

Aus dem Institut für Anatomie und Zellbiologie.
an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
(Direktor: Prof. Dr. med. Dr. agr. Bernd Fischer)



und aus der Universität Göttingen
Sektion Embryologie
(Leiter: Prof. Dr. med. Christoph Viebahn)

**Mitochondriale Differenzierung als Entwicklungsparameter in normalen,
geklonten und uniparentalen Kaninchenembryonen am Beispiel des
keimzellspezifischen mitochondrialen Markers PG2**

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Medizin (Dr. med.)

vorgelegt
der Medizinischen Fakultät
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Andreas Weckelmann

geboren am 03.02.1978 in Haan

Gutachter:

Prof. Dr. med. Christoph Viebahn

Prof. Dr. rer. nat. habil. Thomas Hollemann

Prof. Dr. med. Martin Bergmann

Eröffnung des Promotionsverfahrens: 01.02.2005

Datum der Verteidigung: 12.07.2005

urn:nbn:de:gbv:3-000008914

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000008914>]

Wir haben an Christus Anteil bekommen, wenn wir die Zuversicht vom Anfang bis zum Ende festhalten.

Hebräer 3,14

Kurzreferat

Die vorliegende Arbeit soll die Bedeutung biochemischer Differenzierung und zytoplasmatischer Verteilung von Mitochondrien für die frühe embryonale Entwicklung im Modellorganismus Kaninchen untersuchen. Insbesondere soll die frühe Entwicklung von Embryonen untersucht werden, die durch Kerntransfer (durch sog. reproduktive Klonierung) erzeugt wurden, um eine Methode zu entwickeln, die eine frühzeitige Beurteilung der Entwicklungsschritte klonierter Embryonen erlaubt. Hierzu wurden natürlich gezeugte, im Muttertier oder in vitro weiterentwickelte Embryonen mit solchen Embryonen verglichen, die mit Spenderkernen aus fetalen Fibroblasten, Blastomeren oder adulten Cumuluszellen erzeugt wurden und sich dann in vitro weiterentwickelt haben. Als Parameter für die biochemische Differenzierung der Mitochondrien und für die frühzeitige Beurteilung des Entwicklungsstatus der Embryonen wurden 3 monoklonale Antikörper eingesetzt: Der gegen ein keimzellspezifisches mitochondriales Epitop gerichtete Antikörper PG2 und die Antikörper MTC02 oder CoxIV, die gegen konstitutionelle mitochondriale Epitope in allen Zellen des Körpers gerichtet sind. Nach immunhistochemischen Doppelfärbungen an whole-mount-Präparaten wurden Reaktionsintensität, Reaktionsverteilung und das subzelluläre Reaktionsmuster der Antikörper fluoreszenzmikroskopisch verglichen. In normalen Embryonen fiel zwischen dem 4- und 16- Stadium im Vergleich zum granulären MTC02-Muster ein überwiegend diffuses PG2-Reaktionsmuster auf, das im Gegensatz zum granulären PG2-Muster in anderen Stadien stand und deshalb mit dem Zeitpunkt des Wechsels von maternaler zu selbständiger zygotischer Transkriptionsaktivität (die sog. maternal-to-zygotic-transition = MZT) - beim Kaninchen etwa im 4-Zellstadium - in Verbindung gebracht werden konnte. Um diese Korrelation in zukünftigen Untersuchungen näher analysieren zu können, wurden daraufhin Versuchsprotokolle für den Einsatz der Transkriptioninhibitoren α -Amanitin und Actinomycin-D, die die zygotische Transkription unterbinden, und für die Untersuchung uniparentalen (parthenogenetischen) Embryonen, bei denen ausschließlich maternale Gene zum Einsatz kommen, entwickelt. Für einen bisher unbekanntes, in frühen Stadien normaler Embryonen auftretenden Randsaum PG2-negativer Mitochondrien konnte kein physiologisches Korrelat gefunden werden. Klonierte Embryonen zeigten in frühen Stadien mit allen 3 Antikörpern im wesentlichen schwächere, inhomogenere und diffusere Färbungen als normale Embryonen, und erst ab dem Morulastadium ähnliche Färbungen wie bei normalen Embryonen. Offensichtliche Korrelationen zwischen immunhistochemischen Färbecharakteristika und der Herkunft der Kernspenderzellen wurden nicht gefunden. Die verwendeten Antikörper, insbesondere PG2, erwiesen sich damit als sensible Marker mitochondrialer Dynamik in der normalen frühen Embryonalentwicklung und bestätigten die starke Variabilität klonierter Embryonen bereits in der Frühphase ihrer Entwicklung.

Weckelmann, Andreas: Mitochondriale Differenzierung als Entwicklungsparameter in normalen, geklonten, und uniparentalen Kaninchenembryonen am Beispiel des keimzellspezifischen mitochondrialen Markers PG2

Halle, Univ., Med. Fak., Diss., 80 Seiten, 2005

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Die normale embryonale Frühentwicklung des Säugers.....	2
1.1.1 Morphologie	2
1.1.2 Nukleäre Vorgänge	3
1.1.3 Zytoplasmatische Vorgänge.....	6
1.2 Reproduktives Klonieren.....	9
1.3 Nukleäre Reprogrammierung	10
1.4 Das PG2-Epitop, ein mitochondrialer Marker der Keimzellen.....	13
1.5 Zielstellung der Arbeit	14
2. Material und Methoden	15
2.1 Chemikalien, Medien, Hormone und technische Geräte.....	15
2.1.1 Chemikalien	15
2.1.2. Medien.....	16
2.1.3. Enzyme, Hormone, Medikamente.....	17
2.1.4 Antikörper	17
2.1.5 Verbrauchsmaterial	17
2.1.6. Geräte und Software.....	18
2.2 Gewebegewinnung und –bearbeitung	18
2.2.1 Gewinnung und Fixierung der Embryonen für die Immunhistochemie	18
2.2.2 Präparation der Embryonen.....	18
2.2.3 In vitro Kultivierung frühembryonaler Stadien.....	19
2.2.4 Gewinnung und Kultivierung von Kernspenderzellen für den Kerntransfer	20
2.2.5 Kerntransfer und Aktivierung der Eizelle	21
2.3 Färbung, Behandlungen der Embryonen und Auswertung	22
2.3.1 Protokoll für die Immunhistochemie.....	22
2.3.2 Inhibition der zygotischen Transkription durch α -Amanitin und Actinomycin-D	23
2.3.3 Inkubation mit Tyrode´s Säure und Pronase zur enzymatischen Entfernung der Zona Pellucida.....	23
2.3.4 Mikroskopie der Färbungen	24
3. Ergebnisse	25
3.1 Embryonen nach natürlicher Befruchtung und Entwicklung in vivo.....	26
3.2 Embryonen nach natürlicher Befruchtung und Entwicklung in vitro	28
3.2.1 Embryonen mit Kultivierungsbeginn 24h p.c.	28
3.2.2 Embryonen mit Kultivierungsbeginn 19h p.c.	32
3.3 Embryonen nach Kerntransfer	34
3.3.1 Kerntransfer mit Blastomeren des 64-Zell-Stadiums.....	34
3.3.2 Kerntransfer mit fetalen Fibroblasten	36
3.3.3 Kerntransfer mit maternalen Cumuluszellen.....	39
3.3.4 Parthenogenetische Embryonen im Morulastadium	41
3.4 Embryonen nach Behandlung mit Transkriptionsinhibitoren	41
3.4.1 α -Amanitin-Behandlung.....	41
3.4.2 Actinomycin-D-Behandlung	42
4. Diskussion	43
4.1 Methodik	44
4.1.1 Gewebearbeitung, Immunhistochemie, Modellorganismus	44
4.1.2 Transkriptionsinhibitoren	47

4.1.3 Kerntransfer.....	48
4.2 Funktionelle Aspekte im Vergleich der normalen und künstlichen embryonalen Entwicklung	48
4.2.1 Entwicklung in vitro mit Kultivierungsbeginn 24h p.c. oder 19h p.c. im Vergleich zur Entwicklung in vivo	49
4.2.2 Entwicklungspotenz verschiedener Klone und ihre Beurteilung nach PG2 immunhistochemischer Färbung	53
4.2.3 Entwicklungspotenz parthenogenetischer Embryonen	58
4.2.4 Die Rolle von Mitochondrien in der Reprogrammierung	59
4.3 Einblicke in natürliche embryonale Entwicklung	60
5. Literaturverzeichnis.....	62
6. Anlage	69
7. Thesen	79

1. Einleitung

Mit der erfolgreichen Klonierung des Schafes „Dolly“ (Wilmut, I. et al., 1997) haben sich grundsätzlich neue Möglichkeiten für die Untersuchung der frühesten embryonalen Entwicklungsschritte, und aus dem Blickwinkel der Biotechnologie, auch für die Reproduktion von Lebewesen durch Klonierung ergeben (Solter, D., 2000; Shi, W., Zakhartchenko, V. et al., 2003). Niedrige Schwangerschaftsraten und gehäufte Fehlbildungen nach der Geburt machen jedoch deutlich, dass die bei der Klonierung angewandte Technik schwer kontrollierbaren Bedingungen unterliegt und die entscheidenden Regulationsmechanismen der embryonalen Frühentwicklung noch unbekannt sind (Sutovsky, P. et Prather, R.S., 2004). Um die embryonale Frühentwicklung besser zu verstehen, aber auch um die Technik des Klonierens berechenbarer zu machen, ist es nötig, die entsprechenden Versuchsbedingungen zu optimieren. Dabei fehlen jedoch sogenannte zeitnahe Parameter, d.h. Parameter, die den Erfolg des Klonierungsverfahrens frühzeitiger anzeigen würden als es die diagnostizierte Schwangerschaft oder etwa ausgebliebene Fehlbildungen zum Zeitpunkt der Geburt ermöglichen. Entscheidend für den erfolgreichen Ablauf der embryonalen Frühentwicklung ist der Zustand und das Zusammenspiel der beiden wesentlichen morphologisch unterscheidbaren Komponenten des frühen Embryos: Das ist einerseits der Zellkern (Nukleus), der in der normalen Entwicklung aus weiblichem und männlichem Vorkern zusammengefügt, bei der Klonierung jedoch künstlich übertragen und „reprogrammiert“ wird, und andererseits das Zytoplasma der Eizelle mit seinen zahlreichen Organellen, dem Zytoskelett und den gelösten Bestandteilen, die bei den ersten Entwicklungsschritten eine wichtige aktive Rolle spielen. Unter diesen extranukleären Komponenten der Zelle, die für die Steuerung des embryonalen Zellkernes, und im Fall der Klonierung für die Reprogrammierung des eingeführten Zellkernes essentiell sind, haben die Mitochondrien eine Sonderstellung. Sie sind Lieferant der im Stoffwechsel ubiquitär benötigten energiehaltigen Phosphate (z.B. Adenosintriphosphat = ATP) aber gleichzeitig auch funktionell eingebunden in die Regulation übergeordneter zellulärer Abläufe, wie z.B. des programmierten Zelltodes (Apoptose) (Kroemer, G. et Reed, J.C., 2000). Die Rolle der Mitochondrien im Zusammenspiel zwischen Kern und Zytoplasma bei den ersten Entwicklungsschritten ist vergleichsweise wenig untersucht. Auf der Suche nach neuen zeitnahen Parametern für die Frühentwicklung beschreibt die vorliegende Arbeit deshalb biochemische Veränderungen der Mitochondrien während der embryonalen Frühentwicklung. Dabei soll die Entwicklung nach natürlicher Befruchtung und nach Kerntransfer beim Kaninchen, einem der führenden Modellorganismen für die Erforschung und Etablierung der künstlichen Reproduktionstechniken (Blandau, R. J., 1980; Zheng, Y. L. et al., 2004), verglichen werden.

1.1 Die normale embryonale Frühentwicklung des Säugers

1.1.1 Morphologie

Durch den Furchungsprozess wird die vergleichsweise große Zytoplasmamasse der befruchteten Eizelle in kleinere Abschnitte „zerlegt“, wodurch neue Zellen entstehen, die Blastomeren, auch Furchungskugeln oder Furchungszellen genannt werden (s. Abb.1a). Jede dieser Zellen erhält während der Furchung ihren Kern durch mitotische Teilung, d.h. zunächst durch Teilung eines Kern-ähnlichen Gebildes, das aus dem weiblichen und männlichen Vorkern in der sog. Syngamie hervorgegangen ist (und zumindest beim Säuger keine Kernmembran hat) und danach durch die Teilungen der entstandenen Tochterkerne. Während dieses numerischen Wachstums (d.h. ausschließliche Vermehrung der Zellzahl) vergrößert sich der Umfang des Embryos nicht (s. Abb. 1a). Als Resultat der Teilungen entsteht mit dem 32-Zell Stadium ein solider, maulbeerförmiger Zellhaufen, die Morula (s. Abb.1a). Sie ist umgeben von einer dünnen Schicht extrazellulärer Matrix, der Zona Pellucida, die eine Art Schutzkokon um den Embryo herum bildet und auf die während der Wanderung durch die Tuba uterina eine mukoide schwefelsäureesterreiche Proteinschicht (auch als Mukolemm bezeichnet) aufgelagert wird (Leiser, R. et Denker, H.W., 1988).

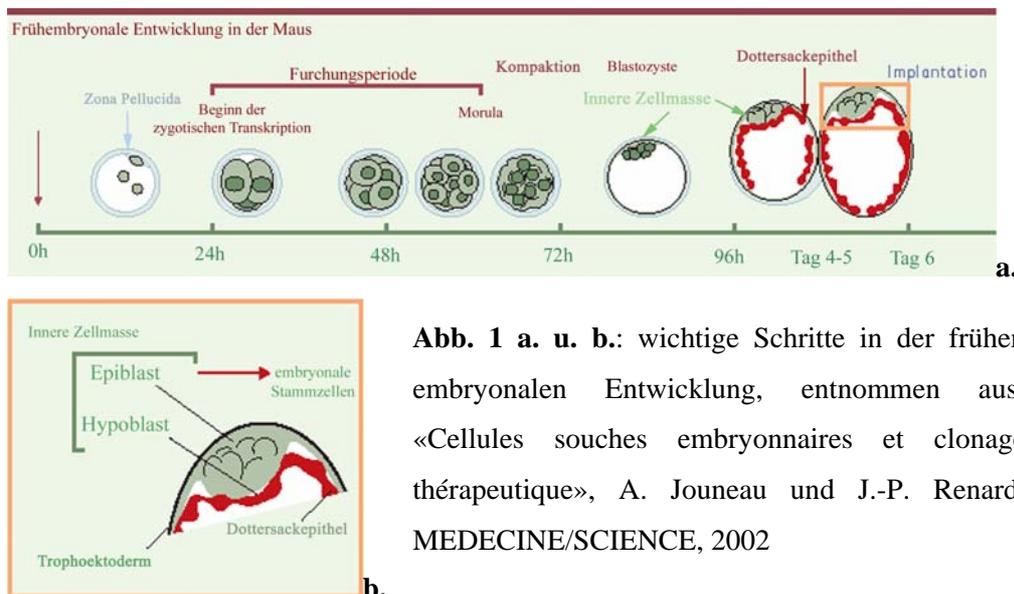


Abb. 1 a. u. b.: wichtige Schritte in der frühen embryonalen Entwicklung, entnommen aus: «Cellules souches embryonnaires et clonage thérapeutique», A. Jouneau und J.-P. Renard, MEDECINE/SCIENCE, 2002

Aus der Morula entsteht nach einer weiteren Zellteilungsrunde die Blastozyste (s. Abb.1a), ein blasenähnliches Gebilde, das die Unterscheidung zwischen zwei spezialisierten Geweben zulässt, dem (extraembryonalen) Trophoblast und dem (embryonalen) Embryoblast. Das embryonale Gewebe erscheint zu Beginn des Blastozystenstadiums als solider Zellhaufen, der der Wand des Trophoblasten von innen anliegt (s. Abb.1a). Diese Lage resultiert aus charakteristischen Veränderungen in der zellulären Organisation während des Morulastadiums: Die Morulazellen nehmen eine polare Struktur an und ordnen ihre Oberflächenproteine in der Weise, dass die interzelluläre Adhäsion in

verschiedenen Bereichen der Zelloberfläche erhöht wird. Dadurch gehen die äußeren Zellen untereinander funktionelle Verbindungen ein, flachen sich ab und formen den Trophoblasten, der dann für die Nidation und den Stoffaustausch zwischen Mutter und Keim verantwortlich ist (s. Abb.1b). Durch diese Kontaktaufnahme der äußeren Zellen und die Bildung eines flüssigkeitsgefüllten Raumes zwischen den inneren Zellen der Morula, grenzt sich im Inneren des Embryos eine Zellpopulation ab, die zunächst undifferenziert bleibt und Embryoblast oder auch „innere Zellmasse“ genannt wird. Durch die Bildung der inneren Zellmasse wird eine Unterscheidung des sich entwickelnden Gewebes in embryonale (Embryoblast) und extraembryonale Gewebeabschnitte (Trophoblast) möglich. Trophoblast und Embryoblast liegen an einer Seite des Embryos eng aneinander und sind an der anderen durch die Flüssigkeitseinlagerung von einander getrennt. In diesem Stadium nennt man den Embryo Blastozyste und den flüssigkeitsgefüllten Raum Blastozystenhöhle. In der inneren Zellmasse bilden sich zwei unterschiedliche Zelllinien: Die eine bleibt in Kontakt mit der Blastozystenhöhle und bildet die Schicht des sogenannten Hypoblasten (bei der Maus auch primitives oder viszerales Endoderm genannt, s. Abb. 1b). Dieser differenziert sich am Rand des Embryoblasten in das Dottersackepithel (auch parietales Endoderm genannt), das die innere Wand des Trophoblasten (auch Trophoektoderm genannt) auskleidet. Die andere Linie bildet die Schicht des sogenannten Epiblasten (s. Abb.1b) und besteht aus einigen Dutzend Zellen, die weiterhin undifferenziert erscheinen. Diese Zellen werden in der weiteren Entwicklung alle Zellen des eigentlichen embryonalen Körpers hervorbringen und können - in Kultur gebracht - unter Konditionen, die ihre Teilung begünstigen und ihre Differenzierung verhindern, pluripotente embryonale Stammzelllinien liefern (Beddington, R. S. et Robertson, E. J., 1989; Edwards, R. G., 2001) (s. Abb.1b). Im nächsten Schritt dehnt sich das Innere der Blastozyste durch weitere Flüssigkeitsaufnahme stark aus und leitet damit das Herausschlüpfen des Embryos aus der Zona pellucida und die darauf folgende Einnistung in die Gebärmutter ein.

1.1.2 Nukleäre Vorgänge

Die (diploide) Zygote des Säugerembryos entsteht mit der Vereinigung der elterlichen Genome (Syngamie) nach der Auflösung der Pronukleus-Hüllen. Im Gegensatz zur maternalen DNA erreicht die paternale DNA die entstehende Zygote in einer eher kristallinen Struktur (Haaf, T., 2001). Für die normale Fertilisation ist es essentiell, dass das spermatoide Chromatin durch Protamine stark kompaktiert ist und eine sog. nucleoprotamine Struktur besitzt (Steeger, K., 1999), während das Chromatin der Eizelle in der Metaphase II verharrt. Die kristalline Form des paternalen Genoms wird u.a. durch Modifizierung mit Methylcytosinen erreicht, die Gene gezielt inaktivieren können (Haaf, T., 2001). Diese Methylierung der Cytosine - kurz DNA-Methylierung genannt - ist eine der am besten erforschten DNA-Modifikationen in der frühen embryonalen Entwicklung. Solche Modifikationen der DNA, die durch ursprünglich zytoplasmatische Faktoren (im Falle der Methylierung durch Methylasen) bewirkt werden, werden seit einigen Jahren als epigenetische Veränderungen bezeichnet

(Reik, W. et al., 2001). In Säugern findet die Methylierung der DNA hauptsächlich am symmetrischen Dinukleotid CpG statt. Diese symmetrische Methylierung und die Entdeckung der DNA-Methyltransferase lassen einen Mechanismus vermuten, durch den spezifische Methylierungsmuster im Genom aufrecht erhalten werden können. Muster, die im Genom zu bestimmten Zeitpunkten vorhanden sind, könnten durch diese Methyltransferase aufrecht erhalten werden und so in Nachkommen einer Vorläuferzelle zu vorherbestimmter Genexpression während der Entwicklung führen. Danach könnte spezifische Demethylierung in unterschiedlichen Geweben weitere erforderlichen Veränderungen der Genexpression bewirken (Reik, W. et al., 2001). In somatischen Zellen wird der DNA-Methylierungsstatus während DNA - Replikation und Zellteilung stabil aufrechterhalten (Holliday, R. 1987). Während der Embryogenese jedoch ändert sich das DNA-Methylierungsmuster dramatisch und eine signifikante genomweite Demethylierung tritt auf (Monk, M. et al., 1987; Kafri, T. et al., 1992).

