

Die vorliegende Arbeit wurde im Rahmen eines Forschungsprojektes zur Produktion transgener Schafe mit dem Ziel, rekombinante humane Proteine mit pharmakologischer Wirkung aus der Milchdrüse des Schafes zu gewinnen, angefertigt.

Die Ziele dieser Arbeit bestanden zum einen darin, die bekannten Superovulationsschemata an die vorhandenen Schafrassen so anzupassen, daß mit großer Sicherheit für die Mikroinjektion benötigte Vorkernstadien zum gewünschten Zeitpunkt gewonnen werden konnten, und zum anderen in der Prüfung des Folltropins® auf seine Eignung für die Superovulation verschiedener Schafrassen.

Zunächst wurden die Spendertiere in drei verschiedenen Schemata superovuliert und die gewonnenen Eizellen anhand morphologischer Kriterien auf Befruchtung und Mikroinjektionstauglichkeit überprüft. In diesem Versuchsabschnitt erfolgte weiterhin die vergleichende Betrachtung der Superovulationsreaktionen nach Behandlung mit Folltropin® bzw. PMSG.

In einem zweiten Versuch wurde das Folltropin® bei verschiedenen Schafrassen zur wiederholten Superovulation und Zygotengewinnung eingesetzt. Die gewonnenen Zygoten wurden nach Mikroinjektion auf synchronisierte Empfängertiere übertragen. Des weiteren wurde der Effekt unterschiedlich stark ansteigender LH/FSH-Verhältnisse im Verlauf der letzten FSH-Applikationen auf die Superovulationsreaktion untersucht.

Für die Versuche standen insgesamt 97 Spender- und 130 Empfängertiere zur Verfügung.

Folgende Ergebnisse wurden erarbeitet:

1. Nach Gewinnung von 96 Eizellen 24 bis 26 Stunden nach einmaliger Bedeckung der Spendertiere (Superovulationsschema I) waren nur 10,4% der gewonnenen Eizellen befruchtet; von diesen befanden sich 30% im Zweizellstadium. Wenn die Eizellengewinnung 39,5 bis 41,5 Stunden nach zwei- bis dreimaliger Bedeckung der Spendertiere erfolgte, war sowohl der Anteil an befruchteten Eizellen als auch der an Zweizellstadien mit 42,9% bzw. 70,4% erhöht (Superovulationsschema II). Bei gleichem Anteil an befruchteten Eizellen mit 42,2% konnte im Superovulationsschema III, unter Beibehaltung der zwei- bis dreimaligen Bedeckung und erneuter Festlegung des Gewinnungszeitpunktes auf 24 bis 26 Stunden nach dem Decken, der Anteil der Zweizellstadien an den befruchteten Eizellen auf 19,1% gesenkt werden.

