit gewünschtem Geschlecht erstellen. Hierzu könnte man auf Embryonen zurückgreifen, die durch Auslösung einer Parthenogenese entstehen und daher nur weiblich sein können. Alternative wäre es auch möglich, somatische Zellen von weiblichen Spendertieren zu reprogrammieren und die Zellkerne zum Klonen zu nutzen. Diese Biotechniken stehen aber erst am Anfang der Entwicklung und es bleibt abzuwarten, ob mittelfristig deren Nutzung in der Rinderzucht durchsetzbar ist. Gegenwärtig wird eine Akzeptanz dieser Techniken eher fraglich eingeschätzt.

Nach heutigem Kenntnisstand kommt mittelfristig nur die flowzytometrische Spermientrennung für den Einsatz in der Rinderzucht in Frage. Gleichgültig, welche Technik letztendlich zur Anwendung kommt, aus ökonomischer und ökologischer Sicht ist eine Optimierung der Rinderzucht durch Auswahl des richtigen Geschlechts für den jeweiligen Produktionszweig geboten. Da die Entwicklungs- und Betriebskosten für die genannten Verfahren hoch sind, wäre eine intensivere Kooperation der Zuchtverbände und Besamungsstationen mit Forschungseinrichtungen, die die erforderliche Expertise besitzen, erstrebenswert.