Eine Hauptfunktion von Chromatin- und DNA-Methylierung in einer Säugerzelle ist die stetige Repression von Genen, auch als „Imprinting“ bekannt. Imprinting spiegelt dabei Allel-spezifische Aktivierungsmuster wider, die abhängig davon sind, ob sie maternaler oder paternaler Herkunft sind (Kikyo, N. et Wolffe, A.P., 2000). Unter Imprinting wird also ein Vorgang verstanden, der bestimmt, ob ein Gen aus dem maternalen oder paternalen Erbgut transkribiert wird. Die Expression von „imprinted genes“ wird durch eltern-spezifische Methylierungsmarker, die während der Gametogenese etabliert werden, kontrolliert. Das genetisch inaktivierte Chromatin der hochdifferenzierten Spermatozoen und Eizellen muss remodelliert werden, damit ein totipotenter Status im frühen Embryo erreicht werden kann, d.h. es müssen die differenzierten Einflüsse der Gameten entfernt werden. Ein wichtiger Schritt für die Etablierung eines neuen Entwicklungsprogramms in der normalen diploiden (aus einem väterlichen und einem mütterlichen Chromosomensatz bestehenden) Zygote ist also die aktive Ausschaltung des väterlichen und mütterlichen Imprintingmusters.

Das Zusammenkommen der elterlichen DNA während der Syngamie bedeutet noch nicht, dass das neu gefügte zygotische Genom aktiv wird. Vielmehr wird die Aktivierung des Genoms während der Frühentwicklung in einem weiteren Schritt genau kontrolliert. Dieser Vorgang ist unter anderem abhängig von epigenetischen Modifikationen des Genoms: (1.) der genomischen Methylierung, (2.) der Ansammlung von Histonen und Histonvarianten (Proteine, die die DNA in Nukleosomen als Grundeinheit der Chromosomen packen) und (3.) der Remodellierung anderer Chromatin-assoziiierter Proteine, wie sog. Linker-Histone, Polycombgruppen (Proteine, die Transkription bestimmter Gene unterdrücken), Kernaufbauproteine und Transkriptionsfaktoren (Latham, K.E., 1999). Die Fähigkeit zu einer basalen Transkriptionsaktivität ist erstmals vor Ende des Einzellstadiums erreicht (Schultz, R.M., 1993; Bouniol, C. et al., 1995; Aoiki, F. et al., 1997) und geht einher mit einem Anstieg der Konzentration von Transkriptionsfaktoren im Kern (Worrad, D.M. et al., 1994). Daher steht die erste

Entwicklungsphase des Säugerembryos fast ausschließlich unter der Kontrolle maternaler Faktoren, die im Zytoplasma der Eizelle untergebracht sind (s.u. „zytoplasmatische Vorgänge“). Diese Phase der ausschließlichen maternalen Kontrolle der Entwicklung endet in der „maternal to zygotic transition“ (MZT).

Erst während des Zweizellstadiums erfolgt die Kopplung von Transkription an Translation (Nothias, J.Y. et al, 1996). Dieser Aufschub scheint wichtig zu sein für das Remodelling der parentalen Chromosomen, das einen Schutz vor akzidentieller und unreifer zygotischer Expression darstellt (Wiekowski, M. et al. 1997). Zu Beginn liegt das parentale Chromatin in einer offenen Konfiguration vor, wodurch sich Transkriptionskomplexe bilden können, die keiner Aktivatoren (enhancer) bedürfen (Majumder, S. et al., 1993). Der Kompetenzerwerb für eine langandauernde Aktivierung der Promotoren durch Enhancer hängt von der ersten DNA Replikation ab (Forlani, G. et al., 1998) und entwickelt sich vom Zweizellstadium an. Diese Ereignisse gehen einer überwiegenden zygotischen Transkriptionsaktivität voraus, die dann spezifisch für die weitere Entwicklung benötigt wird (Renard, J.-P., 1998). Der Übergang von maternaler zu zygotischer Kontrolle ist von maternal vererbten Faktoren abhängig, die zum Ziel haben, spermatoide Erbsubstanz und Chromatin in für Transkriptionsfaktoren zugängliche transkriptionsfähige Matrix zu konvertieren (Nothias, J.Y. et al., 1995).

Die Aktivität des zygotischen Genoms für die weitere embryonale Entwicklung wird bei verschiedenen Spezies zu unterschiedlichen Zeitpunkten essentiell (spezifische „zygotische Uhr“, Wiekowski, M. et al., 1991; Schultz, R.M., 1993): Bei der Maus bereits nach der ersten Zellteilung (im 2-Zellstadium), bei den meisten anderen Säugetieren jedoch erst nach 2 bis 4 Teilungen (8-16-Zellstadium beim Menschen, 16 - 32-Zellstadium beim Kaninchen) (Telford, N. A. et al., 1990). Im Kaninchen wurde RNA-Synthese bereits im 4-Zellstadium nachgewiesen (Kanka J. et al., 1993) und nach neueren Untersuchungen (Pacheco-Trigon, S. et al., 2002; V. Duranthon, pers. Mitteilung) können in Anwesenheit von α -Amanitin als Transkriptioninhibitor bis zu drei Furchungsteilungen stattfinden, so dass man annehmen kann, dass die MZT dieser Spezies im 4 - 8-Zellstadium stattfindet, also nach den ersten drei Furchungsteilungen.

Die zunehmende zygotische Genaktivität während des 2-Zellstadiums der Maus (Schultz, R.M., 1993) wird begleitet von einer allmählichen passiven Demethylierung des maternalen Genoms (durch "Verdünnung" bei der DNA-Replikation), während die paternale DNA nach der Befruchtung innerhalb von Stunden aktiv durch eine mutmaßliche Demethylase in der Eizelle demethyliert wird (Haaf, T., 2001). Im Blastozystenstadium ist dann das embryonale Genom hypomethyliert und durchläuft im Folgenden eine globale, von zytoplasmatischen Methylasen gesteuerte de novo

Methylierung, die in einem offensichtlich gleichmäßigen Methylierungsmuster auf beiden parental Allelen in der Gastrulation resultiert (Razin, A. et al., 1995; Monk, M., 1987).

1.1.3 Zytoplasmatische Vorgänge

Neben den nukleären Vorgängen sind zytoplasmatische Vorgänge ein entscheidender Faktor in der embryologischen Frühentwicklung. Die oben beschriebenen nukleären Aktivitäten, seien dies die Kompaktierung des väterlichen Genomes, die Vervollständigung der Meiose in der ovulierten Eizelle oder die Remodellierung der Kerne jeder Gamete in einen funktionellen männlichen und einen funktionellen weiblichen Vorkern („Pronukleus“, Perreault, S.D., 1992), werden durch zytoplasmatisch lokalisierte molekulare Kaskaden gesteuert, die mit der Aktivierung der Eizelle durch die Fusion von Eizelle und Spermium (Spermatozoon) ausgelöst werden.

Beispiele für zytoplasmatische Vorgänge spiegeln sich auch in der zytoplasmatischen Transkriptions- (s.o.) und RNA-Degradationsmaschinerie wider. Im Mausembryo z.B sind zum Zeitpunkt der MZT nur noch ca. 10% der maternalen Transkripte präsent (DeRenzo, C. et G. Seydoux, 2004), während im Kaninchenembryo die Menge der polyadenylierten maternalen mRNAs zwischen Fertilisation und MZT nicht degradiert wird (Henrion, G. et al., 1997). Ausserdem steuern Faktoren des umgebenden Zytoplasmas die weitere Entwicklung der Zygote, indem sie bestimmte Modifikationen der Kernaktivitäten einleiten (Gardner, R.L. et al., 2003). Die Eizelle steuert dabei die epigenetische Beeinflussung (z.B. Unterdrückung) der Kern-Aktivitäten insbesondere auch in der Weise, dass unterdrückte Einheiten der parental nukleären Genome aktiviert werden und ein Zustand der Pluripotenz und Totipotenz geschaffen wird (Kikyo, N. et Wolffe, A.P., 2000).

Während bei zahlreichen zytoplasmatisch lokalisierten, für die Modifizierung der Kerneigenschaften wichtigen molekularen Kaskaden, eine Funktion gut beschrieben ist, ist die Stellung von Mitochondrien als zytoplasmatischer Bestandteil in der frühen embryonalen Entwicklung noch relativ unklar. Sicher ist, dass sie spezifisch durch das mütterliche Genom vererbt werden, da spezielle Mechanismen dafür verantwortlich sind, die Beteiligung der Mitochondrien des Spermatozoons in der frühen embryonalen Entwicklung zu eliminieren (Cummins, J.M., 2002). Die meisten mitochondrialen Gene sind in den Kern transloziert worden und Kern- und Mitochondriengene haben sich gleichmäßig entwickelt. Diese Tatsache und die hohe Mutation in der verbliebenen mitochondrialen DNA resultierten in einer hohen Konkordanz zwischen den beiden DNA-Arten (Cummins, J.M., 2002). Abgesehen davon spielen Mitochondrien eine zentrale Rolle in der Alterung und vielen nicht-Mendel-abhängigen bioenergetischen und neurologischen Erkrankungen (Cummins, J.M., 2002).

Zytoplasmatische Faktoren, zu denen Mitochondrien eine enge Beziehung haben, sind in vielen Spezies entscheidend für die Kontinuität von Keimzellen (Eddy, E.M., 1975). So zeigen Mitochondrien während der Entwicklung von Keimzellen eine Assoziation mit spezifischen zytoplasmatischen Regionen (Nieuwkoop, P. et Sutasurya, L., 1979). Lange schon ist bekannt, dass in vielen Organismen die Keimzellentwicklung abhängig ist von spezialisierten Regionen im Zytoplasma des Embryos, dem sog. „germ plasm“. Diese zytoplasmatische Region oder Struktur besitzt große Ähnlichkeit bezüglich Morphologie und Ultrastruktur mit einer in Keimzellen von mehr als 80 Spezies mindestens acht unterschiedlicher Phyla anzutreffenden Region, die auch „nuage“ genannt wird (Eddy, E.M., 1975). Nuage ist elektronenmikroskopisch sichtbar als verdichtete, fibrinöse Organelle, die ohne von einer Membran umgeben zu sein, im perinukleären Zytoplasma lokalisiert und gewöhnlich mit Zusammenballungen von Mitochondrien (Saffman, E.E. und Lasko, P., 1999) assoziiert ist. Sie wird in allen Stadien der Keimzellen von der primordialen Keimzelle (PGC) im Embryo bis hin zur Gamete adulter Gonaden angetroffen und enthält RNA und Proteine (Saffman, E.E. et Lasko, P., 1999). Das Konzept des intrazellulären germ plasm als entscheidender Faktor der Keimzellentwicklung wurde in Insekten (Lehmann, R. et Ephrussi, A., 1994), Nematoden (Strome, S. et al., 1994), Amphibien (Robb, D.L. et al., 1996) und in *C. elegans* unter der Kontrolle des Kernproteins PIE-1 (Mello, C.C. et al., 1996; Seydoux, G. et al., 1996) beschrieben. In allen Fällen unterscheidet sich „germ plasm“ von „nuage“ durch die Anwesenheit spezialisierter Organellen, den „germinal granules“. Ebenso wie nuage sind diese nicht von einer Membran umgeben und elektronenmikroskopisch sichtbar als elektronendichte, fibröse Partikel. Sie sind angereichert mit Mitochondrien und enthalten viel RNA und Proteine. In Säugetieren allerdings wurde bisher weder germ plasm oder germinal granules noch ein Korrelat entdeckt (Buehr, M., 1997). Elektronendichte fibrogranuläre nuage-ähnliche Strukturen konnten nachgewiesen werden, aber ihre Bedeutung bleibt unbekannt (Eddy, E.M., 1975).

Der Verlauf der Keimzellreifung beeinflusst die Kapazität der Mitochondrien zur Vermehrung im Embryo (Jansen, R.P. et de Boer, K., 1998). In beiden Geschlechtern modifizieren Mitochondrien ihre Anzahl, Verteilung und Struktur während der Keimzellreifung (Motta, P.M. et al., 2000). Während paternale Mitochondrien stetig minimiert werden, werden maternale Mitochondrien aufrecht erhalten und vermehrt (Gyllenstein, U. et al., 1991). Zu Beginn der Meiose z.B. treten bedeutende Strukturveränderungen auf. Mitochondrien aus Spermien können anhand von Strukturelementen wie ihrer Cristae (Membranfaltung) von Mitochondrien aus Eizellen unterschieden werden (Sathanathan, A.H. et al., 2000). Die schrittweise Expression mitochondrialer Proteine begleitet Veränderungen der mitochondrialen Struktur. Vom Zeitpunkt der Befruchtung an wird der Embryo unter spezifisch regulierten Bedingungen von den Gameten mit Mitochondrien ausgestattet, deren Integrität entscheidend ist für die embryonale Entwicklung (Smith, L.C. und Alcivar, A.A., 1993). In Eizellen der Maus wird eine unterschiedliche Verteilung der Mitochondrien im Zytoplasma unreifer und reifer

Eizellen beobachtet (Calarco, P.G., 1995). Auch in Embryonen deren Entwicklung negativ beeinflusst wird, fällt im Vergleich zu Embryonen mit normaler Entwicklung eine inhomogene zytoplasmatische Verteilung auf (Muggleton-Harris, A.L. et Brown, J.J. 1988).

Im Zuge der in-vitro-Fertilisierung und Klonierung haben Untersuchungen über mitochondriale Heteroplasmie in Embryonen nach Transfer des Zytoplasmas einer Spendereizelle in eine Empfängereizelle eine Aufrechterhaltung sowohl der mitochondrialen Empfänger als auch der mitochondrialen Spender-DNA gezeigt (Barrit, J.A. et al., 2000; Barrit, J.A. et al., 2001; Brenner, C.A. et al., 2000; Evans M.J. et al., 1999; Sutovsky, P. et al., 1999). Dies belegt die Wichtigkeit der Integrität mitochondrialer Vererbung für die frühe embryonale Entwicklung nach der Befruchtung.

Ein anderer wichtiger Regulationsmechanismus der zellulären Entwicklung, in den Mitochondrien aktiv eingreifen, ist die Apoptose. Apoptose im Sinne eines programmierten Zelltodes ist ein entscheidender Bestandteil der embryonalen Entwicklung. Sowohl Organmetamorphose als auch Gewebehomöostase sind abhängig von einem reibungslosen Ablauf der Apoptose während der Embryogenese. Zwei Hauptwege der Apoptose in Säugetieren sind bisher gefunden worden, der Rezeptor-vermittelte (extrinsische) und der mitochondriale (intrinsische) Apoptoseweg. Letzterer wird durch die Freisetzung des Hämoproteins Cytochrom c aus den Mitochondrien (Mirkes, P.E., 2000) aktiviert, das die Aktivierung der Caspase-Kaskade (inklusive der Apaf-1-Kaskade) der Apoptose erleichtert. Caspasen sind Proteasen, die eine zur Apoptose führende Signalkaskade anstoßen (Mirkes, P.E., 2002). Ein entscheidender Schritt in der Apoptose ist die Konstitution der mitochondrialen Membranpermeabilisation (MMP), die von einer Vielzahl von Faktoren reguliert wird, inklusive der Proteine der Bcl-2/Bax-Familie (Onkogene oder Tumorsupressorgene, die die Apoptose modulieren), die mit sesshaften Proteinen der Mitochondrien interagieren. Eine große Anzahl von second-messengern können MMP induzieren. Verschiedene Proteine, die normalerweise auf die Mitochondrien begrenzt sind, werden in den extra-mitochondrialen Raum freigesetzt und nehmen an der suizidalen Membranpermeabilisation der Zelle teil. Eines dieser apoptogenetischen Proteinen ist der Apoptose-induzierende-Faktor (AIF), der einer der Haupteffektoren der Apoptose-Maschinerie zu sein scheint (Kroemer, G., 2001). Genetische Inaktivierung von AIF verhindert die erste Welle von Apoptose, die unersetzlich ist für die frühe embryonale Morphogenese (Kroemer, G., 2001). Es bestehen jedoch auch Mechanismen des regulierten Zelltodes, die unabhängig von mitochondrialer Steuerung sind (Mirkes, P.E., 2002), wie z.B. der Rezeptor-vermittelte Weg. Dieser Weg nimmt seinen Ausgang von Rezeptoren wie dem TNF-, dem FasL- oder dem Apo-3L-Rezeptor, die die Zellmembran besetzen und nach eigener Stimulierung die Apoptosekaskade im Zytoplasma in Gang setzen.

1.2 Reproduktives Klonieren

Reproduktives Klonen bedeutet die Vervielfältigung genetisch identischer Embryonen ohne das „Hilfsmittel“ Befruchtung. Die Geburt von Dolly im Jahre 1997 (Wilmut, I et al., 1997) stellte eine Revolution in der Technik des Klonierens dar, da es zum ersten Mal gelungen war, ein Tier aus der „Rekonstruktion“ einer Oozyte, der zuvor ihr Kern entnommen worden war, mit dem Kern einer adulten somatischen Zelle, zu erzeugen. Die Möglichkeit, mit dem Kern einer spezialisierten Zelle (z.B. einer Haut- oder Blutzelle) eine Zelle zu formen, die in der Lage ist, wieder in den Zustand der Totipotenz einzutreten - und somit sämtliche andere Gewebe formen zu können - wurde mit der Geburt von Dolly Realität.

Heute wird geklont, indem man einer zur Befruchtung bereiten Oozyte oder eines sich noch ganz am Anfang der embryonalen Entwicklung befindenden Eis das genetische Material durch Enukleierung entzieht und ersetzt durch das genetische Material einer Zelle, die zuvor einem Tier der Spezies, die kloniert werden soll, entnommen worden ist. Am Anfang wurde diese Technik bei Amphibien angewandt (Gurdon, J.B. et al., 1979), um mittlerweile auch zur gängigen Methode des Klonens von Säugetieren geworden zu sein (Solter, D., 2000) (s. 1.3). Die Fusion des Spenderkerns mit der Oozyte wird in den meisten Fällen durch einen kurzen elektrischen Impuls erreicht. Der Spenderkern kann aber auch direkt in das Zytoplasma injiziert werden. Der kurze elektrische Impuls trägt zur Aktivierung der Oozyte bei, die sich in einem Zustand nahe der Interphase des Zellteilungszyklus befindet. Befindet sich die Oozyte noch in der Metaphase II, ist die elektrische Stimulierung nicht ausreichend für die embryonale Entwicklung.

Außer der Qualität der Oozyte und der Technik der Stimulation spielt die Qualität der Spenderzelle eine entscheidende Rolle. Man nimmt entweder Zellen, die vorher kultiviert worden sind, oder entnimmt die Zellen direkt aus lebendem Gewebe. Als geeignet erwiesen haben sich fetale Fibroblasten sowie Zellen adulter Gewebe (Brustdrüse, Cumuluszellen), in denen verschiedene Entwicklungsstadien koexistieren. In einem Großteil der biologischen Gewebe findet man Zellen unterschiedlichen Entwicklungsgrades. Nach Dolly konnten auf gleiche Art geklonte Embryonen u.a. von Mäusen, Ziegen, Kühen, Rindern und Schweinen erzeugt werden (Renard, J.-P. et Vignon, X., 2001; Fulka, J. Jr. et Mrazek, M., 2004). Erst im Jahr 2001 gelang es am Institut National de la Recherche Agronomique (INRA) in Jouy-en-Josas, Frankreich, das erste Kaninchen lebend zur Welt zu bringen, das einem somatischen Kerntransfer entsprang (Chesné, P. et al., 2002). Gleichzeitig mit diesen Erfolgen musste man allerdings feststellen, dass die geklonten Tiere eine fetal und postnatal anormale Entwicklung zeigen. Zwar entwickeln sich ein bis zwei Drittel der mit somatischen Kernen geklonten Embryonen bis zur Blastozyste (Rideout, W.M. et al., 2001) (in vitro fertilisierte Embryonen erreichen im Vergleich dazu zu 60% dieses Stadium), aber nur 1-4% der geklonten

Embryonen erreichen eine abgeschlossene Embryogenese. Von Embryonen nach Kerntransfer mit embryonalen Stammzellen erreichen sogar nur 10-20% das Blastozystenstadium (Wakayama, T. et al., 1999; Wakayama T. et al., 1998; Eggan, K. et al., 2001). Allerdings entwickeln sich die Embryonen, die das Blastozystenstadium erreichen mit 10-20 fach höherer Effizienz bis zum Ende der Embryogenese als Embryonen nach Kerntransfer mit somatischen Spenderzellen (Rideout, W.M. et al., 2001).

Die hohe Sterblichkeitsrate wird begleitet von Plazentaanomalien und einer Spätsterblichkeit von 50% nach der Gestation oder postnatal. Anomalien wie respiratorischer Distress, Immundefizite und Kreislaufprobleme werden als häufigste Ursache neonataler Sterblichkeit angesehen (Wilmot, I. et al., 1997; Hill, J.R. et al., 1999; Young, L.E. et al., 1998). Postnatal stellt vor allem das sog. „large offspring syndrome“ mit hypertrophierten Organen ein Problem dar (Young, L.E. et al., 1998; De Sousa, P.A. et al., 2001). Es wird vermutet, dass auch scheinbar gesunde Neugeborene an Immundefizienz, Nieren- oder Gehirnanomalien leiden, die zum Tod in späteren Stadien führen (Lanza, R.P. et al., 2000; McCreath, K.J. et al., 2000). Die beobachteten Anomalitäten im Phänotyp von lebenden Klonen scheinen u.a. aus der kumulativen Dysregulation oder einer anormalen Expression verschiedener „imprinted“ Gene zu resultieren (Humpherys, D. et al., 2001; Humpherys, D. et al., 2002). Wachstumsfaktoren, die gegensätzlichen Einfluß auf das Wachstum haben können, könnten z.B. von solchen Genen kodiert werden (Tilghman, S.M., 1999; Constancia, M., 1998). Auch können diese Anomalitäten den Konditionen der in vitro Kultivierung entstammen, die der Transplantation in ein Muttertier vorangeht und während der sich evt. epigenetische Schäden ereignen können, oder aus undefinierten Parameter des Kerntransferprozedere selbst resultieren (Behboodi, E. et al., 1995, Renard, J.-P., 1998). Eine direkte Korrelation zwischen anormaler Expression eines „imprinted“ Gen und dem Grad der anormalen fetalen Überentwicklung („large offspring syndrom“) konnte bisher jedoch noch nicht bewiesen werden (Rideout, W.M. et al., 2001).