2. Nach Superovulationsbehandlung von Merinoschafen mit PMSG (1500 I.U.) oder Folltropin® (17 mg Gesamtdosis über 2,5 Tage: 4 - 4 - 4 - 2,5 - 2,5 mg) wurden in der Folltropin®-Gruppe signifikant mehr nicht ovulierte Follikel ( $2,5 \pm 3,1$ ) gefunden als in der mit PMSG behandelten Gruppe ( $0,3 \pm 0,7$ ). In der Anzahl der Gelbkörper und gewonnenen Eizellen konnten keine Differenzen zwischen PMSG und Folltropin® festgestellt werden. Durchschnittlich entwickelten sich  $7,7 \pm 4,2$  Gelbkörper, wobei  $6,6 \pm 3,6$  Eizellen gewonnen wurden, von denen  $40,1\% \pm 31,6\%$  befruchtet waren. Die Anzahl transfertauglicher Eizellen betrug  $1,4 \pm 1,4$  pro Spendertier.
3. Die Behandlung mit gestagenhaltigen Vaginalschwämmchen führte bei den Spendertieren in 82,1% der Fälle zu äußeren Brunstsymptomen 38 Stunden nach Entfernung der Schwämmchen. Nach der kombinierten Gestagenschwämmchen- und PMSG (600 I.U.)-Behandlung der Empfängertiere zeigten 86,5% der Tiere zeitgleich mit den Spendern Brunstsymptome.
4. Nach Superovulationsbehandlung der verschiedenen Rassen mit Folltropin® entwickelten sich durchschnittlich  $9,0 \pm 4,3$  Gelbkörper und  $2,8 \pm 3,3$  Follikel. Von der durchschnittlichen Gesamtzahl an gewonnenen Eizellen ( $8,0 \pm 4,5$ ) waren  $51,0\% \pm 38,6\%$  befruchtet. Die Anzahl transfertauglicher Eizellen betrug  $3,4 \pm 3,8$  pro Behandlung. Bei den Merinoschafen wurden signifikant mehr nicht ovulierte Follikel ( $4,7 \pm 4,7$ ) gefunden als bei den Kreuzungs- ( $2,5 \pm 3,0$ ) und Finnschafen ( $1,7 \pm 2,3$ ). Die Finnschafe zeigten mit  $95,3\% \pm 8,3\%$  eine signifikant höhere Eizellengewinnungsrate als die Merino- ( $81,8\% \pm 26,3\%$ ), Kreuzungs- ( $86,5\% \pm 18,7\%$ ) und Texelschafe ( $76,5\% \pm 22,1\%$ ). Dagegen war die Befruchtungsrates bei den Finnschafen ( $38,3\% \pm 36,6\%$ ) signifikant geringer als bei den übrigen Rassen (Merino:  $42,5\% \pm 45,3\%$ ; Kreuzung:  $64,4\% \pm 34,4\%$ ; Texel:  $65,5\% \pm 29,2\%$ ). Der Anteil transfertauglicher an den befruchteten Eizellen war bei den Kreuzungsschafen mit  $79,0\% \pm 34,9\%$  signifikant höher als bei den Merino- ( $41,5\% \pm 47,0\%$ ) und Finnschafen ( $47,0\% \pm 40,2\%$ ).
5. Nach Superovulationsbehandlung von Merinoschafen mit FSH-P (17 A.U. Gesamtdosis über 2,5 Tage: 6 - 3 - 3 - 3 - 2 A.U.) bei unterschiedlich stark ansteigenden LH/FSH-Verhältnissen während der letzten zwei Injektionen (Gruppe I: 143% bzw. 333%; Gruppe II: 286% bzw. 666%) wurden in Gruppe II signifikant mehr Gelbkörper ( $8,8 \pm 3,8$ ) und befruchtete Eizellen ( $3,1 \pm 2,5$ ) als in der Gruppe I ( $4,7 \pm 3,3$  bzw.  $1,5 \pm 1,4$ ) gefunden. Entsprechend war die Gesamtzahl der gefundenen Eizellen in Gruppe II signifikant größer ( $7,4 \pm 3,6$ ) als in der Gruppe I ( $3,8 \pm 2,5$ ). Die Zahl der als transfertauglich beurteilten Eizellen war in der Gruppe II ebenfalls signifikant höher ( $2,3 \pm 2,3$ ) als in der Gruppe I ( $1,2 \pm 1,1$ ).