1.3 Nukleäre Reprogrammierung

Bei der natürlichen Befruchtung stehen der zytoplasmatischen Maschinerie, die die frühe Entwicklung während und nach der Befruchtung steuert, paternale und maternale Pronuclei gegenüber, die die Metaphase II der Meiose durchlaufen haben. In der Meiose findet eine sog. doppelte Zellteilung statt, während der die Anzahl der Chromosomen einer Zelle zweigeteilt wird und sich, im Falle der Oogenese, neben der Oozyte auch zwei Polkörperchen formen. Letztere beinhalten die überzähligen Chromosomen und werden während der weiteren Entwicklung eliminiert.

Im Gegensatz zu den Verhältnissen bei der natürlichen Befruchtung steht das Zytoplasma der aktivierten Eizelle beim reproduktiven Klonieren einem somatischen Zellkern gegenüber, dessen DNA

die Meiose schon vor langer Zeit (vor der embryonalen Entwicklung des Organismus, aus dem der Kern entnommen worden ist) durchlaufen hat. In dieser Situation ist die Remodellierung der nicht-meiotischen DNA die entscheidende Voraussetzung für das reproduktive Klonen von Embryonen, bei dem Zellkerne von adulten Tieren in aktivierte und enukleierte Eizellen übertragen werden (Wilmut, I. et al., 1997). Häufig beobachtet man ein Anschwellen des Kerns in seiner neuen Umgebung und eine Modifikation seiner Hülle (Renard, J.-P. und Vignon, X., 2001). Die Histone als für die Faltung der DNA verantwortliche Proteine werden deplaziert, die Transkription wird unterbrochen. Auf diese Weise konditionieren die Veränderungen im Spenderkern vor dem Transfer oder die Charakteristika des Spenderkerns selbst die Abläufe in der Entwicklung. Eine aktivierte Eizelle ist in der Lage, Chromatin heterologer Spermatiden und somatischer Kerne zu remodellieren (Gurdon, J.B. et al., 1979). Schon die Charakteristika der Oozyte, die aus oder Meiose der Keimzellen resultiert, sind essentiell für die nukleäre Reprogrammierung. Das Zytoplasma der empfangenden Eizelle muss dabei die Reprogrammierung eines Spenderkerns während der Klonierung dirigieren, wozu die Aktivität von Zellzyklusregulatoren, die die Remodellierung der Kernstruktur erleichtern (wie dem *Maturating promoter factor*), beansprucht wird (Fulka, J. Jr. et al., 1996) (s.u.). Für den Kerntransfer werden Oozyten im Stadium der Metaphase II der Meiose bevorzugt. Sie werden Ovarien von Tieren unterschiedlicher Herkunft und Alters entnommen und reifen *in vivo* oder nach Kultivierung *in vitro*, entsprechend der Spezies.

Angesichts der komplizierten zytoplasmatischen Regulationsmechanismen ist es verständlich, dass auch die E nukleierung der Eizelle Einfluß auf den Erfolg des Klonierens hat. Sie erfolgt durch Mikroaspiration des Chromosomenverbandes, der in der Metaphase gebündelt wird, und der Polkörperchen. Diese Manipulationen können das Zytoplasma modifizieren, indem sie es zu schnell aktivieren (Renard, J.-P. et Vignon, X., 2001). Eine solche Aktivierung entfacht einen Komplex von biochemischen Prozessen, die in die Befruchtung involvierte Ereignisse reproduziert.

Ein wichtiger weiterer Faktor für den Erfolg des Kerntransfers ist der *Maturating Promoting Factor* (MPF). MPF ist ein proteinformer Komplex, dessen Aktivität entscheidend beeinflusst wird durch die Schwingungen in der Konzentration des zytoplasmatischen Calciumspiegels (Renard, J.-P. und Vignon, X., 2001). Durch eine Kinase aktiviert induziert der MPF die Auflösung der Kernhülle und die Kondensation der Chromosomen. Er blockiert so die Oozyte auf dem Niveau der Metaphase. Wird seine Aktivität vermindert, entwickelt sich die Oozyte in einen der Interphase ähnlichen Zustand, was die weitere Entwicklung günstig beeinflusst (Renard, J.-P. et Vignon, X., 2001). Durch elektrische Impulse, die intrazelluläre Calciumströme aktivieren und so zur Inhibierung von MPF beitragen, wird nach dem Kerntransfer die Inhibierung der Phosphorylierung oder der Proteinsynthese angestrebt. So wird ein Anstieg von MPF und somit das Verharren der Oozyte in der Metaphase vermieden (Renard, J.-P. et Vignon, X., 2001). Eine chemische Inaktivierung des MPF ist noch nicht sicher als

ungefährlich für die weitere embryonale Entwicklung bewiesen (Renard, J.-P. und Vignon, X., 2001). Entwicklungsfehler könnten als Resultat der Exposition eines S-Phase-Kerns mit dem hohen Level an MPF-Aktivität einer Oozyte in der Metaphase II eintreten, da MPF den Zusammenbruch der Kernhülle und die prämatüre Chromatinkondensation induziert (Rideout, W.M. et al., 2001) (s.o.).

Neben den unterschiedlichen Charakteristika der Eizelle sind natürlich die nukleären und zytoplasmatischen Eigenschaften der Spenderzellen ausschlaggebend für den Erfolg der nukleären Reprogrammierung. Viele für die Entwicklung unerlässliche embryonale Gene sind in somatischen Zellen wie Fibroblasten und Cumuluszellen stumm und müssen nach der Implantation von Kerntransferembryonen aus somatischen Zellen reaktiviert werden. Die Unterschiede im initialen Überleben von Klonen sind wahrscheinlich auch Folge der Unterschiede im Zellzyklus der Spenderzellen, da nur Zellkerne im G0- oder G1-Stadium effizient genug erscheinen, die Entwicklung von Kerntransferembryonen bis zum Ende zu fördern, sich jedoch 60% der embryonalen Stammzellen in der S-Phase des Zellzyklus befinden. Embryonale Stammzellen exprimieren Gene wie Oct-3 und -4 (s.o.), die normalerweise in der Blastozyste aktiv und für die frühe Postimplantationsentwicklung essentiell sind (Nichols, J. et al., 1998). Falsche oder ungenügende Reprogrammierung dieser embryonalen Gene kann ein Grund für den Tod der meisten somatischen Klone sein. Im Gegensatz dazu überleben embryonale Stammzellklone die frühe Postimplantationsphase eben aufgrund dieser essentiellen embryonalen Gene, die in ihrem Fall schon im transferierten Zellkern der Spenderzelle aktiv sind und nicht mehr reaktiviert werden müssen. Die höhere Entwicklungseffizienz embryonaler Stammzellen nach dem Blastozystenstadium wirft die Frage auf, ob somatische Stammzellen, in einigen Punkten den embryonalen Stammzellen ähnlich, eine epigenetische Ausstattung besitzen, die eine leichtere Reprogrammierung erlaubt als mit voll differenzierten Zellen. Wenn dem so wäre, könnten die meisten (wenn auch nicht alle) Klone eher durch somatische Stammzellen, die in einer geringen Menge in jedem Gewebe präsent sind, hervorgerufen worden sein als durch ausdifferenzierte Zellen, die die Majorität der Zellen eines jeden Gewebes stellen. Da noch keine zellulären oder genetischen Marker benutzt wurden, die unzweifelhaft die aktuelle somatische Spenderzelle identifizieren, kann diese Möglichkeit nicht ausgeschlossen werden. Die Variabilitäten unter den verschiedenen Zellen, die als Spenderzellen in Frage kommen, verdeutlichen die Wichtigkeit der Plastizität des Kerns der Spenderzellen, die in den Differenzierungsweg eingebunden sind und erlauben die Vorstellung, Zellen aus leicht zugänglichem Gewebe (wie Haut oder Blut) erfolgreich zum Kerntransfer zu nutzen.

Auf der Grundlage der für die Reprogrammierung erforderlichen Eingriffe ergeben sich zusätzlich zu den unter 1.2 aufgeführten Erklärungsmöglichkeiten weitere wahrscheinliche Erklärungen für die Entwicklungsfehler von Kerntransferembryonen. Vor allem die Unfähigkeit, das epigenetische Profil des somatischen Spenderkerns so wie das einer befruchteten Zygote zu reprogrammieren, steht hier im

Vordergrund (Gurdon, J.B., 1999). Die Reprogrammierung in klonierten Embryonen erscheint in einem radikal anderen zellulären Kontext als dem der Gametogenese und ist beschränkt auf das kurze Intervall zwischen dem Transfer des Spenderkerns in die Oozyte und dem Zeitpunkt, zu dem die zygotische Transkription für die weitere Entwicklung notwendig wird. Der Spenderkern in der Oozyte muss auf seine zytoplasmatische Umgebung reagieren.

1.4 Das PG2-Epitop, ein mitochondrialer Marker der Keimzellen

Die vorliegende Arbeit setzt die Spezifität des monoklonalen Antikörpers PG2, der gegen das perimitochondriale Zytoplasma von Mitochondrien der Keimzellen im Kaninchen gerichtet ist (Viebahn, C. et al., 1998) ein, um Aussagen zur mitochondrialen Differenzierung während der Frühentwicklung von normalen und klonierten Embryonen zu treffen.

Das PG2 Epitop ist mitochondrien-assoziiert und elektronenmikroskopisch an der äußeren Mitochondrienmembran nachweisbar (Viebahn, C. et al., 1998). In Eizellen ist es nur in der ersten Woche postnatal vor Beginn der Meiose - wenn sich die Follikel bilden - kurzzeitig abwesend (Ricken, A. et Viebahn, C., 2002). In der Spermatogenese dagegen ist es nur in Spermatozyten erster Ordnung kurzzeitig anwesend, damit jedoch auch Meiose assoziiert (Ricken, A. et Viebahn, C., 2002). Vom Primitivstreifenstadium an ist PG2 in primordialen Keimzellen nachweisbar (Schäfer-Haas, A., 2000). Während späterer Stadien der embryonalen Entwicklung, bleibt das PG2-Epitop keimzellspezifisch und erscheint in Keimzellen beider Geschlechter. Es ist ausschließlich im Zytoplasma von Keimzellen zu finden und nicht in den sie umgebenden somatischen Zellen (Ricken, A. et Viebahn, C., 2002). PG2 ist also ein konstitutioneller Bestandteil der Mitochondrien in Keimzellen nahezu aller Entwicklungsstadien und im Zusammenhang mit Meiose dynamisch reguliert.

Frühere Versuche, charakteristische Marker der Keimbahn zu finden, mündeten in der Entdeckung der endogenen Alkalischen Phosphatase (AP) der Keimzellen (McKay, D.C. et al., 1953). Allerdings stellte sich heraus, dass nicht alle AP-positiven Zellen früher embryonaler Stadien Zellen der Keimbahn zuzuordnen waren (Yeom, Y.I., 1996). Andere Marker, die keimzell-spezifisch in Säugern zu sein schienen, wie z.B. PG-1 (Heath, J.K. 1978), SSEA-1 (Solter, D. et Knowels, B.B., 1978), EMA-1 und EMA-6 (Hahnel, A.M et Eddy, E.M., 1986) oder GCNA-1 (Enders, G.C. et May, J.J., 1994), sind speziell an der Zelloberfläche lokalisiert, einer bevorzugten Stelle für notwendige Zellerkennungsphänomene während der Zellwanderung. Allerdings werden diese Marker häufig auch auf anderen Zelloberflächen gefunden und sind scheinbar intrazellulären Mechanismen und Entscheidungen bezüglich der Zelllinie oder Wanderung und Proliferation untergeordnet.

1.5 Zielstellung der Arbeit

Die Zielstellung der Arbeit ist die Suche nach zeitnahen Parametern in der frühen embryonalen Entwicklung, die in der Klonierung von Säugetieren eine frühzeitige Überprüfung der Entwicklungspotenz zulassen. Mitochondrien stellen eine bisher unbekannte Größe in der embryonalen Entwicklung und der nukleären Reprogrammierung dar und bieten sich deshalb an, auf der Suche nach zeitnahen Parametern in ihrer Dynamik untersucht zu werden. Die Darstellung des PG2-Epitops im Vergleich zu konstitutionellen mitochondrialen Proteinen, von denen bisher nicht bekannt ist, dass sie dynamisch reguliert sind, soll zunächst neue Einblicke in die Vorgänge der normalen embryonalen Frühentwicklung erzielen.

Expressionsunterschiede von PG2 zwischen Embryopopulationen verschiedener Herkunft könnten die Entwicklungspotenz von Kaninchenembryonen *in vivo*, *in vitro*, nach Kerntransfer mit Kernen aus fetalen Fibroblasten, Cumuluszellen und Blastomeren sowie uniparentaler Embryonen widerspiegeln. PG2 als zuverlässiger Marker für die Entwicklungspotenz schon in frühen Stadien der embryonalen Entwicklung soll in diesem Kontext als Indikator der Effizienz unterschiedlicher Spenderkerne (und in Zukunft auch unterschiedlicher Klonierungsprotokolle) eingeführt werden.

Besondere Beachtung soll der Entwicklung *in vitro* als einer Grundvoraussetzung der Klonierungstechnik gelten. Hierfür wurden Embryonen untersucht, die 24h post conceptionem (p.c.) oder 19h p. c. dem Uterus entnommen worden sind.

In Versuchen mit den Transkriptioninhibitoren α -Amanitin und Actinomycin-D sollte die Frage geklärt werden, ob das Auftreten des PG2-Epitops im 4- bis 16-Zellstadium vom Beginn der zygotischen Transkription abhängig ist.

2. Material und Methoden

2.1 Chemikalien, Medien, Hormone und technische Geräte

2.1.1 Chemikalien

BSA	Sigma, Taufkirchen
B2-Medium	Laboratoire CCD, Paris (F)
CaCl ₂	Merck, Lyon (F)
CHX	Sigma, Lyon (F)
6-DMAP	Sigma, Lyon (F)
DMEM	Invitrogen, Cergy-Pontoise (F)
DMSO	Merck, Lyon (F)
Fetales Kälberserum	Invitrogen, Cergy-Pontoise (F)
Glutamin	Merck, Lyon (F)
Glucose	Sigma, Lyon (F)
KCl ₂	Merck, Lyon (F)
Mannitol	Sigma, Taufkirchen
MgCl ₂	Merck, Lyon (F)
Mineralöl	Sigma, Lyon (F)
M199	Invitrogen, Cergy-Pontoise (F),
NaCl ₂	Merck, Lyon (F)
NaN ₃	Sigma, Taufkirchen (D), (1% Stammlösung. auf 0,02% verdünnt mit PBS)
NaOH	Sigma, Lyon (F)
NaHCO ₃	Merck, Lyon (F)
PFA	Sigma, Taufkirchen
4% Paraformaldehyd	125 ml
Paraformaldehyd	5g in
DEPC-H ₂ O	113 ml lösen
10 x PBS	13 ml
auf Raumtemperatur abkühlen	
pH auf 7,25 einstellen, bei -20°C lagern	
PBS	Dulbecco, Sigma, Taufkirchen
PVP (Polyvinylpyrrolidon)	Sigma, Lyon (F)
Triton X-100	Sigma, Taufkirchen

2.1.2. Medien

Ca/Mg-freies Medium PBS ohne Mg und Ca mit NaCl 0,2g/l, hergestellt von C. Patrick

M199-Medium Invitrogen, Cergy-Pontoise (F)

Ansatz:

NaHCO₃ 2.2 g/l (Finalkonz. 26 mM)

Penicilline G 60 mg/l

Dihydro-Streptomycine 50 mg/l

pH 7.3-7.4

→ in diesem Medium werden die Embryonen kultiviert, nachdem es mindestens 30 min. im Brutschrank mit CO₂ equilibriert wurde

Ansatz M199 + Hepes:

NaHCO₃ 0.336 g/l (Finalkonz. 4mM)

Hepes 4.766 g/l (Finalkonz. 20 mM)

pH auf 7.3-7.35 mit NaOH 1N

Penicilline G 60 mg/l

Dihydro-Streptomycine 50 mg/l

PBSB

1% (resp 0,1%) BSA in PBS (aqua dest.)

PTXB

1% BSA in PBS (aqua dest.)

500µl Triton-100 auf 200ml PBSB

Tyrode's Säure

Ansatz g/100ml

Glucose 0,1

CaCl x 2 H₂O 0,024

KCl 0,02

MgCl x 6 H₂O 0,01

NaCl 0,8

PVP 0,4

Mit HCl auf pH 2,5 einstellen

Vectaschild

Linaris, Wertheim-Bettingen (D), Paris (F)

2.1.3. Enzyme, Hormone, Medikamente

α -Amanitin	Sigma, Lyon (F)
Actinomycin-D	Sigma, Lyon (F)
FSH (Stimufol)	Merial, Lyon (F)
HCG (Choluron)	Intervet, Boxmeer (NL)
Hyaluronidase	Sigma, Lyon (F)
Kollagenase	Sigma, Lyon (F)
Narcofen (Pentobarbital)	Merial, Rohrdorf
Penicillin	Sigma, Lyon (F)
Pronase	Sigma, Lyon (F)
Receptal	Hoechst, Unterschleißheim
Streptomycin	Sigma, Lyon (F)

2.1.4 Antikörper

CoxIV	Mobitec, Göttingen
Cy3	Dianova, Hamburg
Dapi	Serva, Heidelberg
Hoechst	Sigma, Lyon (F)
IgG1	Dunn, Asbach
IgG2a	Dunn, Asbach
MTC02	Biocarta, San Diego (USA)
PG2	bereitgestellt von C. Viebahn

2.1.5 Verbrauchsmaterial

Deckgläser	Carl Roth, Karlsruhe
Mikroglaskapillaren	Harvard Apparatus, Les Ulis (F)
Mikroscheren	Vannas spring scissors - Fine Science Tools, Heidelberg
Objektträger	Carl Roth, Karlsruhe
Petrischalen	Nunc, Wiesbaden
Pipetten	Eppendorf, Hamburg
Pipettenspitzen	Biozym, Hess. Oldendorf
Tygoonschlauch	Carl Roth, Karlsruhe
4-/24-/96-Well-Platten	Nunc, Wiesbaden
Wolframdrähte	Plano, Wetzlar

2.1.6. Geräte und Software

Axio Plan-Mikrosko	Vision CZJ 2.05, Carl Zeiss, Oberkochen
Axio Vision CZJ 2.05	Carl Zeiss, Oberkochen
Axiovert M35	Carl Zeiss, Oberkochen
BTX Stimulators	Biotechnologies & Experimental Research, San Diego CA (USA)
CCD camera	Photometrics and RS-image software, Roper Scientific Inc., Trenton (USA), Tuscon (USA)
inverted microscope	Olympus, Hamburg
Lupe	Nokia, Ulm
Laser scanning microscope 310	Carl Zeiss, Oberkochen
Pneumatic micromanipulator	Alcatel, Annecy (F)

2.2 Gewebegewinnung und –bearbeitung

2.2.1 Gewinnung und Fixierung der Embryonen für die Immunhistochemie

Frühembryonale Blastocysten des Alters 24h, 28h, 32h, 36h, 40h und 44h wurden von Kaninchen der Rasse Weisse Neuseeländer nach Befruchtung durch Böcke derselben Rasse gewonnen. Um die Konzeptionsrate zu verbessern, wurden zwei Wochen vor der Befruchtung einmalig 0,2 ml Receptal intramuskulär oder subkutan injiziert. Nach intravenöser Applikation von 0,2 ml Narcoren (Pentobarbital) wurden zu den oben angegebenen Zeiten nach der Kopulation die Uteri oder die Eileiter per Kaiserschnitt in toto reseziert und später nach Präparation unter dem Lichtmikroskop mit auf 37°C vorgewärmtem PBS durchgespült. Die dadurch erhaltene Embryonen wurden in 4% PFA (siehe Herstellung von PFA) für 1h bei Raumtemperatur fixiert.

2.2.2 Präparation der Embryonen

Für die frühembryonalen Stadien war die Entfernung der Zona Pellucida mit Wolframdrähten nicht möglich, da die Embryonen an diesen haften blieben und sich eine kontrollierbare Entfernung technisch schwierig gestaltete. Mit Hilfe von Mikroscheren ließ sich die Zona Pellucida (ZP) allerdings gut entfernen, wobei besondere Sorgfalt auf die Entfernung des sich um die ZP befindenden mukoiden Mantels gelegt werden musste sowie auf die Unversehrtheit der Blastomeren beim Einschnitt in die ZP und dem vorsichtigen Hinausdrücken des Blastomerenverbandes. Die so bearbeiteten Embryonen wurden für max. 1 Woche in PBSB 1% bei 4°C gelagert. Für längere Lagerungszeiten erfolgte die Überführung in PBS 0,01% NaN₃-Lösung, um einen mikrobiellen Befall der Präparate zu vermeiden. Versuche, die Zona pellucida enzymatisch durch Pronase oder chemisch

durch Tyrode acid zu entfernen, scheiterten sowohl an der Effizienz der Ablösung der Zona als auch an dem beeinträchtigten Färbungsmuster (s. Ergebnisse).

2.2.3 In vitro Kultivierung frühembryonaler Stadien

Für die in vitro Kultivierung der frühembryonalen 4-Zell-, 16-Zell- und Morulastadien wurden Kaninchen der Rasse Weisse Neuseeländer folgender Hormonbehandlung unterzogen:

1. 2 Injektionen FSH (siehe Medien Hormone) à 0,32 mg 3 Tage vor der Befruchtung (morgens 72h und abends 60h vor der Befruchtung)
2. 2 Injektionen FSH à 0,64 mg 2 Tage vor der Befruchtung (morgens 48h und abends 36h vor der Befruchtung)
3. 1 Injektion FSH à 0,32 mg am Tag vor der Befruchtung (morgens 24h vor der Befruchtung)
4. Am Abend 9-10h nach der Befruchtung erfolgte die einmalige Gabe von 30 IU hCG (siehe Medien und Hormone)

24h nach der Befruchtung erfolgte die Entnahme der Eileiter wie unter 2.1.1 beschrieben, die mit warmem PBS/PVP 0,005% (Polyvinylpyrrolidon Mol Wt 40.000) durchgespült wurden. Die Embryonen wurden in sterilen Uhrglasgefäßen gesammelt. Der größte Teil der Embryonen befand sich zu diesem Zeitpunkt im 2-Zellstadium. Nicht befruchtete Oozyten, die durch den fehlenden männlichen Vorkern identifiziert wurden, wurden aussortiert. Es erfolgte danach die Überführung in sterile 4-Well Platten mit auf 37°C vorgewärmtem M199 Medium und Auswahl der 2-Zellstadien für die immunhistochemische Färbung. Anschließend wurden die restlichen Embryonen in M199/Hepes Medium transferiert und bei 38°C und 5%CO₂ weiter kultiviert. Die Embryonen wurden zweimal täglich (Vormittag und Nachmittag) begutachtet und sobald die entsprechenden Stadien erreicht waren in PBSB 1% (siehe oben) überführt, in 4% PFA fixiert und wie unter 2.1.2 beschrieben depellucidiert. Die Stadienbestimmung erfolgte durch Zählen der Blastomeren unter der Lupe.

2.2.4 Gewinnung und Kultivierung von Kernspenderzellen für den Kerntransfer¹

(1) Für den Kerntransfer mit Blastomeren wurden Embryonen im Morulastadium benutzt. Diese Embryonen wurden bei -20°C gelagert, als Kryoprotektor diente DMSO (Stammlösg. für alle Schritte: 3M in Glucose und Natriumpyruvat enthaltendem PBS).

Für die Einfrierung wurden drei Waschschrte in DMSO durchgeführt:

1. 0,5 M DMSO für 5 min.
2. 1 M DMSO für 5 min.
3. 1,5 M DMSO für 15 min.

Danach erfolgte die Einfrierung nach dem „Minicool“ Programm:

1. $+20^{\circ}\text{C}$ auf -6°C (5°C pro min.)
2. -6°C auf -35°C ($0,3^{\circ}\text{C}$ pro min.)
3. -35°C auf -150°C (99°C pro min.)

Das Auftauen erfolgte nach Inkubation für 3 sec. Bei Raumtemperatur und anschließendem Wasserbad für 8 sec. durch folgende Waschschrte:

1. 1,5 M DMSO für 2 min.
2. 1 M DMSO für 5 min.
3. 0,5 M DMSO für 10 min.
4. PBS mit 20% fetalem Kälberserum für 10 min.

Der mukoide Mantel und die Zona Pellucida wurden durch 3minütige Inkubation in Pronase (0,5% in PBS) entfernt. Danach wurden die Embryonen in einem Ca- und Mg-freien Medium (modifiziertes PBS, in dem Ca und Mg durch NaCl [0,2g/l] ersetzt wurden, um die Osmolarität von 290 Milliosmol zu wahren) für 30 min. bei 38°C inkubiert und die Blastomeren wurden mittels einer kalibrierten Glaspipette aus dem Verband gelöst. Bis zu ihrem Gebrauch wurden sie bei 4°C gelagert.

(2) Zur Gewinnung der Cumuluszellen wurden die Oozyten einige Momente in 0,5% Hyaluronidase (Lösung in mit 20mM Hepes ergänztem M199 Hepes-Medium) inkubiert, bis die Follikelzellen abfielen. Danach wurden die Zellen unverzüglich aufgenommen und mehrere Male in M199 Hepes Medium gewaschen. Bis zum Kerntransfer wurden die Zellen bei 38°C in PBS mit 1% PVP überführt (durchgeführt von Nathalie Daniel, s.o.).

¹ (durchgeführt von Nathalie Daniel, INRA, Jouy-en-Josas, Frankreich)

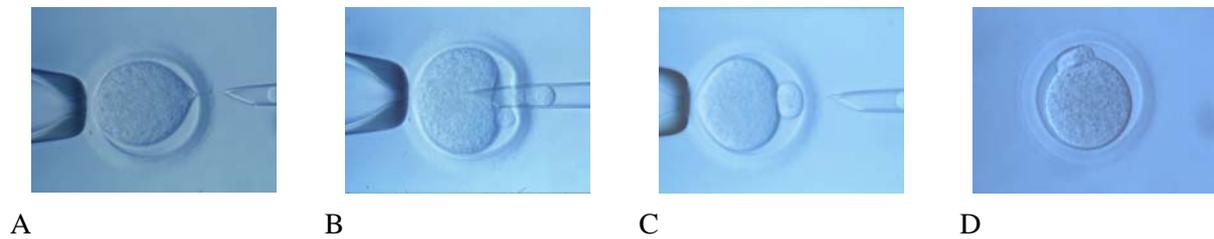
(3) Die fetalen Fibroblasten wurden in Nantes (Laboratoire VIVALIS, Nantes, (F)) präpariert. Aus dem Fetus wurden die Organe entnommen und in kleine Stücke geschnitten. Dann erfolgte eine Inkubation für der Stücke in 10 µl Kollagenase (Verdünnung 1/3 mit PBS) für 10-20 min. bei 37°C und die nicht verdauten Anteile wurden abfiltriert und verworfen. Anschließend wurde der Verdau zentrifugiert und der Bodensatz gewaschen und in Kultur überführt. Diese setzte sich zusammen aus DMEM mit Glutamin (2mM Finalkonzentration) (89µl auf 100µl), 10% fetalen Kälberserum (10µl auf 100µl), Penicillin/Streptomycin (0,1g/l Finalkonzentration) (1µl auf 100µl). Um zu verifizieren, dass es sich um Fibroblasten handelt, wurde eine immunhistochemische Standardfärbung mit Vimentin und Zytokeratin durchgeführt. Fibroblasten wurden an einer positiven Vimentin-Färbung erkannt.

2.2.5 Kerntransfer und Aktivierung der Eizelle²

Die Oozyten (MeioseII) wurden Kaninchen der Rasse Weisse Neuseeländer 16h nach Injektion von hCG und Kopulation mit einem vasktomierten Männchen entnommen. Anschließend wurden sie in 0,5% Hyaluronidase 15min. inkubiert und die adhärierenden Cumuluszellen wurden durch vorsichtiges Pipettieren entfernt. Alle Schritte wurden in M199 Medium mit 20 mM HEPES und Zusatz von 10% vol/vol fetalem Kälberserum durchgeführt. Für die Rekonstruktion von Embryonen durch Kerntransfer wurden die entsprechenden Zellen durch Mikromanipulation in den perivitellinen Raum der enukleierten Oozyten injiziert. Die so erzeugten Embryonen sowie die MII Oozyten (zur Erzeugung von parthenogenetischen Embryonen als Positivkontrolle) wurden 18-20h nach der hCG Gabe zweimal im Abstand von 1h mit Hilfe eines BTX Stimulators (Biotechnologies & Experimental Research Inc., San Diego CA) (3 Stöße von 3.2 kV/cm für 20µs jeweils in 0.3 M Mannitolwasser mit 0.1 mM CaCl₂ und 0.1 mM MgCl₂) elektrisch stimuliert, um die Fusion der Cumuluszelle mit der Eizelle zu induzieren. Die rekonstituierten Embryonen und Eizellen wurden dann für 1h in M199 bei 38°C inkubiert, danach wurde ein zweiter Stromstoss appliziert, um den Abschluss der Meiose II einzuleiten und die Aktivierung fortzuführen. Die Embryonen und Oozyten wurden für 1h bei 38°C in M199 Medium mit 5µg/ml CHX (Sigma) und 2mM 6-DMAP inkubiert und danach in 50µl mit 2,5% fetalem Kälberserum versetztem B2 Medium (Laboratoire CCD, Paris, Frankreich) unter Mineralöl (Sigma) bei 38°C und 5% CO₂ in Kultur gebracht. In den gewünschten Zellstadien wurden die Embryonen aus dem Medium genommen und in PBSB 1% 5min gewaschen. Danach erfolgte die Fixierung in 4% PFA und die Depellucidierung mit der Mikroschere. Da sich bei den rekonstituierten Embryonen kein mukoider Mantel um die Pellucida befand, war die Depellucidation leichter möglich als bei den normalen Embryonen.

² (ausgeführt von Mireille Challah-Jacques und Patrick Chesné, INRA, Jouy-en-Josas, Frankreich).

Abb. 1: Die wichtigsten Schritte während der Klonierung, freundlichst bereitgestellt von P. Chesné, INRA, Jouy-en-Josas, Frankreich



A = Aspiration des Zellkerns der Oocyte, B = Injektion des Spenderkerns in die enukleierte Oocyte, D = Oocyte mit Spenderkern, D = Oocyte nach elektrischer Stimulation mit fusioniertem Spenderkern

2.3 Färbung, Behandlungen der Embryonen und Auswertung

2.3.1 Protokoll für die Immunhistochemie

1. 4 x 5 min PTXB (siehe Chemikalien)
2. 4h PG2 (siehe Antikörper)
3. 3x 5min. PTXB
4. 45 min. Cy3 (siehe Antikörper)
5. 3x 5 min. PTXB
6. 30 min. PG2 → Blockade des Cy3-Epitops
7. 30 min. MTC02 (siehe Antikörper)
8. 3x 5min PTXB
9. 30 min. IgG 1 (siehe Antikörper)
10. 3x 5 min. PTXB
11. 5 min. DAPI oder Hoechst (siehe Antikörper)
12. 2x 5 min. PBSB

Die Immunhistochemie wurde an whole mount Präparaten im 2-, 4-, 8- bis 16-Zell- und 16- -Morulastadium ausgeführt. Für die frühembryonalen Stadien wurden die Färbungen in 96-Well-Platten (Nunc) durchgeführt. Das Umsetzen der einzelnen Embryonen erfolgte durch Pipettieren mit dem Mund mit Hilfe von Mikroglaskapillaren (Harvard Apparatus) gleicher Öffnungsbreite, einem Tygoonschlauch (Roth) und gefilterten Pipettenspitzen (Biozym). Die Keimscheiben wurden in 24-Well-Platten (Nunc) gefärbt und mit Glaspasteurpipetten umgesetzt.

2.3.2 Inhibition der zygotischen Transkription durch α -Amanitin und Actinomycin-D

Die Inkubation mit α -Amanitin erfolgte nach einem Protokoll von Evelyne Campion (pers. Mitteilung). Die Embryonen wurden 19h p.c. (zu diesem Zeitpunkt befanden sich die Embryonen noch im 1-Zell-Stadium) wie unter 2.1.4 beschrieben gewonnen und in 500 μ l M199 Hepes + 10 μ l α -Amanitin (5mg/ml) bei 38°C / 5% CO₂ in Kultur überführt. Die Entwicklung der Embryonen wurde unter einer vorgewärmten Lupe nach 43h p.c. und 48h p.c. beobachtet. Nach 48h wurden die Embryonen aus der Kultur genommen und in PBSB 1% gewaschen. Danach wurden sie für 1h in 4% PFA fixiert und, wie in 2.1.1 beschrieben, weiterbehandelt.

Die Inkubation mit Actinomycin-D erfolgte nach einem Protokoll von Evelyn Campion (pers. Mitteilung). Die Embryonen wurden 19h p.c., wie unter 2.1.4 beschrieben, gewonnen und in M199/Hepes Medium bei 38°C/5% CO₂ bis zum 2-Zellstadium kultiviert, danach erfolgte die Überführung in 0,4 μ l Actinomycin-D auf 500 μ l Hepes M199. Die Entwicklung der Embryonen wurde unter einer vorgewärmten Lupe im Alter von 43h, 47h und 50h beobachtet. Die Embryonen wurden dann im Alter von 50h p.c. aus der Kultur genommen, in PBSB 1% gewaschen und für 1h in 4% PFA fixiert und, wie unter 2.1.1 beschrieben, weiterbehandelt.

Die α -Amanitin und Actinomycin-D Inkubation erfolgte ein weiteres Mal gemeinsam analog dem Protokoll für die α -Amanitin Inkubation. Direkt nach der Gewinnung 19h p.c. wurden die Embryonen entweder in 4 μ l Actinomycin-D auf 500 μ l M199/Hepes Medium oder in 500 μ l M199/Hepes Medium mit 10 μ l α -Amanitin überführt. Es erfolgte also vor der Actinomycin-D-Inkubation anders als in der vorangegangenen Inkubation keine Kultivierung mehr bis zum 2-Zellstadium. Im Alter von 48h p.c. erfolgte dann die Fixierung in 4% PFA für 1h und die Depellucidation.

2.3.3 Inkubation mit Tyrode´s Säure und Pronase zur enzymatischen Entfernung der Zona Pellucida

(1) Die Inkubation mit Tyrode´s Säure wurde im 4-Zell- und 16-Zellstadium an normalen Embryonen nach in vitro Entwicklung 24h p.c. durchgeführt. Die Herstellung erfolgte wie in *Manipulating the mouse embryo: a laboratory manual* (Hogan, B. et al., 1994) beschrieben. Die Embryonen wurden unfixiert in Tyrode acid überführt und 1 min. unter Beobachtung unter der Lupe durch Rühren des Ansatzes mit der Glaspipette durchmischt. Sogleich erfolgte die Versetzung der Embryonen in PBSB 1%. Die PBSB 1% Inkubation erfolgte 6x für 1min. unter stetem Bewegen der Embryonen durch Rühren mit der Glaspipette. Wenn die Zona Pellucida sich nicht gelöst hatte, wurde mittels einer eng

kalibrierten Pipette versucht, sie durch häufige Aspiration der Embryonen zu lösen. Manipulating the Mouse Embryo: A Laboratory Manual

(2) Die Inkubation mit Pronase wurde im 4-Zell- und 16-Zellstadium an normalen Embryonen nach in vitro Entwicklung 24h p.c. durchgeführt. Zur Vorbereitung wurde 100mg Pronase in 20ml M199 Hepes Medium gelöst und für 30min auf den Schüttelinkubator gestellt. Danach erfolgte Zentrifugation bei 1000 rpm/min für 10 min.. Der Überstand wurde durch einen 0,22µl Filter abfiltriert und aliquotiert. Die Aliquots wurden bei -20°C gelagert (durchgeführt von Patrick Chesné).

Die Inkubation erfolgte gemäß einem Protokoll von Patrick Chesné, INRA, Jouy-en-Josas:

1. Vorbereitung einer 4-Well-Schale 1h vor der Inkubation mit 1x Pronase und 3x M199 Hepes/10% BSA-Medium und Lagerung bei 38°C
2. Inkubation der 4-Zell-Embryonen für 3min., der 16-Zell-Embryonen für 5min.
3. Überführung in M199 Hepes/10% BSA-Medium
4. Sofort nach Schritt 3 weiter Überführung in M199 Hepes/10% BSA-Medium
5. Inkubation bei 38°C für 3-5min.
6. Pipettierung der Embryonen durch eine eng kalibrierte Pipette, um die Zona Pellucida komplett zu lösen

Alle Schritte müssen bei 38°C ausgeführt werden, mit einem Minimum an Kontakt der Embryonen mit Raumtemperatur.

2.3.4 Mikroskopie der Färbungen

Die frühembryonalen Stadien wurden in PBS auf spezielle Objektträger übertragen. Daraufhin wurde das PBS mit Hilfe der Mikroglasspipette wieder entzogen und zeitgleich 1,8-2µl Vectaschild mit der Eppendorfpipette auf den Objektträger (Carl Roth) aufgetragen, so dass die Embryonen darin eintauchten. Es erfolgte sogleich die Einbettung unter einem Deckglas.

Die am Anatomischen Institut der Martin-Luther-Universität, Halle Wittenberg, durchgeführten Färbungen wurden mit Hilfe des Mikroskops Axio Plan (ZEISS, Germany) unter den Objektiven 16x Öl und 40x Öl begutachtet und mit dem Programm Axio Vision CZJ 2.05 abphotographiert. In Frankreich im INRA gefärbte Embryonen (alle in vitro Embryonen, sowie die Fibroblasten- und Cumulus-Klone) wurden unter dem Mikroskop Zeiss Axiovert M35 (Carl ZEISS, Germany) begutachtet und mit dem der CCD Kamera Photometrics CoolSNAP "cf " (Roper Scientific Inc., USA) unter automatischer Belichtungszeit mit einem 40er Objektiv ohne Öl photographiert.

3. Ergebnisse

Grundlage der vorliegenden Ergebnisse ist die mikroskopische Darstellung der biochemischen Mitochondriendifferenzierung durch immunhistochemische Antikörperreaktionen. Die Kombination des Antikörpers PG2 entweder mit dem MTC02-Antikörper oder mit dem CoxIV-Antikörper in Immunfluoreszenz-Doppelmarkierungen ermöglichte den Vergleich der Eigenschaften jeweils zweier Moleküle in Bezug auf ihre Intensität, ihre zytoplasmatische Verteilung und ihr subzelluläres Erscheinungsbild in ein und demselben Präparat. Je nach Herkunft (z.B. Befruchtung *in vitro* versus Kerntransfer) und Entwicklungsstadium (z.B. 2-Zellstadium versus 16-Zellstadium) eines Embryos konnte z.B. eine starke, inhomogene und diffuse PG2-Reaktion (jeweils mit dem roten Fluoreszenz-Farbstoff dargestellt) mit einer ebenfalls starken und inhomogenen aber körnigen MTC02-Reaktion (jeweils mit dem grünen Fluoreszenz-Farbstoff dargestellt) verbunden sein. Dabei gab es zwar in manchen Präparaten auch graduelle Abstufungen zwischen den extremen Eigenschaften; um zu einer ersten Annäherung zu kommen, wurden jedoch für jede der 3 untersuchten Eigenschaften zunächst nur jeweils 2 Gruppen (starke oder schwache Intensität, homogene oder inhomogene Verteilung, granuläres oder diffuses subzelluläres Reaktionsmuster) gebildet und in ihren Häufigkeiten innerhalb jedes Stadiums gegenübergestellt. Die untersuchten Proteine MTC02 und CoxIV sind als Protein der inneren mitochondrialen Membran (MTC02) bzw. als mitochondriales Enzym der Atmungskette (CoxIV) konstitutionelle mitochondriale Marker. Die Reaktion mit diesen Antikörpern zeigt daher in den untersuchten Präparaten den Erhaltungszustand und die Verteilung der Mitochondrien an und wurde somit als eine interne methodische Kontrolle angesehen. Die Inkubation mit Dapi oder Hoechst nach der Doppelfärbung zeigte die Besonderheiten in der Beschaffenheit der Kernstruktur und das Verhältnis zwischen den zytoplasmatischen Antikörperfärbungen und der Kernbeschaffenheit. Darüber hinaus ermöglichte sie die exakte Bestimmung der Zellzahl nach der Färbung.

Die Beschreibung der Ergebnisse im Einzelnen beginnt mit den Embryonen, die sich *in vivo* entwickelt haben und somit als Kontrollen für die Embryonen nach Entwicklung *in vitro* dienen (Kapitel 3.1). Danach werden die Embryonen beschrieben, die 24h bzw. 19h nach der Konzeption (p.c.) aus den Uteri ausgespült wurden und sich dann *in vitro* weiterentwickelt haben (Kapitel 3.2). Diese Embryonen dienten als Kontrollen für die Klonierungsversuche (Kapitel 3.3) und für die Versuche mit Transkriptionshemmern (Kapitel 3.5). In Kapitel 3.4 folgt die Beschreibung der parthenogenetischen Embryonen, die nach elektrischer Stimulierung unbefruchteter Eizellen entstanden und als Kontrolle für den Aktivierungsschritt der Embryonen nach Kerntransfer (Kapitel 3.3) dienten. Das Hauptaugenmerk der vorliegenden Untersuchung war in allen untersuchten Embryopopulationen auf das 4-Zell-, das 16-Zell- und das Morulastadium gerichtet.

3.1 Embryonen nach natürlicher Befruchtung und Entwicklung in vivo

Im 2-Zellstadium liegen die Blastomeren eng beieinander, sodass nicht in allen Fällen das zweite Polkörperchen (s. Abb.3) erkennbar ist. Die Blastomeren sind umgeben von einem schmalen perivitellinen Spalt, gefolgt von einer breiten Zona Pellucida und einem starken Mukolemm mit anhaftenden Spermien.