6. Die wiederholte Superovulation und chirurgische Eizellengewinnung war in monatlichen Abständen bis zu dreimal bei ähnlichen Ovarreaktionen und Eizellengewinnungs- und Befruchtungsraten möglich.
7. Ein jahreszeitlicher Einfluß auf die ovarielle Reaktion nach Superovulationsbehandlung konnte bei den Merinoschafen nicht festgestellt werden. Im Behandlungszeitraum April 1990 bis März 1991 wurden durchschnittlich  $8,2 \pm 4,4$  Gelbkörper und  $2,7 \pm 3,7$  nicht ovulierte Follikel gezählt.
8. Im ersten Versuchsabschnitt wurden aufgrund der morphologischen Kriterien von 89 befruchteten Eizellen insgesamt 43,8% als transfertauglich beurteilt. Diese Eizellen waren aufgrund sichtbarer Vorkerne für die Mikroinjektion am besten geeignet. 16,9% der befruchteten Eizellen konnten anhand des Beurteilungsschemas nicht erfaßt werden und waren nur nach Anfärbung oder Kultivierung als befruchtet auszumachen. Die Zentrifugation von Eizellen erbrachte keine Verbesserung hinsichtlich der Erkennung der Vorkernstrukturen.  
Im zweiten Versuchsabschnitt wurden insgesamt 856 Eizellen gewonnen, von denen 50,8% befruchtet waren. Der Anteil an Zweizellstadien betrug 4,4% gegenüber 19,1% im ersten Versuch. Von den befruchteten Eizellen wurden insgesamt 79,5% als transfertauglich beurteilt. 6,7% der befruchteten Eizellen konnten anhand des Beurteilungsschemas nicht erfaßt werden.
9. Im zweiten Versuchsabschnitt wurden mit 325 mikroinjizierten Eizellen insgesamt 130 Transfers durchgeführt, von denen 76 (58,5%) zu Trächtigkeiten führten. Von insgesamt 124 geborenen Lämmern erwiesen sich 3 als transgen; zwei von ihnen waren Träger des Faktor VIII c DNA -  $\beta$ -Laktoglobulin - und eins Träger des Faktor VIII c DNA - Metallothionein I - Genkonstruktes. Damit entwickelten sich 0,9% der mikroinjizierten und übertragenen Eizellen zu transgenen Tieren.

Andreas Guzik:

Superovulation and zygote collection for gene transfer in various sheep breeds.

## 7 SUMMARY

The present study was accomplished within a research project aimed at the production of transgenic sheep to collect recombinant pharmaceutical human proteins e.g. the human blood clotting factor VIII c DNA (F VIII c DNA) from ovine milk.

The aims of this study were to develop superovulatory schedules for different sheep breeds and to collect pronuclear stages at a defined time. Furthermore, the FSH-preparation Folltropin® should be tested in its efficiency for the superovulation of different sheep breeds (Merino, Finnish Landrace, Crossbred: Finnish Landrace x German Blackface, Texel).

In the first trial donor ewes were superovulated in three different time schedules and the collected ova were examined by morphological criteria for fertilization and suitability for microinjection. Furthermore, the results of a superovulatory treatment with PMSG or Folltropin® were compared.

In the second trial Folltropin® was used for repeated superovulation and collection of ova in different sheep breeds. The collected ova were microinjected and transferred on synchronized recipients. Moreover, the influence of an increasing LH/FSH-relation in the last FSH-applications on the superovulatory response was examined.

A total of 97 donor ewes and 130 recipients was used for these experiments.

The following results were achieved:

1. In scheme I the donor ewes were mated to fertile rams only once and 24 to 26 hours later the oviducts were flushed. Only 10.4% (10) out of 96 ova were fertilized with three being two-cell stages. By collecting the ova 39.5 to 41.5 hours after up to three matings the percentage of both fertilized ova (42.9%) and two-cell stages (70.4%) was increased (scheme II). In scheme III the ewes were mated twice or three times and the oviducts were flushed 24 to 26 hours thereafter. The fertilization rate (42.2%) was similar to scheme II, and the percentage of two-cell stages was reduced (19.1%).
2. After treatment of Merino ewes with PMSG (1500 I.U.) or Folltropin® (a total of 17 mg, in 5 doses distributed over 2.5 days: 4 - 4 - 4 - 2.5 - 2.5 mg) a significantly higher number of non-ovulated follicles was found in the Folltropin®-group ( $2.5 \pm 3.1$ ) compared with the PMSG-group ( $0.3 \pm 0.7$ ). There was no difference in the number of corpora lutea and collected ova;  $7.7 \pm 4.2$  corpora lutea were induced and  $6.6 \pm 3.6$  ova were collected, of which  $40.1\% \pm 31.6\%$  were fertilized. The average number of transferable ova was  $1.4 \pm 1.4$ .