24 Präparate wurden im 2-Zellstadium 24h p.c. untersucht. Die Reaktion des PG2-Antikörpers war in allen Blastomeren nachweisbar. In 23 der 24 Präparate war die Reaktionsintensität stark und nur in einem Präparat schwach, in dem auch die Kontrollfärbung (in diesem Fall mit dem MTC02-Antikörper) schwach war. In etwa der Hälfte der Präparate (13/24) war die PG2-Reaktion gleichmäßig über beide Blastomere verteilt, in 9 Präparaten war eine stärkere Intensität der Reaktion von PG2 in zentralen Bereichen des Embryos zu erkennen, dabei war die Reaktion in den Abschnitten der Blastomeren besonders stark, die einander zugewandt lagen, und es entstand ein peripherer, die Zona pellucida begleitender Saum niedriger Intensität (s.u. Anlage, Abb.3, Balken). In nahezu allen Präparaten (22/24) war die PG2-Reaktion granulär, die überwiegende Korngröße entsprach mit etwa 1µm dem Durchmesser von Mitochondrien. In 2 Präparaten zeigte sich eine diffuse PG2-Reaktion. Die 19 mit dem MTC02-Antikörper gefärbten Präparate zeigten eine starke Reaktion in allen Blastomeren, nur geringfügige Intensitätsunterschiede und regelmäßig ein granuläres Färbemuster (Abb.3). Die MTC02-Reaktion war insbesondere auch in Präparaten, in denen die PG2-Reaktion in dem oben beschriebenen Randsaum schwächer war, bis zum Rand des Embryos gleichmäßig auf das Zytoplasma der Blastomeren verteilt. Nur in zwei Präparaten fand sich eine stärkere Reaktion des MTC02-Antikörpers vor allem im Zentrum der Blastomeren, ein regelmäßiger, schwächer markierter Randsaum konnte hier jedoch nicht beobachtet werden. Die fünf mit dem CoxIV-Antikörper gefärbten Präparate zeigten ebenfalls in allen Blastomeren eine starke, gleichmäßig auf die Zytoplasmaabschnitte des Embryos verteilte Reaktion. Im subzellulären Reaktionsmuster zeigte sich jedoch ein auffälliger Unterschied zur PG2- oder MTC02-Reaktion: Drei der fünf Präparate reagierten deutlich diffus und nur zwei waren schwach granulär.

In der Doppelmarkierung konnten bei starker Vergrößerung folgende Unterschiede im subzellulären Reaktionsmuster der beiden eingesetzten Antikörper festgestellt werden (Abb.3): Größere immunmarkierte Granula waren regelmäßig stärker gefärbt, während eine kleinere Korngröße mit einer schwächeren Anfärbung verbunden war. Im Vergleich zur MTC02-Markierung waren einzelne Granula in der PG2-Reaktion regelmäßig geringfügig größer und stärker gefärbt, sodass sich in stark gefärbten konfluierend PG2-markierten Bereichen in der MTC02-Färbung doch einzelne Granula trennen ließen und bei schwach PG2-gefärbten Granula eine MTC02-Reaktion an der entsprechenden Stelle nur schwach oder nicht mehr zu erkennen war.

Im 4-Zellstadium, das etwa 28h p.c. erreicht wird, füllen die vier Blastomeren den von der Zona Pellucida umgebenen Raum nahezu vollständig aus. Die Zona Pellucida selbst ist noch genauso breit wie 4h zuvor. Die breite mukoide Proteinschicht mit anhaftenden Cumuluszellen und Spermatozyten bedeckt weiterhin den Embryo, ist aber nur noch etwa halb so breit wie im Zweizellstadium.

In allen Blastomeren konnte eine Reaktion mit dem PG2-Antikörper nachgewiesen werden. Die Reaktionsintensität mit dem PG2-Antikörper war in allen acht Präparaten stark. In drei Präparaten fielen eine verstärkte Reaktionsintensität in zentralen oder peripheren Bereichen (Abb.4, Pfeile) des Embryos sowie ein Randsaum niedrigerer Intensität (Abb.4) auf. Die Reaktionsverteilung des PG2-Antikörpers war in den meisten Fällen gleichmäßig (6/8). Im Gegensatz zu den Embryonen des 2-Zellstadiums zeigte sich in den Embryonen des 4-Zellstadiums vor allem ein diffuses Reaktionsmuster der PG2-Reaktion. Nur in drei von neun Präparaten war eine Granulierung verschwommen sichtbar. Eine Reaktion mit dem MTC02-Antikörper war in allen Blastomeren nachweisbar. Der MTC02-Antikörper zeigte eine mit dem 2-Zellstadium vergleichbare Reaktionsintensität. Die Verteilung der MTC02-Reaktion war in der Hälfte der Präparate gleichmäßig. Insbesondere an Kontaktstellen zwischen den Blastomeren fielen Bereiche geringerer Intensität auf. Das Reaktionsmuster stellte sich in allen Präparaten granulär dar (Abb.4), jedoch hatten in fünf Präparaten die Granula nahezu doppelte Korngröße im Vergleich zum 2-Zellstadium, sodass sich die Granulierung gröber darstellte. Bereiche hoher PG2-Intensität zeigten häufig eine geringere MTC02-Intensität (Abb.4, A u. B). Im Bereich der niedrigeren PG2-Reaktion am Randbereich des Embryos reagierte der MTC02-Antikörper nicht schwächer als im Zentrum des Embryos, umgekehrt war die PG2-Reaktion im Bereich der niedrigen MTC02-Reaktion zwischen den Blastomeren nicht reduziert.

In der Doppelmarkierung konnten bei starker Vergrößerung folgende Unterschiede im subzellulären Reaktionsmuster der beiden bei einer Doppelmarkierung eingesetzten Antikörper festgestellt werden (Abb.4, C u. D): Unter dem diffusen Reaktionsbild des PG2-Antikörpers stellten sich verschwommen erkennbare Granula dar, die jedoch kleiner und schwächer gefärbt waren als die Granula der MTC02-Reaktion. Die Granula der MTC02-Reaktion zeigten untereinander nur geringfügige Unterschiede in ihrer Größe und Reaktionsintensität.

Die Embryonen des 8- bis 20-Zellstadiums wurden 36-44h p.c. aus den Uteri gespült. Die Blastomeren füllen in diesem Stadium den von der Zona Pellucida umgebenen Raum nun vollständig aus. Die Breite der Zona Pellucida und der sie umgebenden mukoiden Proteinschicht ist zum vorhergehenden Stadium nicht wesentlich verändert.

Eine Reaktion mit dem PG2-Antikörper war in allen Blastomeren nachweisbar. Im 8-Zellstadium zeigten sechs von neun Präparaten eine starke Reaktion mit dem PG2-Antikörper. Bis zum 12-

Zellstadium waren teilweise umschriebene Bereiche oder ganze Blastomeren zu erkennen, die intensiver reagierten als in den übrigen Bereichen des Embryos. In den neun Präparaten des 8-Zellstadiums reagierten fünf Präparate homogen mit dem PG2-Antikörper, in vier Präparaten zeigte sich eine verstärkte Reaktion im Zentrum des Embryos. Das subzelluläre Reaktionsmuster der PG2-Reaktion im 12-Zellstadium war in den meisten Fällen diffus. Eine Reaktion mit dem MTC02-Antikörper war in allen Präparaten nachweisbar. Die Reaktion mit dem MTC02-Antikörper zeigte durchgehend eine starke Intensität und in den meisten Fällen eine homogene Verteilung. In acht Präparaten war das subzelluläre Reaktionsmuster granulär und nur in einem Präparat diffus.

In Stadien höherer Zellzahl zeigte sich in den acht Präparaten ab dem 14-Zellstadium eine vielfach stärkere Reaktionsintensität, so dass die Bilder mit deutlich geringeren Belichtungszeiten aufgenommen werden mussten. Eine Reaktion mit dem PG2-Antikörper war in allen Blastomeren nachweisbar. Der PG2-Antikörper zeigte in sechs Präparaten eine verstärkte Reaktion im Zentrum der Embryonen (Abb.5). Die Verteilung der PG2-Reaktion war in fünf Embryonen homogen. Das subzelluläre Reaktionsmuster in diesen Stadien erschien nun granulär, wenn auch nicht so deutlich wie im 2-Zellstadium (Abb.5). Eine Reaktion mit dem MTC02-Antikörper war in allen Präparaten nachweisbar. Die Reaktion mit dem MTC02-Antikörper war in allen Präparaten stark und die Verteilung homogen. Das subzelluläre Reaktionsmuster stellte sich stets granulär dar.

In der Doppelmarkierung war im subzellulären Reaktionsmuster bei starker Vergrößerung, anders als noch in den Präparaten des 4-Zellstadiums, eine Zuordnung einzelner PG2-positiver Granula zu MTC02-positiven Granula möglich (s. Abb.5 C u. D). Jedoch zeigten einzelne Granula eine stärkere Reaktion mit dem PG2-Antikörper als mit dem MTC02-Antikörper (Abb. 5).

3.2 Embryonen nach natürlicher Befruchtung und Entwicklung in vitro

3.2.1 Embryonen mit Kultivierungsbeginn 24h p.c.

Die Kultivierung in vitro in Hapes-Medium begann 24h p.c., um zum Klonierungsprotokoll vergleichbare Verhältnisse zu erhalten (s. Material und Methoden). Die mukoide Proteinschicht, die sich bei in vivo Embryonen um die Zona Pellucida legt, fehlt bei in vitro kultivierten Embryonen, daher konnte die Zona Pellucida leichter entfernt werden. Die Breite der Zona Pellucida und des perivittelin Spalts zwischen den Blastomeren und der Zona Pellucida entsprachen dem Zustand in vivo kultivierter Embryonen.

Im 4-Zellstadium war in allen Blastomeren eine Reaktion mit dem PG2-Antikörper nachweisbar. Die Reaktionsintensität der PG2 Reaktion war in allen elf Präparaten sehr stark, jedoch nicht immer

homogen verteilt: Selten zeigten sich dezentral umschriebene Bereiche hoher Reaktionsintensität (Abb.6 vertikaler Pfeil); in zwei Präparaten war ein Randsaum niedrigerer Intensität der PG2-Reaktion wie im 2-Zellstadium in vivo (Abb.3) erkennbar (Abb.6, s. Balken) und in manchen Präparaten war die Reaktionsintensität v.a. in zentralen Bereichen des Embryos wie im 17-Zellstadium nach Entwicklung in vivo besonders hoch (Abb.5). In den meisten Fällen (7/11) war die PG2-Reaktion homogen verteilt. Wie schon in den Präparaten nach ausschließlicher in vivo Entwicklung erschien auch im 4-Zellstadium der Präparate nach Entwicklung in vitro zum großen Teil (7/11) ein diffuses (Abb. 6), seltener (4/11) aber auch ein granuläres subzelluläres Reaktionsmuster. In bestimmten Bereichen starker Intensität zeigten sich grobe Granula. Die MTC02-Reaktion war in allen Blastomeren nachweisbar und in ihrer Intensität vergleichbar mit der Reaktion des PG2-Antikörpers. Jedoch zeigten bestimmte Bereiche im Embryo eine geringere Reaktionsintensität und in den meisten Fällen zeigte sich auch ein Randsaum niedrigerer Intensität. Dabei war aber die Reaktion schwächer als mit dem PG2-Antikörper (Abb.6, s. Balken). Das subzelluläre Reaktionsmuster des MTC02-Antikörpers erschien in den meisten Fällen (8/11) granulär (Abb.6). Eine Zuordnung einzelner PG2-positiver Granula zu einzelnen positiven MTC02-Granula war in der Doppelmarkierung mit beiden Antikörper wie im 4-Zellstadium nach Entwicklung in vivo wegen des diffusen subzellulären Reaktionsmusters des PG2-Antikörpers nicht möglich.

Die im folgenden Abschnitt besprochenen Embryonen wurden nach 22-24h der Kultur entnommen. Da aufgrund des dreidimensionalen Aufbaus der Embryonen die Bestimmung der Blastomerenzahl im ungefärbten Präparat nicht immer durch Zählen der Blastomeren genau bestimmbar war, variiert die Zellzahl der hier beschriebenen Embryonen zwischen elf und 27. In einem Präparat war die Kernanzahl auch fluoreszenzmikroskopisch nicht genau bestimmbar, da einige Zellkerne nicht mit dem Dapi-Farbstoff reagiert hatten.

Bei fast allen Präparaten (31/32) konnte in allen Blastomeren eine PG2-Reaktion nachgewiesen werden und alle 32 Präparate zeigten eine starke Reaktionsintensität mit dem PG2-Antikörper. Drei Präparate fielen durch eine verstärkte Reaktionsintensität der Reaktion von PG2 in zentralen Bereichen des Embryos auf. Die Verteilung des PG2-Antikörpers war in 10 Präparaten homogen. In den übrigen Präparaten zeigte sich eine erhöhte oder erniedrigte Reaktionsintensität in unterschiedlichen Bereichen der Embryonen (Abb.7), jedoch ohne einen Randsaum niedrigere Intensität oder einer erhöhten Reaktionsintensität in zentralen Bereichen. Auffallend war die nun in den meisten Fällen (31/32) vorhandene Granulierung im subzellulären PG2-Reaktionsmuster. Nur in einem der 32 Präparate erschien die subzelluläre Reaktion mit dem PG2-Antikörper diffus und in dreien nur verschwommen granuliert. Die Reaktionsintensität mit dem MTC02-Antikörper war prinzipiell in allen Präparaten stark. In einem Präparat war die MTC02-Reaktion in einer Blastomere

negativ, in einem weiteren war außerdem die Reaktion mit dem PG2-Antikörper in einer Blastomere negativ (s.o.). In neun Präparaten stellte sich die Reaktionsintensität des MTC02-Antikörpers auf ähnliche Art wie bei PG2 inhomogen dar (Abb.7). Das Reaktionsmuster war in allen Präparaten granulär. In zwei Fällen war die Granulierung im subzellulären MTC02 Reaktionsmuster nur verschwommen und zweimal war die Granulierung sehr grob. Die Reaktionen beider Antikörper unterschieden sich häufig in ihrer Reaktionsintensität. So traten an denselben Stellen im Embryo unterschiedliche Reaktionsintensitäten in verschiedenen Kombinationen auf (s.o., Abb.7). Häufig gruppierten sich stärker negative Bereiche um einen schwächer reagierenden Bereich, dem in der Dapi-Färbung ein Zellkern zugeordnet werden konnte (Abb.7, s. Pfeil 4). Bereiche mit hoher PG2-Reaktionsintensität reagierten nicht immer auch mit dem MTC02-Antikörper sehr intensiv (Abb. 7, s. Pfeil 3) und umgekehrt (Pfeile 1). Insgesamt waren in fünf Präparaten große Unterschiede zwischen der Verteilung des PG2-Antikörpers und des MTC02-Antikörpers zu finden. In der Doppelmarkierung zeigte sich häufig eine stärkere PG2-Reaktionsintensität der Granula, jedoch fielen im Gegensatz zu den vorherigen Stadien in bestimmten Bereichen Granula auf, die in der MTC02-Reaktion größer und stärker gefärbt erschienen, entsprechend der oben beschriebenen unterschiedlichen Verteilung. Eine Zuordnung einzelner PG2-positiver Granula zu einzelnen MTC02-positiven Granula war häufig möglich.

Zusammen mit dem Morulastadium werden hier aus den oben dargelegten Gründen Embryonen vom 17-Zell- bis zum frühen Blastozystenstadium beschrieben, die nach 36-40h der Kultur entnommen wurden.

Auffallend waren Unterschiede im Durchmesser der Präparate, wobei kleinere Präparate eine intensivere und homogenere Reaktion zeigten. Die Reaktionsintensität beider Antikörper war nicht so ungleichmäßig wie im 16-Zellstadium. In allen 20 Präparaten konnte eine PG2-Reaktion in allen Blastomeren nachgewiesen werden. Die Intensität der Reaktion war in allen Präparaten stark. In etwas mehr als der Hälfte der Präparate (12/20) war die Verteilung der Reaktion homogen. In einigen Embryonen zeigte sich eine verstärkte Intensität der PG2-Reaktion in zentralen Bereichen (Abb.8) und selten fiel am Rand des Embryos ein schmaler Bereich verstärkter Intensität mit dem PG2-Antikörper auf. Von 20 Präparaten zeigten insgesamt zwei Präparate ein nur verschwommen granuläres subzelluläres Reaktionsmuster mit dem PG2-Antikörper, die restlichen waren granulär. Eine MTC02-Reaktion war in allen Blastomeren nachweisbar, in 13 Präparaten war die Reaktion stark. In 15 Präparaten war die Verteilung der MTC02-Reaktion homogen. Besonders in peripheren Bereichen und am Rand zeigten sich in manchen Präparaten eine verstärkte Reaktion (Abb.8). Das subzelluläre Reaktionsmuster des MTC02-Antikörpers war in den meisten Fällen (18/20) granulär. 16 von 20 Präparaten zeigten ein granuläres subzelluläres Reaktionsmuster mit dem MTC02-Antikörper, zwei weitere ein verschwommen granuläres Reaktionsmuster. In vier Präparaten waren deutliche

Unterschiede zwischen den Reaktionen bezüglich der Intensität und Verteilung zu finden (Abb.8). In der Doppelmarkierung zeigte sich in zwei Präparaten eine mehr grobgranuläre Reaktion mit PG2, in zwei anderen eine eher verschwommen granuläre Reaktion. In diesen Präparaten war auch die MTC02-Reaktion eher verschwommen und zeigte eine geringere Intensität. In einem der PG2 grobgranulären Präparate zeigte sich auch der MTC02-Antikörper grobgranulär. Eine Zuordnung einzelner PG2-positiver Granula zu einzelnen MTC02-positiven Granula war in den meisten Fällen möglich.

Die im folgenden Abschnitt beschriebenen Embryonen wurden nach 44-48h aus der Kultur entnommen. Im Blastozystenstadium ist die Unterscheidung zwischen extraembryonalem Epithel, dem Trophoblasten, und embryonalem Epithel, dem Embryoblasten, möglich. Die Entfernung der Zona Pellucida war aufgrund ihrer Verklebung mit dem äußeren Epithelverband des Trophoblasten sehr schwierig, daher konnten nicht alle Präparate vollständig erhalten werden.

In der Dapi-Färbung war die innere Zellmasse in den meisten Präparaten (7/9) als Bezirk erhöhter Zelldichte gut erkennbar (Abb.9). Alle neun beurteilbaren Präparate zeigten mit dem PG2-Antikörper eine starke Reaktionsintensität und eine Reaktion konnte im ganzen Embryo nachgewiesen werden mit einer im Bereich der inneren Zellmasse verstärkten und im Bereich des Trophoblasten z.T. viel schwächeren Intensität (Abb.9). Das subzelluläre Reaktionsmuster war in allen Präparaten granulär (Abb.9). Die PG2-unabhängige Darstellung der Mitochondrien wurde an dieser Stelle statt mit MTC02 mit CoxIV durchgeführt. Die Intensität der CoxIV-Reaktion war in allen Präparaten stark und eine Reaktion konnte im ganzen Embryo nachgewiesen werden. Nur selten zeigte die CoxIV Reaktion ein mit der MTC02-Reaktion vergleichbares Ergebnis hinsichtlich der Granulation. Im Gegensatz zum granulären subzellulären Reaktionsmuster der MTC02-Reaktion war das subzelluläre Reaktionsmuster des CoxIV-Antikörpers eher verschwommen granulär. Drei Präparate zeigten ein diffuses subzelluläres Reaktionsmuster. Häufig gruppierten sich in der CoxIV-Reaktion stärker negative Bereiche um einen schwächer reagierenden Bereich, dem in der Dapi-Färbung ein Zellkern zugeordnet werden konnte. In der CoxIV-Färbung zeigte sich kein breiter Randsaum schwächerer Intensität im Trophoblasten wie in der PG2-Färbung.

3.2.2 Embryonen mit Kultivierungsbeginn 19h p.c.

Die Untersuchung von Embryonen, die 19h p.c. in Kultur überführt wurden, diente als Kontrolle zu den Versuchen zur Transkriptionsinhibierung, bei denen für eine effektive Unterdrückung der Proteinbiosynthese die Inkubation mit den Transkriptionsinhibitoren α -Amanitin oder Actinomycin-D bereits 19h p.c., d.h. also noch vor Erreichen des 2-Zellstadiums, erfolgen musste.

Insgesamt wurden sieben Präparate im 2-Zellstadium untersucht, die nach 5-7h aus der Kultur genommen wurden. Eine Reaktion mit dem PG2-Antikörper war in allen Blastomeren nachweisbar. Die Reaktionsintensität der PG2-Reaktion war in allen Präparaten stark, jedoch schwächer als in Embryonen, die 24h p.c. in Kultur überführt wurden. Auch die Verteilung der Reaktion war in den meisten Präparaten (5/7) homogen. In manchen Präparaten zeigte sich ein Bereich niedrigerer Intensität an den Kontaktstellen der Blastomeren (Abb.10). In fünf Präparaten war ein Randsaum niedrigerer Intensität in der Reaktion mit dem PG2-Antikörper auffallend (Abb.10). Nur vier Präparate zeigten jedoch im subzellulären Reaktionsmuster eine granuläre Reaktion mit dem PG2-Antikörper (Abb.10). Die MTC02-Reaktion war in allen Blastomeren nachweisbar und die Reaktionsintensität in allen Präparaten stark. Die Reaktionsverteilung stellte sich in den meisten Fällen (5/7) homogen dar. In den inhomogen erscheinenden Präparaten fanden sich zentral oder peripher schwächer gefärbte oder negative Bereiche. An den Kontaktstellen der Blastomeren zeigten sich auch in der MTC02-Reaktion Bereiche niedrigerer Intensität. Auch ein Randsaum niedrigerer Intensität zeigte sich in der MTC02-Reaktion, wenn auch nicht so ausgeprägt wie in der PG2-Reaktion (Abb.10). Das subzelluläre Reaktionsmuster war in sechs Präparaten granulär mit Schwankungen in der Granulagröße und nur in einem diffus. In der Doppelmarkierung waren Granula, die in der MTC02-Reaktion groß und intensiv waren, in der PG2-Reaktion häufig kleiner und weniger intensiv (Abb.10, C u. D). Eine Zuordnung einzelner PG2-positiver Granula zu einzelnen MTC02-positiven Granula war häufig möglich.

In diesem Abschnitt werden Embryonen, die nach 8-10h aus der Kultur genommen wurden und das 4-Zellstadium erreicht hatten, beschrieben. In zwei Präparaten konnte keine PG2-Reaktion beobachtet werden, in den meisten Fällen (7/9) war die Intensität der Reaktion mit dem PG2-Antikörper jedoch stark. Die Verteilung der PG2-Reaktion erschien in allen Präparaten homogen. Oft war jedoch ein Randsaum niedrigerer PG2-Intensität ähnlich wie in den 2- und 4-Zellstadien nach Entwicklung in vivo auffallend (Abb.11, s. Balken). Anders als in Präparaten des gleichen Stadiums nach Entwicklung in vivo und Entwicklung in vitro 24h p.c. zeigte sich in mehreren Präparaten im subzellulären Reaktionsmuster eine granuläre Reaktion (4/9) (Abb.11). Die Reaktion mit dem MTC02-Antikörper war in allen neun Präparaten stark und die Verteilung der Reaktion homogen. Acht Präparate zeigten im subzellulären Reaktionsmuster eine granuläre Reaktion mit dem MTC02-Antikörper (Abb. 11). Beide Antikörper zeigten in umschriebenen Bereichen, die nicht immer übereinstimmten, eine verstärkte Reaktionsintensität (Abb. 11, s. horizontale Pfeile). Unterschiede in der Verteilung und

Intensität der Antikörper waren häufig (Abb. 11). Die MTC02-Intensität im Bereich dieses Randsaums war geringer als in zentralen Bereichen der Embryonen, jedoch stärker als die PG2-Intensität (Abb.11, s. Balken). In der Doppelmarkierung waren Granula im subzellulären Reaktionsmuster des PG2-Antikörpers feiner gekörnt als mit dem MTC02-Antikörper. Eine Zuordnung einzelner PG2-positiver Granula zu einzelnen MTC02-positiven Granula war in Präparaten mit granulärem subzellulärem PG2-Reaktionsmuster möglich.

Die in diesem Abschnitt beschriebenen Embryonen wurden nach 24-32h der Kultur entnommen und wiesen in der Dapi-Färbung Zellzahlen zwischen 8 und 17 auf. In allen Blastomeren war eine PG2-Reaktion nachweisbar. Die Reaktionsintensität mit dem PG2-Antikörper war in allen neun beurteilbaren Präparaten stark und die Reaktionsverteilung in den meisten Präparaten (7/9) homogen. Fünfmal zeigte sich ein Randsaum niedrigerer Intensität (Abb.12, s. Balken) in der PG2 Reaktion und zweimal bot sich eine inhomogene Verteilung der Reaktion mit stärkerer Intensität in verschiedenen Bereichen der Embryonen. Im subzellulären Reaktionsmuster des PG2-Antikörpers war eine Granulierung, wenn auch nicht so klar wie in den 2-Zellpräparaten, dennoch in sechs Präparaten zu erkennen (Abb.12). Eine MTC02-Reaktion war in allen Blastomeren nachweisbar und die Reaktion war in allen Präparaten stark. Die Verteilung der Reaktion war stets homogen, wenn auch in wenigen Präparaten Intensitätsschwankungen zu beobachten waren. Der Intensitätsverlust zum Rand war in der MTC02-Reaktion geringer als in der PG2-Reaktion (Abb. 12, s. Balken). Das subzelluläre Reaktionsmuster mit dem MTC02-Antikörper war in den meisten Fällen granulär (8/9). In der Doppelmarkierung fielen besonders in der MTC02-Reaktion größere Granula auf, die stärker reagierten. Solche einzeln hervorstechenden Granula waren in der PG2-Reaktion seltener. Eine Zuordnung einzelner PG2-positiver Granula zu einer MTC02-Reaktion war häufig möglich.

In diesem Abschnitt werden Embryonen beschrieben, die nach 32-36h der Kultur entnommen wurden und Zellzahlen zwischen 13 und 16 aufweisen. In allen insgesamt neun beurteilbaren Präparaten war eine Reaktion mit dem PG2-Antikörper in allen Blastomeren nachweisbar und es zeigte sich eine starke Reaktionsintensität. In den meisten Fällen zeigte sich jedoch eine inhomogene Verteilung der Reaktion mit dem PG2-Antikörper (7/9). Häufig (4/9) zeigte sich ein Randsaum niedrigerer Intensität, der sich im Vergleich zu einer sehr starken Reaktion im Zentrum des Embryos negativ darstellte (Abb.13, s. Balken), oder die Reaktion war in verschiedenen Bereichen des Embryos besonders uneinheitlich in ihrer Intensität und Verteilung. Alle Präparate zeigten im subzellulären Reaktionsmuster mit dem PG2-Antikörper eine granuläre Reaktion. Die MTC02 Reaktion war in allen Blastomeren nachweisbar und in allen Präparaten stark. Im Gegensatz zur PG2-Reaktion waren Intensitätsschwankungen geringer. Eine homogene Verteilung mit geringerer Intensität in peripheren Bereichen zeigte sich in fünf von neun Präparaten. Im Bereich des Randsaum niedrigerer PG2-Intensität war auch die MTC02-Intensität schwächer als in zentralen Bereichen des Embryos, aber

stärker als die PG2-Intensität (Abb.13, s. Balken). Ein granuläres subzelluläres Reaktionsmuster mit dem MTC02-Antikörper zeigte sich in allen Präparaten. In der Doppelmarkierung fiel erneut eine deutlichere Granulierung in der MTC02-Reaktion in Form größerer und stärker reagierender Granula auf. Eine Zuordnung einzelner PG2-positiver Granula zu MTC02-positiven Granula war häufig möglich.

3.3 Embryonen nach Kerntransfer

Die durch Kerntransfer erzeugten Embryonen entsprachen in der Beschaffenheit der Zona Pellucida den Embryonen nach Entwicklung in vitro. Auffallend war die verzögerte Entwicklungspotenz dieser Embryonen und in einigen Fällen morphologische Auffälligkeiten wie eine eckige Form der Blastomeren im Vergleich zu der runden Form in Embryonen nach Entwicklung in vivo und in vitro, zu großen oder zu kleinen Blastomeren sowie Synzytienbildungen. In dieser Embryonenpopulation erfolgte die Untersuchung der Embryonen vom 4-Zell- bis Morulastadium.

3.3.1 Kerntransfer mit Blastomeren des 64-Zell-Stadiums

Für das 4-Zell-Stadium wurden die Embryonen 24-26h nach dem Kerntransfer aus der Kultur entnommen. Auffallend war die eckige Form der Blastomeren im Vergleich zu der runden Form in Embryonen nach Entwicklung in vivo und in vitro. In allen Präparaten konnten die Zellkerne in der Hoechst-Färbung, die anstelle der Dapi-Färbung in dieser Versuchsreihe angewandt wurde, nachgewiesen werden. Alle zehn Präparate zeigten eine schwache Reaktion mit dem PG2-Antikörper, in drei Präparaten erschien die Reaktion negativ. Die Reaktionsverteilung war, soweit wegen der schwachen Reaktion beurteilbar, homogen. Das subzelluläre Reaktionsmuster des PG2-Antikörpers zeigte sich nur in einem Präparat granulär (Abb.14). Auch die Reaktion mit dem MTC02-Antikörper war sehr schwach und in zwei Präparaten als negativ zu beurteilen. Ebenso wie in der Reaktion mit dem PG2-Antikörper, war die Verteilung der MTC02-Reaktion aufgrund der schwachen Intensität schwer beurteilbar. Im subzellulären Reaktionsmuster des MTC02-Antikörpers blieb eine Granulierung in allen Präparaten erkennbar (Abb.14), wenngleich sie schwach und häufig nur verschwommen war. Die Unterschiede in der Doppelmarkierung blieben aufgrund der Schwäche der Intensität gering und beschränkten sich auf Intensitätsunterschiede und eine deutlichere Granulierung in der MTC02-Reaktion. In einem Präparat zeigte sich ein Bereich im Zentrum des Embryos, der in beiden Antikörpern eine erhöhte Intensität zeigt und in dem sich eine Ansammlung von Kernen findet, die kleiner sind als die Kerne der Blastomeren (Abb.14).

In diesem Abschnitt werden 14 Embryonen beschrieben, die 46-48h nach dem Kerntransfer der Kultur entnommen wurden. Auffallend war erneut die eckige Form der Blastomeren im Vergleich zu der

runden Form in Embryonen nach Entwicklung *in vivo* und *in vitro*. In der Hoechst-Färbung waren in sieben Präparaten keine Kerne nachweisbar, in einem Präparat war die Färbung schwach und in sechs Präparaten normal. Nur in vier Präparaten war die Zellzahl eindeutig bestimmbar und in zwei weiteren war die Reaktion zu schwach, um die Anzahl der Kerne mit Gewissheit festlegen zu können. So reichten die Zellzahlen dieser Reihe etwa von sechs bis 17.

Die Reaktion mit dem PG2-Antikörper war in einem von 14 Präparaten negativ und in drei weiteren schwach, die PG2-Reaktionsverteilung war nur selten homogen (7/14). In sechs Präparaten zeigten einzelne Blastomeren, in denen auch in der Hoechst-Färbung keine Kerne nachweisbar waren, eine negative Reaktion mit dem PG2-Antikörper. In den meisten Präparaten (11/14) war ein grobgranuläres subzelluläres Reaktionsmuster mit dem PG2-Antikörper erkennbar (Abb.15). Die Reaktion mit dem MTC02-Antikörper war in vier Präparaten negativ, darunter auch das Präparat mit der negativen Reaktion des PG2-Antikörpers. Eine inhomogene Erscheinung der Reaktion des MTC02-Antikörpers in Form von ungleichmäßiger Verteilung, negativen Bereichen oder starken Intensitätsschwankungen, zeigte sich seltener (5/14) als mit dem PG2-Antikörper. In drei Präparaten zeigte sich in der MTC02-Reaktion ein sehr schmaler positiver Randsaum mit einer gleichzeitig inhomogenen Verteilung und Intensität von PG2. In acht Präparaten war das subzelluläre Reaktionsmuster mit dem MTC02-Antikörper granulär. Nur eines der Präparate dieser Reihe zeigte ein hinsichtlich des granulären Reaktionsmusters mit den normalen Embryonen vergleichbares Ergebnis (Abb.15). In der Doppelmarkierung ergaben sich nur geringe Unterschiede in Form von unterschiedlichen Reaktionsintensitäten einzelner Granula. Eine Zuordnung einzelner PG2-positiver Granula zu MTC02-positiven Granula war häufig möglich.

Nicht nur aufgrund der eingangs beschriebenen Probleme in der Bestimmung der Zellzahl sondern auch wegen der verzögerten Entwicklung der Blastomeren-Klone werden in diesem Abschnitt Embryonen vom 12- bis 25-Zellstadium beschrieben. Sie waren nach 53-56h der Kultur entnommen worden. Allerdings war die Beurteilung der Kernanzahl schwierig, da nicht immer alle Kerne in der Hoechst-Färbung nachweisbar waren. Auffallend war die Schwankungsbreite in der Größe der Kerne in einigen Präparaten (Abb.16, weiße Kreise) und wie schon in den vorangegangenen Stadien die eckige Form der Blastomeren im Vergleich zu der runden Form in Embryonen nach Entwicklung *in vivo* und *in vitro*.

Die Reaktion mit dem PG2-Antikörper war in einem Präparat, in dem auch keine Kerne in der Hoechst-Färbung nachweisbar waren, negativ. In sechs Präparaten zeigten einzelne Blastomeren, in denen kein Kern nachweisbar war, eine negative PG2-Reaktion, (Abb.16, s. Pfeile). In den meisten Fällen (18/20) war die PG2-Reaktion stark. In 12 Präparaten zeigte sich eine inhomogene Verteilung der PG2-Reaktion in Form von starken Intensitätsschwankungen in verschiedenen Bereichen der

Embryonen, einem auffallenden Randsaum niedrigerer Intensität oder negativen Reaktionen. Das subzelluläre Reaktionsmuster war in allen Präparaten granulär. Mit dem MTC02-Antikörper war in allen Blastomeren eine Reaktion nachweisbar. Die Reaktionsintensität des MTC02-Antikörpers war etwas seltener (12/20) stark als die des PG2-Antikörpers. In elf Präparaten war die MTC02-Reaktion homogen (Abb.17) und in neun zeigten sich vor allem zwischen den einzelnen Blastomeren deutliche Intensitätsunterschiede. Alle Präparate zeigten ein granuläres subzelluläres Reaktionsmuster mit dem MTC02-Antikörper. In der Doppelmarkierung war eine schwache MTC02-Reaktion auch in solchen Blastomeren nachweisbar, die keine PG2-Reaktion zeigten (Abb.16, s. Pfeile). Nur in einem Präparat zeigten sich Bereiche mit einer PG2- aber ohne MTC02-Reaktion, die keinem Zellkern zugeordnet werden konnten (Abb.17, s. Pfeile). Eine Zuordnung einzelner PG2-positiver Granula zu MTC02-positiven Granula war häufig möglich.

3.3.2 Kerntransfer mit fetalen Fibroblasten

In diesem Abschnitt werden Embryonen beschrieben, die 4-8h nach dem Kerntransfer aus der Kultur genommen und gefärbt wurden. Zu diesem Zeitpunkt befand sich der größte Teil der Embryonen im 4-Zellstadium. Die Intensität der PG2-Reaktion schwankte sehr: In den meisten beurteilbaren Präparaten (8/11) war die Intensität besonders schwach, in drei Präparaten allerdings besonders stark. Die Verteilung der PG2-Reaktion war in neun Präparaten homogen. In zwei von 11 Präparaten zeigte sich in verschiedenen Bereichen im Embryo eine sehr unterschiedliche Intensität (Abb.18). Vor allem in zentralen Bereichen der Embryonen zeigte sich eine stärkere Intensität mit einem Randsaum niedrigerer Intensität (Abb.18). Das subzelluläre Reaktionsmuster der PG2-Reaktion war in allen Präparaten diffus (Abb.18). Eine MTC02-Reaktion war in allen Blastomeren nachweisbar. Die Reaktionsintensität mit dem MTC02-Antikörper war nur in zwei Präparaten schwach. In den Präparaten, die stark mit MTC02 reagierten, war eine höhere Intensität der Reaktion in zentralen Bereichen des Embryos häufig zu erkennen. Intensitätsschwankungen kamen sowohl bedingt durch Überlagerungen (Abb. 18, s. horizontaler Pfeil) als auch unabhängig von Überlagerungen vor. Das subzelluläre Reaktionsmuster der Reaktion mit dem MTC02-Antikörper war stets granulär. In zwei der drei Präparate, die besonders stark mit dem PG2-Antikörper reagierten, zeigte sich keine entsprechend starke MTC02-Reaktion. In der Doppelmarkierung fiel im subzellulären Reaktionsmuster eine deutlichere Granulierung in der MTC02-Reaktion als in der PG2-Reaktion auf. Eine Zuordnung einzelner PG2-positiver Granula zu positiven MTC02-Granula war wegen der diffusen Reaktion von PG2, wie im 4-Zellstadium anderer Versuchsgruppen, nicht möglich.

In diesem Abschnitt werden Embryonen beschrieben, die 24-36h nach dem Kerntransfer der Kultur zur Färbung entnommen wurden. 10 Präparate im 8- bis 12-Zellstadium wurden in zwei Versuchsreihen gefärbt. In der Dapi-Färbung konnte die Zellzahl eindeutig bestimmt werden, jedoch

stellten sich die Zellkerne im Vergleich zu Kernen in Embryonen nach Entwicklung *in vivo* und *in vitro* teilweise sehr groß und mit sichtbaren Unterschieden im Durchmesser dar (Abb.19, weiße Umrisslinien). In allen Blastomeren war eine PG2-Reaktion nachweisbar. Die fünf Präparate der ersten Versuchsreihe zeigten alle eine starke Reaktionsintensität mit dem PG2-Antikörper und eine homogene Reaktionsverteilung. Selten war eine stärkere Intensität der PG2-Reaktion in zentralen Bereichen. In dieser Färbereihe reagierte ein Präparat nur verschwommen granulär, vier diffus (Abb.19). Die Reaktion mit dem MTC02-Antikörper war in allen Blastomeren nachweisbar. Die Intensität zeigte sich in allen Präparaten stark mit einer homogenen Verteilung. Das subzelluläre Reaktionsmuster war stets granulär. In der Doppelmarkierung war eine Zuordnung einzelner PG2-positiver Granula zu MTC02-positiven Granula aufgrund des diffusen subzellulären PG2-Reaktionsmusters nicht möglich.

Die fünf Präparate der zweiten Färbereihe zeigten in allen Blastomeren eine PG2-Reaktion und eine schwache Reaktionsintensität mit homogener Verteilung. Im subzellulären Reaktionsmuster war die PG2-Reaktion in drei Präparaten nur verschwommen granulär und in zwei Präparaten diffus. Eine Reaktion mit dem MTC02-Antikörper war in allen Blastomeren nachweisbar. Die Reaktionsintensität der MTC02-Reaktion war in vier Präparaten schwach und in einem stark bei einer homogenen Verteilung. Im subzellulären Reaktionsmuster erschien die MTC02-Reaktion granulär. Durch das häufig diffuse Reaktionsmuster des PG2-Antikörpers war eine Zuordnung einzelner PG2-positiver Granula zu MTC02-positiven Granula nur selten nachweisbar.

Die sieben in diesem Abschnitt beschriebenen Embryonen wurden 46-48h aus der Kultur genommen und befinden sich zwischen dem 7- und 20-Zellstadium. In allen Blastomeren war eine Reaktion mit dem PG2-Antikörper nachweisbar. Die Reaktionsintensität der PG2-Reaktion war selten (3/7) stark und die Reaktionsverteilung (5/7) homogen. Auffallend war eine geringere Intensität in zentralen Bereichen der Embryonen und eine stärkere Intensität am Rand (Abb.20). Im subzellulären Reaktionsmuster zeigten die meisten Präparate ein granuläres Reaktionsmuster (4/7), davon zwei ein nur verschwommen granuläres. Alle Blastomeren zeigten eine MTC02-Reaktion. Fünf Präparate reagierten mit dem MTC02-Antikörper schwach und auch die Reaktionsverteilung war in den meisten Präparaten (5/7) inhomogen. Es zeigte sich wie in der PG2-Reaktion ein größerer Bereich im Zentrum der Embryonen mit niedrigerer Intensität. In vier Präparaten konnte ein granuläres subzelluläres Reaktionsmuster mit dem MTC02-Antikörper nachgewiesen werden, drei von diesen zeigten eine nur verschwommen granuläre Reaktion. Drei weitere Präparate zeigten ein diffuses subzelluläres Reaktionsmuster. Diffus reagierende Bereiche zeigten sich vor allem im Zentrum der Embryonen, ein granuläres Reaktionsmuster war am Rand vorhanden (Abb.20). Nur zwei Präparate zeigten eine vergleichbare Reaktion mit Embryonen desselben Stadiums nach Entwicklung *in vivo* oder *in vitro*. Nur ein Präparat zeigte in der Doppelmarkierung ein granuläres Reaktionsmuster mit beiden

Antikörpern. Auffallend war die schwächere Intensität im Zentrum mit einer intensiveren Reaktion am Rand, die in drei Präparaten mit beiden Antikörpern auffiel, aber in der MTC02-Reaktion deutlicher war (Abb.20, s. Pfeile). Eine Zuordnung einzelner PG2-positiver Granula zu einzelnen MTC02-positiven Granula war in Bereichen stärkerer Intensität möglich.

In diesem Abschnitt werden 24 Präparate beschrieben, die 48-54h nach dem Kerntransfer aus der Kultur genommen und in zwei zeitlich getrennten Versuchsreihen gefärbt wurden. Die Zellzahl dieser Embryonen liegt zwischen 11 und 40.

In der ersten Versuchsreihe standen wegen des verzögerten Entwicklungsfortschrittes und der eingeschränkten Entwicklungspotenz nur vier Präparate zur Verfügung. In allen Blastomeren war eine PG2-Reaktion nachweisbar und alle Präparate zeigten eine starke Reaktionsintensität. Eine inhomogene Verteilung der PG2-Reaktion zeigte sich in allen Präparaten. Im Zentrum der Embryonen war die Reaktionsintensität häufig verstärkt mit einem Randsaum niedrigerer Intensität. Das subzelluläre Reaktionsmuster mit dem PG2-Antikörper zeigte sich in allen Präparaten granulär. Die PG2-unabhängige Darstellung der Mitochondrien wurde in diesem Präparat mit CoxIV durchgeführt, mit dem in allen Blastomeren eine Reaktion mit starker Reaktionsintensität nachweisbar war. Auch in der CoxIV-Reaktion zeigte sich in ähnlicher Weise wie mit dem PG2-Reaktion eine inhomogene Verteilung. Ein Randsaum niedrigerer Reaktionsintensität zeigte sich ebenfalls. Das subzelluläre Reaktionsmuster erschien in allen vier Präparaten granulär. Eine Zuordnung einzelner PG2-positiver Granula zu einzelnen CoxIV-positiven Granula war häufig möglich.