3. Treatment of the donors with intravaginal gestagen sponges led to oestrus behaviour in 82.1% 38 hours after sponge removal. After a combined treatment with intravaginal sponges and PMSG (600 I.U.) 86.5% of the recipients showed oestrus behaviour at the same time as the donor ewes.
4. After treatment of different sheep breeds with Folltropin® an average of  $9.0 \pm 4.3$  corpora lutea and  $2.8 \pm 3.3$  follicles was induced.  $51.0\% \pm 38.6\%$  of the average number of collected ova ( $8.0 \pm 4.5$ ) were fertilized;  $3.4 \pm 3.8$  ova were suitable for transfer. A significantly higher number of non-ovulated follicles was found in Merinos ( $4.7 \pm 4.7$ ) than in Crossbreds ( $2.5 \pm 3.0$ ) and Finnish Landrace ( $1.7 \pm 2.3$ ). The best recovery rate was obtained in Finnish Landrace ( $95.3\% \pm 8.3\%$ ), being significantly higher than that in Merinos ( $81.8\% \pm 26.3\%$ ), Crossbreds ( $86.5\% \pm 18.7\%$ ) and Texel-Sheep ( $76.5\% \pm 22.1\%$ ). But the fertilization rate was significantly lower in Finnish Landrace ( $38.3\% \pm 36.6\%$ ) than in the other breeds (Merino:  $42.5\% \pm 45.3\%$ ; Crossbred:  $64.4\% \pm 34.4\%$ ; Texel:  $65.5\% \pm 29.2\%$ ). In Crossbreds the percentage of transferable ova in relation to the total number of fertilized ova ( $79.0\% \pm 34.9\%$ ) was significantly higher than in Merinos ( $41.5\% \pm 47.0\%$ ) and Finnish Landrace ( $47.0\% \pm 40.2\%$ ).
5. Merinos were superovulated with FSH-P (a total of 17 A.U., in 5 doses distributed over 2.5 days: 6 - 3 - 3 - 3 - 2 A.U.) with different increasing LH/FSH-relations in the last two injections (group I: 143% resp. 333%; group II: 286% resp. 666%). A significantly higher number of corpora lutea ( $8.8 \pm 3.8$ ) and fertilized ova ( $3.1 \pm 2.5$ ) was found in Group II than in group I ( $4.7 \pm 3.3$  C.l.,  $1.5 \pm 1.4$  fertilized ova). The number of collected ova was significantly higher in group II ( $7.4 \pm 3.6$ ) than in group I ( $3.8 \pm 2.5$ ) as was the number of transferable ova (group I:  $1.2 \pm 1.1$ ; group II:  $2.3 \pm 2.3$ ).
6. Repeated superovulation and surgical zygote collection was possible in monthly intervals up to three times with similar ovulation-, recovery- and fertilization rates.
7. There was no seasonal influence on the results after superovulation treatment in Merinos. An average of  $8.2 \pm 4.4$  corpora lutea and  $2.7 \pm 3.7$  non-ovulated follicles was induced in the period of April 1990 to March 1991.
8. The morphological criteria to classify the collected ova were the presence of pronuclei, polar bodies in the perivitelline space and spermatozoa in the zona pellucida, with pronuclei being the most important criterion. In the first trial a total of 43.8% of the fertilized ova (89) was classified as transferable. Due to their visible pronuclei these ova were most suitable for microinjection. 16.9% of the fertilized ova could not be identified correctly based on morphological evaluation, only after staining or cultivation.

Centrifugation did not improve the visibility of nuclear structures. In the second trial a total of 856 ova was collected with 50.8% being fertilized; 4.4% were two-cell stages. A total of 79.5% of the fertilized ova (435) was classified as transferable and 6.7% of the fertilized ova could not be identified based on morphological evaluation.

9. In the second trial a total of 130 transfers using 325 microinjected ova to 120 recipients led to 76 (58.5%) pregnancies. Totally 124 lambs were born and three were found to be transgenic. I.e. 0.9% of the microinjected and transferred ova developed to transgenic lambs, harbouring the F VIII c DNA either under the control of the Metallothionein (MT I) or  $\beta$ -Lactoglobulin ( $\beta$ -Lac) promotor.