In der zweiten Versuchsreihe waren in einem der 20 Präparate keine Kerne in der Hoechst-Färbung nachweisbar. Häufig fiel die unterschiedliche Kerngröße in einem Präparat auf (Abb.21). In allen Blastomeren war eine PG2-Reaktion nachweisbar und in den meisten Präparaten (17/20) zeigte sich eine starke Reaktionsintensität mit dem PG2-Antikörper. Nur ein Präparat fiel durch eine sehr schwache Reaktion auf. Bereiche erhöhter Reaktionsintensität mit dem PG2-Antikörper entsprachen nicht immer Bereichen erhöhter Reaktionsintensität mit dem MTC02-Antikörper und umgekehrt (Abb.21 und 22, s. Pfeile). Die PG2-Reaktion war selten (2/20) homogen verteilt. Es zeigten sich sowohl negative Bereiche am Rand der Embryonen als auch stärkere Reaktionsintensitäten in zentralen Bereichen der Embryonen (Abb.21). Zwei Präparate zeigten ein diffuses subzelluläres Reaktionsmuster mit dem PG2-Antikörper, zwei waren nur verschwommen granulär. In der zweiten Versuchsreihe wurde die PG2-unabhängige Darstellung der Mitochondrien wieder mit dem MTC02-Antikörper durchgeführt. In allen Blastomeren war eine MTC02-Reaktion nachweisbar. Die Reaktionsintensität mit dem MTC02-Antikörper war in 16 Präparaten stark, davon in sieben besonders stark. Selten zeigte sich eine homogene Verteilung (8/20) mit dem MTC02-Antikörper. Es fielen periphere Bereiche sehr schwacher Intensität und verstärkte Intensitäten in zentralen Bereichen der

Embryonen auf (Abb.21). Der MTC02-Antikörper zeigte nur in einem Präparat, in dem auch die PG2-Reaktion diffus erschien, ein diffuses subzelluläres Reaktionsmuster. Ein Präparat fiel durch eine negative Reaktion beider Antikörper im Zentrum auf. Eine Zuordnung einzelner PG2-positiver Granula zu MTC02-positiven Granula konnte häufig getroffen werden.

3.3.3 Kerntransfer mit maternalen Cumuluszellen

Im 4-Zellstadium wurden zwei Versuchsreihen mit insgesamt 17 Präparaten, die nach 4-6h der Kultur entnommen wurden, durchgeführt. In allen Blastomeren konnte eine Reaktion mit dem PG2-Antikörper nachgewiesen werden. Vor allem bezüglich der Intensität ergaben sich unterschiedliche Ergebnisse. In den neun Präparaten der ersten Versuchsreihe war in allen Blastomeren eine PG2-Reaktion nachweisbar und alle Präparate zeigten eine starke Reaktionsintensität. Eine inhomogene Reaktionsverteilung des PG2-Antikörpers mit Intensitätsschwankungen sowohl innerhalb einer Blastomere als auch zwischen den Blastomeren (Abb.23) zeigte sich in zwei Präparaten. Das subzelluläre Reaktionsmuster mit dem PG2-Antikörper war in drei Präparaten granulär. Die PG2-unabhängige Darstellung der Mitochondrien wurde nur in zwei Präparaten mit dem MTC02-Antikörper durchgeführt, in den anderen Fällen wurde der CoxIV-Antikörper angewandt. In allen Blastomeren war jedoch eine entsprechende Reaktion nachweisbar. Die MTC02- und die CoxIV-Reaktion zeigten beide eine starke Reaktionsintensität. Intensive Bereiche in der PG2-Reaktion waren nicht immer auch in der PG2-unabhängigen Darstellung der Mitochondrien intensiv und umgekehrt (Abb.23, s. Pfeile). Die MTC02-Reaktion zeigte sich in allen Präparaten homogen. Die CoxIV-Reaktion war in zwei Präparaten inhomogen mit starken Intensitätsschwankungen in unterschiedlichen Bereichen der Embryonen. Das subzelluläre Reaktionsmuster mit dem MTC02-Antikörper zeigte sich in den beiden gefärbten Präparaten granulär, mit dem CoxIV-Antikörper nur in einem von sieben. Oft war in der Doppelmarkierung die Granulierung in der PG2-Reaktion feiner als in der PG2-unabhängigen Darstellung der Mitochondrien (Abb.23, C und D). An den Kontaktstellen der Blastomeren fanden sich häufig Bereiche negativer Reaktionen mit beiden Antikörpern. Diese Reaktionen sind bedingt durch ein Auseinanderfallen des Blastomerenverbandes während der Einbettung auf Objektträger. Eine Zuordnung einzelner PG2-positiver Granula zu MTC02-positiven Granula war in solchen Präparaten möglich, die ein granuläres subzelluläres PG2-Reaktionsmuster aufwiesen.

In den acht Präparaten der zweiten Versuchsreihe zeigten sich die Zellkerne in der Hoechst-Färbung oft auffallend groß und mit großer Schwankungsbreite in der Kerngröße (Abb.24, weiße Umrißlinien). Vier Präparate zeigten eine sehr schwache Reaktion mit dem PG2-Antikörper (Abb.24), in vier weiteren Präparaten war die PG2-Reaktion negativ. Die Verteilung der PG2-Reaktion war in den vier Präparaten mit schwacher Intensität homogen mit einem diffusen subzellulären Reaktionsmuster. Eine

MTC02-Reaktion war in allen Blastomeren nachweisbar, jedoch war auch bei homogener Reaktionsverteilung die Reaktionsintensität mit dem MTC02-Antikörper, der in dieser Versuchsreihe zur PG2-unabhängigen Darstellung der Mitochondrien angewandt wurde, in allen Präparaten gering. Das subzelluläre Reaktionsmuster des MTC02-Antikörpers war in allen gefärbten Embryonen granulär (Abb.24), in einem jedoch nur verschwommen granulär. Eine Zuordnung einzelner PG2-positiver Granula zu MTC02-positiven Granula war aufgrund des diffusen subzellulären Reaktionsmusters der PG2-Reaktion nicht möglich.

In diesem Abschnitt werden 12 Präparate beschrieben, die nach 24-32h aus der Kultur genommen wurden und Zellzahlen von 8-20 aufweisen. Eine PG2-Reaktion war in allen Blastomeren nachweisbar. Die Reaktionsintensität mit dem PG2-Antikörper war in allen Präparaten stark, jedoch fanden sich in fünf Präparaten negative Areale in unterschiedlichen Bereichen der Embryonen. Sechs Präparate zeigten eine inhomogene Verteilung der PG2-Reaktion mit z.T. ausgeprägten negativen Arealen und Intensitätsschwankungen in unterschiedlichen Bereichen des Embryos (Abb.25). In einem Präparat war eine stärkere Intensität der PG2-Reaktion in zentralen Bereichen des Embryos auffällig. Vier Präparate zeigten ein diffuses subzelluläres Reaktionsmuster mit dem PG2-Antikörper, ein weiteres zeigte eine nur verschwommene Granulierung. Eine MTC02-Reaktion konnte in allen Blastomeren nachgewiesen werden. In fünf Präparaten zeigten sich auch in der MTC02-Reaktion deutlich negative Areale. Die MTC02-Reaktion war wie die PG2-Reaktion, wenn sie nachgewiesen werden konnte, stark. Das subzelluläre Reaktionsmuster mit dem MTC02-Antikörper war in einem Präparat diffus, in allen anderen granulär (Abb.25). Nur fünf von 12 Präparaten zeigten eine Granulierung in den Reaktionen beider Antikörper, die der in Embryonen nach Entwicklung *in vivo* und *in vitro* entsprach. Unterschiede in der Größe der Granula der beiden Reaktionen waren häufig (Abb.25), eine Zuordnung einzelner PG2-positiver Granula zu MTC02-positiven war häufig möglich.

Für die Versuchsreihe im Morulastadium blieben nur vier Präparate, da nur wenige Präparate aufgrund der verzögerten Entwicklung der Embryonen dieses Stadium erreichten. Die Embryonen, die in diesem Abschnitt beschrieben werden, wurden nach 48-56h aus der Kultur genommen. Unterschiede in der Größe der Kerne waren in diesen Präparaten nicht zu beobachten. In allen Blastomeren war eine PG2-Reaktion nachweisbar. Alle vier Präparate zeigten eine starke Reaktionsintensität mit dem PG2-Antikörper, obwohl zwei Präparate eine inhomogene Reaktionsverteilung mit negativen Arealen in unterschiedlichen Bereichen der Embryonen zeigten (Abb.26). Das subzelluläre Reaktionsmuster war in drei Präparaten granulär. Die PG2-unabhängige Darstellung der Mitochondrien wurde mit dem CoxIV-Antikörper durchgeführt. Eine CoxIV-Reaktion war in allen Blastomeren nachweisbar, jedoch zeigten sich auch in der CoxIV-Reaktion in einem Präparat negative Areale in unterschiedlichen Bereichen der Embryonen. Wenn eine CoxIV-Reaktion nachgewiesen werden konnte war die Intensität aber stark. Die Verteilung der CoxIV-Reaktion war in den meisten Fällen homogen (3/4)

und das subzelluläre Reaktionsmuster (3/4) granulär. Die Granulierung war allerdings nicht so deutlich wie in der MTC02-Reaktion. In der CoxIV Reaktion zeigte sich eine sehr feine Granulierung, die aber überall erkennbar war (Abb.26). Ein Präparat zeigte sowohl mit dem PG2- als auch mit dem CoxIV-Antikörper ein diffuses Reaktionsmuster. Wie schon zuvor beobachtet, stimmten Bereiche erhöhter Reaktionsintensität der beiden Antikörper nicht immer überein (Abb.26, s. Pfeile). Eine Zuordnung einzelner PG2-positiver Granula zu MTC02-positiven Granula war in Bereichen besonders starker Reaktionsintensitäten nicht möglich.

3.3.4 Parthenogenetische Embryonen im Morulastadium

Acht parthenogenetische Embryonen vom 14- bis zum 24-Zellstadium, die während der Klonierungsversuche als Kontrolle der Stimulation erzeugt wurden, standen für diese Versuchsreihe zur Verfügung. In der Hoechst-Färbung war die variierende Größe der Zellkerne auffallend (Abb.27). Eine PG2-Reaktion war in allen Blastomeren nachweisbar und in den meisten Fällen (7/8) war die Reaktionsintensität stark (Abb.27). In zwei Präparaten fielen einzelne Blastomeren mit besonders starker Reaktionsintensität auf. Die Reaktionsverteilung mit dem PG2-Antikörper war in zwei Präparaten inhomogen, mit Intensitätsschwankungen in unterschiedlichen Bereichen der Embryonen. Das subzelluläre Reaktionsmuster des PG2-Antikörpers war in den meisten Fällen (7/8) granulär (Abb.27). Auch eine MTC02-Reaktion war in allen Blastomeren nachweisbar. Die Intensität der MTC02-Reaktion war jedoch in sieben von acht Präparaten schwach (Abb.27) und die Reaktionsverteilung in fünf Präparaten inhomogen. Es zeigte sich vor allem im Zentrum der Embryonen eine schwache Reaktionsintensität mit dem MTC02-Antikörper (Abb.27). Das subzelluläre Reaktionsmuster der MTC02-Reaktion war in fünf Präparaten granulär, im Vergleich zur Granulation der PG2-Reaktion aber nur verschwommen granulär (Abb.27). Im Zentrum der Embryonen war das MTC02-Reaktionsmuster oft diffus mit einem Randsaum, der granulär reagierte (Abb.27, s. Balken), wie im 16-Zellstadium in Embryonen nach Kerntransfer mit fetalen Fibroblasten beschrieben. In zentralen Bereichen schwacher MTC02-Intensität war die PG2-Intensität häufig stark. Eine Zuordnung einzelner PG2-positiver Granula zu MTC02-positiven Granula war in zentralen Bereichen der Embryonen aufgrund der eher verschwommenen und diffusen Reaktion selten möglich. In Bereichen mit einem granulären subzellulären MTC02-Reaktionsmuster, besonders am Rand der Embryonen, war eine solche Zuordnung allerdings möglich.

3.4 Embryonen nach Behandlung mit Transkriptionsinhibitoren

3.4.1 α -Amanitin-Behandlung

Von 32 Embryonen, die 48h mit α -Amanitin inkubiert wurden, entwickelte sich einer bis zum 12-Zellstadium, ansonsten reichte die weiteste Entwicklung bis zum 8-Zellstadium. In allen Blastomeren war eine PG2-Reaktion nachweisbar. Sämtliche Präparate zeigten eine gleichmäßig starke Intensität mit dem PG2-Antikörper (Abb.28). Auffallend war auch in diesen Präparaten ein dunkler Randsaum niedrigerer Intensität in der Reaktion mit dem PG2-Antikörper (Abb.28, s. Balken). In manchen Präparaten waren Intensitätsschwankungen, wie in 4-Zellembryonen nach Entwicklung *in vivo* und *in vitro* beschrieben, zu finden. Das subzelluläre PG2-Reaktionsmuster stellte sich in allen Präparaten diffus dar. Eine Reaktion mit dem MTC02-Antikörper war in allen Blastomeren nachweisbar und die Reaktionsintensität war in allen Präparaten stark. Das subzelluläre Reaktionsmuster der MTC02-Reaktion zeigte sich in neun Präparaten diffus, in allen anderen allerdings blieb eine Granulierung erkennbar, die jedoch häufig grob war (Abb.28). Oft zeigten sich Unterschiede in der Verteilung der Antikörper in einem Embryo. Bereiche mit starker MTC02-Intensität zeigten nicht in allen Fällen auch eine starke PG2-Intensität und umgekehrt (Abb.28, s. Pfeile). Eine Zuordnung einzelner PG2-positiver Granula zu MTC02-positiven Granula war aufgrund des diffusen subzellulären PG2-Reaktionsmuster und der schwachen Intensität nicht möglich.

3.4.2 Actinomycin-D-Behandlung

Bei den 26 Präparaten, die 50h mit Actinomycin-D inkubiert wurden, reichte die weiteste Entwicklung nur bis zum 4-Zellstadium. Oft waren die Kerne im Vergleich zu Embryonen nach Entwicklung *in vivo* und *in vitro* sehr groß und auseinandergebrochen. In allen Blastomeren war eine PG2-Reaktion nachweisbar. Drei Präparate waren in der Reaktionsintensität mit dem PG2-Antikörper schwach (Abb. 29). Die Reaktionsverteilung war in sechs Präparaten inhomogen. Es zeigte sich vor allem in zentralen Bereichen der Embryonen eine stärkere Reaktionsintensität, die in einigen Fällen an Überlagerungsstellen der Blastomeren lokalisiert war (Abb.29). Um diese Bereiche stärkerer Intensität zeigte sich ein breiter Randsaum schwächerer, in manchen Fällen (Abb.29) besonders schwacher Intensität. Zwei von 26 Präparaten zeigten ein granuläres subzelluläres Reaktionsmuster mit dem PG2-Antikörper, alle anderen ein diffuses. Eine MTC02-Reaktion war in allen Blastomeren nachweisbar. Alle Präparate reagierten mit dem MTC02-Antikörper stark. In acht Präparaten war ein deutlicher Randsaum erkennbar, dreimal fiel eine stärkere Intensität in zentralen Bereichen des Embryos auf (Abb.29, s. Pfeile). In einem Präparat im 2-Zellstadium fiel in einer der beiden Blastomeren eine MTC02 negative Reaktion auf. Das subzelluläre MTC02-Reaktionsmuster war in den meisten Fällen (25/26) granulär. Eine Zuordnung einzelner PG2-positiver Granula zu MTC02-positiven Granula war aufgrund des diffusen subzellulären PG2-Reaktionsmuster und der schwachen Intensität nicht möglich.

4. Diskussion

Die vorliegenden immunhistochemischen Färbungen an Kaninchenembryonen nach Entwicklung *in vivo*, *in vitro* und nach Kerntransfer mit verschiedenen Kernspenderzellen, haben innerhalb und zwischen den Populationen der untersuchten Stadien deutliche Unterschiede im Reaktionsverhalten der mitochondrialen Marker gezeigt. Diese Unterschiede wurden bei jedem Antikörper in 3 Kategorien festgestellt: 1. In der allgemeinen Reaktionsintensität (als semiquantitativen Hinweis auf die Proteinkonzentration), 2. In der intrazellulären Verteilung (als Hinweis auf intrazelluläre Kompartimente) und 3. Im subzellulären Reaktionsmuster (als Hinweis auf die Assoziation mit Mitochondrien oder anderen Organellen). Besonders auffällig war ein diffuses, vom normalen Mitochondrien-assoziierten Muster abweichendes subzelluläres Reaktionsmuster des PG2-Antikörpers im 4-Zellstadium nahezu aller Embryonenpopulationen; hiervon ausgenommen waren lediglich das 4-Zellstadium der Embryonen nach Kerntransfer mit Blastomeren, in denen die eingesetzten Antikörper regelmäßig eine sehr schwache Reaktion zeigten. Die konstitutionellen mitochondrialen Marker MTC02 und CoxIV dienten in den meisten Fällen als zuverlässige Parameter für die Anwesenheit und Dichte der Mitochondrien. Mit der Dapi-Färbung ließ sich die Zahl der Blastomeren in den meisten Fällen zuverlässig bestimmen und es konnte eine Aussage über die Kernbeschaffenheiten (z.B. über Größe und Form) in den untersuchten Embryonen gemacht werden. Damit ließ sie auch Rückschlüsse auf fehlerhafte Entwicklung der untersuchten Klone zu.

Das Reaktionsverhalten der eingesetzten Antikörper in normalen Embryonen nach Kultivierungsbeginn 24h p.c. unterschied sich nur gering von dem in Embryonen nach Kerntransfer. Größere Unterschiede fanden sich in normalen Embryonen nach Kultivierungsbeginn 19h p.c., die eine schwächere Reaktionsintensität und eine inhomogenere Verteilung der Antikörper aufwiesen als die Embryonen nach Kultivierungsbeginn 24h p.c.. Parthenogenetische Embryonen zeigten ein Reaktionsverhalten des PG2-Antikörpers, das dem in Embryonen nach Kultivierungsbeginn 24h p.c. und nach Entwicklung *in vivo* nahe kommt. Das Reaktionsverhalten des MTC02-Antikörpers in parthenogenetischen Embryonen zeigte im Gegensatz dazu eine schwächere Reaktionsintensität und eine inhomogenere Reaktionsverteilung mit überwiegend diffusem subzellulärem Reaktionsmuster. Versuche, das offensichtlich Mitochondrien-unabhängige PG2-Reaktionsmuster im 4-Zellstadium auf die einsetzende zygotische Transkription zurückzuführen, scheiterten daran, dass sich die Embryonen nach Inkubation mit Transkriptioninhibitoren nicht weit genug entwickeln konnten und das Reaktionsverhalten der Kontrollembryonen mit Kultivierungsbeginn 19h p.c. nicht äquivalent war zu Embryonen mit Entwicklung *in vivo*.

Bevor die Ergebnisse im Einzelnen diskutiert und mit aktuell veröffentlichten Daten verglichen werden (Kap. 4.2), sollen zunächst die verwendeten Methoden (hierbei v.a. die Gewebepreparation

und Immunhistochemie sowie die Transkriptionshibierung und das Klonierungsprotokoll) auf Ihre Reproduzierbarkeit und Validität untersucht werden (Kap. 4.1). Die Rolle der Mitochondrien in der frühembryonalen Entwicklung und nukleären Reprogrammierung soll ebenfalls betrachtet und die daraus folgenden Schlüsse für die hier verwendete Methode diskutiert werden (Kap. 4.2.4). Abschließend (Kapitel 4.3) soll die Bedeutung der Ergebnisse für unser Verständnis von der frühembryonalen Entwicklung und für die Perspektiven des reproduktiven Klonierens beschrieben werden.

4.1 Methodik

4.1.1 Gewebearbeitung, Immunhistochemie, Modellorganismus

Ein besonderes Problem in der Bearbeitung der Embryonen, die sich *in vivo* und *in vitro* weiterentwickeln konnten, stellte die mukoid Ummantelung („Mukolemm“ oder „Neozona“ (Leiser, R. et Denker, H.W. 1988)) der Zona Pellucida dar, deren Entfernung mit der Mikroschere und Pinzette sich als schwierig erwies und nicht selten zu Beschädigung und Verlust der Embryonen führte. Versuche, das Mukolemm enzymatisch mit Tyrode's Säure oder Pronase zu entfernen, führten zu stark beeinträchtigten Reaktionen der Antikörper und zur Beschädigung der Embryonen, die durch die Behandlung mit Tyrod's Säure teilweise noch während der Behandlung zerfielen. Die Entfernung der Zona Pellucida mit Tyrod's Säure ist ein etabliertes Verfahren für die Bearbeitung von Mäuseembryonen, die Verwendung von Pronase auch im Kaninchen (Patrick Chesné, pers. Mitteilung). Aufgrund der wegen des Mukolemms langen Einwirkzeit, ist dieses Verfahren im Kaninchenembryo allerdings nur schwer zu kontrollieren und verursacht so schnell Schäden an den Blastomeren. Die einzige Optimierungsmöglichkeit der Präparationen bot ein scharfes Präparationsbesteck und häufiges Wechseln der Petrischalen, um die Anheftung von, durch die Arbeit mit Mikroschere und Pinzette entstehenden Kunststoffspänen am Präparationsbesteck, zu vermeiden.

Der mitochondriale keimzellspezifische Antikörper PG2 zeigt (in Kombination mit dem Zweitantikörper IgG-Cy3) ein differenziertes Reaktionsmuster, das klare Unterschiede zwischen einzelnen Zellstadien und verschiedenen Populationen ausweist. Sein Reaktionsverhalten gibt Hinweise auf fehlerhafte Entwicklung der Embryonen durch Zuordnung des PG2-Reaktionsmusters zu Mitochondrien in entsprechenden Embryonen und lässt dadurch auch Rückschlüsse auf Fehler im Versuchsprotokoll zu. Für die genaue Auswertung dieser Hinweise ist allerdings die Bestimmung des biochemischen Korrelates des PG2 Epitops wichtig. Die Annahme, dass sich hinter dem PG2-Epitop ein Protein verbirgt, basiert auf der Erkenntnis, dass es auf Aceton fixierten Gefrierschnitten nachweisbar ist und es sich daher nicht um ein Lipid handeln kann. Auch nach Behandlung von

Gefrierschnitten mit deglykosylierenden Enzymen bleibt das PG2-Epitop nachweisbar und kann somit auch keinen Zuckerrest darstellen (Demus, U. und Püschel, B., pers. Mitteilung).

Der gegen ein konstitutives Mitochondrienprotein gerichtete Antikörper MTC02 (in Kombination mit dem eingesetzten Zweitantikörper IgG1-FITC), erweist sich als zuverlässige Kontrolle zur PG2-Reaktion. Das subzelluläre Reaktionsmuster zeigte sich in der überwiegenden Mehrzahl aller untersuchten Stadien granulär und liefert bei diffusem Erscheinungsbild Hinweise auf fehlerhafte Entwicklungsschritte in den Embryonen oder Fehler im Versuchsprotokoll, wie z. B. nach Behandlung mit Tyrode's Säure und Pronase. Der Antikörper CoxIV erkennt spezifisch die Cytochromoxygenase IV an der inneren Mitochondrienmembran. Dieser Antikörper zeigt (in Kombination mit dem Zweitantikörper IgG2a-FITC) ein überwiegend diffuses Reaktionsmuster in allen Stadien. Besonders im Vergleich zu MTC02 erwies er sich als weniger nützlich, da er aufgrund des häufig diffusen Reaktionsmusters keinen sicheren Vergleich zum Reaktionsmuster von PG2 zuließ.

Zur Beschreibung und Auswertung der immunhistochemischen Färbungen wurden die drei Reaktionscharakteristika „Reaktionsintensität“, „Reaktionsverteilung“ und „subzelluläres Reaktionsmuster“ gewählt. Die Reaktionsintensität wird als Parameter für die Proteinbiosynthese mit ihren drei Hauptschritten Transkription, Translation und posttranslationelle Modifikation betrachtet. Der MTC02-Antikörper (Biocharta, San Diego (USA)) als konstitutionelles Membranprotein der Mitochondrien ist in seiner Reaktion abhängig von Mitochondrien und signalisiert daher exakt deren Vorkommen. Der CoxIV-Antikörper (Mobitech, Göttingen) markiert ein konstitutionelles Enzym der Atmungskette, ist also zusätzlich zum Vorhandensein von Mitochondrien auch von der Aktivität eines mitochondrialen Enzyms abhängig und tritt daher nur dort auf, wo Mitochondrien auch aktiv sind. Die Reaktion des PG2-Antikörpers liefert eine Möglichkeit, die Aktivität der PG2-Proteinbiosynthese im Vergleich zu den beiden bekannten Proteinen MTC02 und CoxIV abzuschätzen. Die Reaktionsverteilung der Antikörper spiegelt die intrazelluläre Verteilung und somit die lokale Produktion und den intrazellulären Transport der untersuchten Proteine zu den verschiedenen Abschnitten der Zelle wider. Hierbei zeigt der MTC02-Antikörper die bloße Existenz und Position von Mitochondrien an, der CoxIV-Antikörper zeigt die Position aktiver Mitochondrien an und der PG2-Antikörper zeigt die Korrelation der Proteinbiosynthese mit vorhanden oder aktiven Mitochondrien an. Das subzelluläre Reaktionsmuster steht für die subzelluläre Verteilung, d.h. die Assoziierung der Mitochondrien mit den jeweiligen Epitopen der Antikörper. Man kann daher annehmen, dass das MTC02-Epitop vollständige Mitochondrien markiert, das CoxIV-Epitop vollständige und aktive Mitochondrien und das PG2-Epitop ein Teil ist von vorhandenen aktiven Mitochondrien mit einer wahrscheinlichen Spezialisierung der PG2-positiven Mitochondrien für Keimzellen.

Die Technik der Immunhistochemie bietet die Möglichkeit (z.B. im Gegensatz zum Nachweis von mRNA mit Hilfe von in situ Hybridisierungen), Ergebnisse auf Proteinebene schon nach kurzer Zeit zu erhalten. Die Doppelfärbungen können innerhalb eines Tages durchgeführt und ausgewertet werden, wobei eine Verkürzung der benötigten Zeit noch durch evt. mögliche Reduzierung der einzelnen Inkubationsschritte erreicht werden kann - eine Optimierungsmöglichkeit, die in der vorliegenden Arbeit nicht systematisch ausgetestet werden konnte.

Das Kaninchen als Modellorganismus bietet sich u.a. dadurch an, dass frühembryonale Stadien - von der befruchteten Eizelle bis zur Blastozyste – verhältnismäßig leicht gewonnen werden können. Die Uteri und Eileiter lassen sich leicht präparieren und durchspülen (Gregory, P. W., 1930), die gewonnenen Embryonen sind leicht zu manipulieren und zu kultivieren. In der Biotechnologie wird das Kaninchen verstärkt genutzt, da es Vorteile gegenüber anderen Labortieren in der Erforschung verschiedener physiologischer Funktionsstörungen bietet (Hoeg, J.M. et al., 1996; Chen, J.M. et al., 2001). Physiologische Manipulationen können im Kaninchen nicht nur aufgrund seiner Größe leichter ausgeführt werden als in der Maus, es ist auch phylogenetisch enger mit Primaten verwandt als Nagetiere (Graur, D. et al., 1996). Aktuell wird die Benutzung des Modellorganismus Kaninchen beschränkt auf die Produktion von Fremdproteinen, die jedoch weit verbreitet und sogar zu Forschungszwecken kommerziell betrieben wird (Stinnackre, M.G. et al., 1997). Daher würde sicheres Klonieren von Kaninchen, verbunden mit genetischen Modifikationen, die mögliche Nutzung dieser Spezies in der Biotechnologie deutlich erweitern.

Unter anderen Gesichtspunkten ergeben sich auch Nachteile: 1. Die Haltung der Kaninchen ist durch ihre Größe platzaufwendig und teuer, 2. die Generationsdauer von einer Generation zur nächsten ist mit etwa 6 Monaten relativ lang. Die Herstellung transgener Kaninchen wird so erschwert. Darüber hinaus ist es - wie bei anderen Säugern auch - nicht einfach, zu bestimmten Zeitpunkten einer Trächtigkeit bestimmte Zellstadien zu erhalten (Ménézo, Y., Renard, J.-P., 1993). Dieses Problem zeigte sich auch in dieser Studie, v.a. während der Untersuchung von Embryonen nach Entwicklung in vivo. Ein Zeitplan für die Teilungsstadien konnte nur annäherungsweise bestimmt werden. Zusätzlich sind viele andere Verfahren und Methoden, die in Modellorganismen wie Zebrafisch, Krallenfrosch oder Maus seit langem eingesetzt werden und dort optimiert sind, im Kaninchen noch nicht etabliert und können nicht unverändert auf den Organismus Kaninchen übertragen werden.

4.1.2 Transkriptionsinhibitoren

Actinomycin-D und α -Amanitin wurden zur Transkriptionsinhibierung vom 1-Zellstadium an eingesetzt, um durch Transkriptionshemmung die Synthese neuer tRNA (u.a. die von PG2) zu unterdrücken und so eine Analyse der embryonalen Produktion des PG2-Epitops zu ermöglichen, während andere Funktionsabläufe der Zelle nicht beeinflusst werden. Auf diese Weise sollte untersucht werden, ob das diffuse Reaktionsmuster von PG2 im 4-Zellstadium von der MZT (maternal to zygotic transition) - dem Wechsel von rein maternaler Transkriptionsaktivität zu rein zygotischer Transkriptionsaktivität im frühen Embryo (Manes, C., 1993) [s.o.] - abhängig ist. Zwar zeigen die α -Amanitin inkubierten Embryonen ein ausschließlich diffuses Reaktionsmuster mit PG2, jedoch ist in den bis zum 14-Zellstadium entwickelten Kontrollembryonen, die nicht mit α -Amanitin inkubiert wurden, nur in sechs von 20 ein granuläres PG2 Reaktionsmuster erkennbar. Die mit Actinomycin-D behandelten Embryonen entwickelten sich nur bis zum 4-Zellstadium. In zwei von 26 insgesamt inkubierten und gefärbten Embryonen zeigte sich ein granuläres Reaktionsmuster. Die Kontrollembryonen (Entwicklungspotenz bis zum 22-Zellstadium) zeigten zwar in elf von 19 Embryonen ein granuläres subzelluläres Reaktionsmuster, lassen aber keine genaueren Rückschlüsse im Vergleich zu den inkubierten Embryonen zu, da sie in den Färbungscharakteristika Intensität, Verteilung und Reaktionsmuster keine gleichwertigen Ergebnisse zu normalen Embryonen mit Kultivierungsbeginn 24 p.c. zeigten. Das diffuse subzelluläre Reaktionsmuster könnte dann für einen Verlust an maternalem PG2-Protein (oder einem mitochondrialen Bindungsprotein) sprechen. Wenn das PG2-Epitop nach dem 4-Zellstadium auf das zygotische Genom angewiesen wäre, hätte es also in allen mit α -Amanitin behandelten Embryonen, die das 4-Zellenstadium überschritten hatten, negativ sein müssen. Eine plausiblere Interpretation des diffusen subzellulären PG2-Reaktionsmusters spricht für einen maternalen Ursprung des PG2-Epitops und sein "Überleben" über das 4-Zellstadium hinaus und möglicherweise für das vorübergehende Fehlen eines zygotischen Bindungsproteins.

In diesem Versuch konnte also noch keine definitive Antwort auf die Frage nach dem Ursprung des veränderten Reaktionsmusters von PG2 im 4-Zellstadium gefunden werden. Weitere Versuche mit Transkriptionsinhibitoren und verbesserten Kultivierungsbedingungen für die Kontrollembryonen (die 19h p.c. aus den Uteri gespült wurden) können zusätzliche Lösungsmöglichkeiten darstellen. Die biochemische Identifizierung des PG2-Epitops und des zugrunde liegenden Gens wäre auch hier essentiell, um die Frage untersuchen zu können, ob es rein maternal vererbt wird oder zu den in der frühen Entwicklung wichtigen „Imprinted“-Genen gehört.

4.1.3 Kerntransfer

Die in dieser Arbeit untersuchten, durch Kerntransfer erzeugten Embryonen, wurden nach einem Protokoll gewonnen, das die Geburt des ersten mit adulten Zellkernen (maternalen Cumuluszellen) klonierten Kaninchens ermöglichte (Chesné, P. et al., 2002). In diesem Protokoll wurde durch Modifikationen aktueller (als erfolgreich bestätigter) Klonierungsprotokolle anderer Spezies, die für das Kaninchen spezifische schnelle Kinetik des Zellzyklus und das enge Zeitfenster der Implantationszeit nach dem Transfer der Embryonen in das Empfängertier in Betracht gezogen. Nach der zweiten elektrischen Stimulation (die der Fusion der Eizelle mit dem Spenderkern folgt) wurde die Inkubation der Embryonen in Cycloheximid und 6-Dimethylaminopurin, die den Abschluss der artifiziellen Metaphase II der Eizelle erleichtern, aber nachteilige Auswirkungen auf den Zellzyklus haben (Soloy, E. et al., 1997; Meyer, L. et Kim, S.H., 1997), so weit wie möglich verringert, da die Kaninchenzygote schon sehr früh nach der Aktivierung in die S-Phase eintritt (Szöllösi, D., 1966). Die Implantationsrate der transferierten Embryonen konnte deutlich erhöht werden, indem die Embryonen in Muttertiere transferiert wurden, die 22h später mit einem vasktomierten Männchen zusammengesetzt wurden als die Oozytenspendertiere (Chesné, P. et al., 2002). Bei gleicher Deckungszeit konnte eine Implantationsrate von 7,7% beobachtet werden, bei Begattung des Empfängertieres 16h später, lag die Implantationsrate bei 20,3%. Allerdings war zur Mitte der Schwangerschaftszeit in diesen Tieren keine Schwangerschaft nachweisbar (Chesné, P. et al., 2002). Wenn die Begattungszeit des Empfängertieres um 22h verschoben wurde (eine Zeitspanne, die kompatibel sein kann mit der Vollzeitentwicklung befruchteter Eizellen) konnte eine Schwangerschaft in 37% (entsprechend 10 Tieren) am vierzehnten Tag nachgewiesen werden. Vier dieser Tiere konnten schließlich sechs lebende Junge zur Welt bringen. Somit konnten eine Verkürzung des klassischen Aktivierungsprozesses und der Transfer der rekonstruierten Embryonen in Empfängertiere, die 22h später als die Oozytenspendertiere gedeckt wurden, als entscheidende Beeinflussungen der Entwicklungspotenz von Kerntransferembryonen und möglicher Garant für erfolgreiches Klonieren in allen Spezies postuliert werden.

4.2 Funktionelle Aspekte im Vergleich der normalen und künstlichen embryonalen Entwicklung

Die zelluläre - also zytoplasmatische und nukleäre - Maschinerie der befruchteten Eizelle erwartet zwei unterschiedliche Chromosomensätze und ist nach der Transplantation eines somatischen Zellkerns durch die fehlende Asymmetrie „verunsichert“ (Haaf, T., 2001). Defekte in den unterschiedlichen elterlichen Kernkompartimenten des frühen Embryos können ein wichtiger Grund für Aborte während der Präimplantationsphase sowohl in Embryonen nach Kerntransfer als auch nach in vitro Fertilisation sein (Haaf, T., 2001). Aktuelle „Imprinting“-Modelle gehen von einer eltern-

spezifischen Reprogrammierung während der Keimzellentwicklung aus und vermuten spermatoides und von der Eizelle stammendes „Imprinting“ erst in späteren Stadien der Entwicklung (Constancia, M. et al., 1998; Brannan, C.I. et Bartolomei, M.S., 1999). Auch die zwischen Kern- und Mitochondrien-DNA herrschende Disharmonie kompliziert wahrscheinlich die Klonierungstechnologie und die experimentelle Rekonstruktion von Embryonen durch zytoplasmatischen Transfer oder Kerntransfer (Cummins, J.M., 2002). Die folgende Diskussion soll untersuchen, ob eine Disharmonie zwischen Zytoplasma und Zellkern auch auf der Ebene der mitochondrialen Differenzierung festgestellt werden kann und ob die mitochondriale Differenzierung sich eignet, eine solche Disharmonie als frühen Parameter und möglicherweise sogar ursächlich für das Scheitern des Klonierungs- und Reprogrammierungsvorganges ein- oder anzuführen.

4.2.1 Entwicklung in vitro mit Kultivierungsbeginn 24h p.c. oder 19h p.c. im Vergleich zur Entwicklung in vivo

Die Ergebnisse an Embryonen mit Kultivierungsbeginn 24h und 19h p.c. und mit Entwicklung in vivo zeigten Unterschiede, sowohl in der Reaktionsintensität als auch in der Verteilung und dem Reaktionsmuster der mitochondrialen Antikörper. Ebenso finden sich Unterschiede in den Ergebnissen der Entwicklung bei Embryonen mit Kultivierungsbeginn 24h p.c. und 19h p.c..

In Embryonen im 2-Zellstadium nach Entwicklung in vivo zeigte sich mit dem PG2-Antikörper und dem MTC02-Antikörper in den meisten Fällen eine starke Reaktionsintensität bei homogener Reaktionsverteilung und granulärem Reaktionsmuster. Die Verteilung der MTC02-Reaktion war jedoch deutlich häufiger homogen als die der PG2-Reaktion. In der Reaktion mit dem CoxIV-Antikörper fiel ein überwiegend diffuses Reaktionsmuster auf, das möglicherweise durch eine während der Gewinnung und Fixierung der Embryonen eingetretenen Störung der mitochondrialen Struktur auf Ebene der Atmungskette hervorgerufen sein könnte. Vor allem aber präsentierte sich ein peripherer Randsaum niedrigerer PG2-Intensität. Dieser Randsaum könnte sich aus einem Abbau des PG2-Epitops in peripheren Bereichen des Embryos im Zuge von Degradation des maternalen Proteins erklären oder für eine Umverteilung des Epitops in zentrale Bereiche sprechen. Letzteres könnte ausserdem eine Erkennung keimzellspezifischer Mitochondrien und deren Selektion bedeuten, obwohl gegenwärtig - zumindest bei der Maus - angenommen werden kann, dass Keimzellen erst während der Gastrulation segregiert werden und bis zur Gastrulation sich alle Epiblastzellen zu Keimzellen differenzieren können (Saitou, M. et al., 2002). In der Mauseizelle sind Mitochondrien asymmetrisch verteilt, erscheinen aber in zur Befruchtung reifen Eizellen homogen verteilt (Van Blerkom, J. et Runner, M.N., 1984; Calarco, P., 1995). Ähnlich zeigen Ratteneizellen eine perinukleäre Ansammlung von Mitochondrien, die sich im weiteren Verlauf in eine subkortikale Verteilung verändert (Zernicka-Goetz et al., 1993). Im Hamster hingegen durchlaufen Mitochondrien eine Umorganisation von einer

homogenen Verteilung in der Eizelle in eine umschriebenen perinukleäre Organisation im Pronukleus- und 2-Zellstadium (Barnett et al., 1996) und in befruchteten menschlichen Zygoten wurde eine Akkumulation von Mitochondrien um die Pronuklei beschrieben (Noto, V. et al., 1993; Van Blerkom, J. et al., 2000).

Im 4-Zellstadium nach Entwicklung *in vivo* war die Reaktionsintensität mit dem PG2- und dem MTC02-Antikörper stark, die Reaktionsverteilung mit dem PG2-Antikörper in den meisten Fällen - häufiger als mit dem MTC02-Antikörper - homogen. In wenigen Präparaten fiel, wie schon im 2-Zellstadium, ein Randsaum niedrigerer PG2-Intensität (s.o.) auf. Das Reaktionsmuster war mit dem MTC02-Antikörper stets granulär, mit dem PG2-Antikörper in den meisten Fällen diffus. Dieses im Gegensatz zu Embryonen im 2-Zellstadium diffuse Reaktionsmuster könnte für eine generelle Umverteilung oder Degradation des PG2-Epitops sprechen, ebenso könnte es einen Anhalt für die beim Kaninchen etwa zu dieser Zeit einsetzende MZT liefern (Pacheco-Trigon, S. et al., 2002). In diesem Fall könnte eine Degradation maternaler RNA mit gleichzeitigem Beginn zygotischer Transkription des Epitops ablaufen. In einigen Präparaten zeigte sich im Gegensatz zur PG2-Reaktion eine geringere Intensität des MTC02-Antikörpers an Kontaktstellen zwischen den Blastomeren. Dieses Phänomen könnte für eine unterschiedliche Polarisierung der Mitochondrien und Selektion keimzellspezifischer Mitochondrien sprechen. Wahrscheinlicher ist jedoch ein Zusammenhang mit der bevorstehenden Kompaktion bzw. Polarisierung der Blastomeren. Ab dem 4-Zellstadium beginnt die Sortierung von inneren und äußeren Blastomeren, d.h. die Blastomere "erkennen", welcher Abschnitt ihrer Zellmembran an andere Blastomeren stößt und welcher (dementsprechend außen liegend) nicht (De Vries, W. N. et al., 2004).

In der Versuchsreihe zum 16-Zellstadium wurden Embryonen untersucht, die sich zwischen dem 8- und 26-Zellstadium befanden. In den frühen Stadien (8-12-Zellstadium) war die Reaktionsintensität in den meisten Fällen sowohl mit dem PG2- als auch mit dem MTC02-Antikörper stark. Die Reaktionsverteilung des MTC02-Antikörpers war jedoch in weit mehr Fällen homogen als die des PG2-Antikörpers. Jedoch fanden sich auch Intensitätsunterschiede und eine verstärkte PG2-Reaktion im Zentrum der Präparate. Das PG2-Reaktionsmuster zeigte sich in den meisten Fällen diffus, um dann in späteren Stadien (ab 14-15-Zellstadium) wieder granulär zu werden. Dieser Wechsel des Reaktionsverhaltens des PG2-Antikörpers fällt zusammen mit der MZT im Kaninchenembryo (Manes, C., 1973; Henrion, G et al., 1997). In späteren Stadien zeigte sich auch eine deutlich verstärkte Reaktionsintensität beider Antikörper, die für eine gesteigerte Proteinbiosynthese in diesen Stadien spricht. Da oft bereits nach 34h p.c. eine sichtbare Kompaktion eingetreten war, war es schwierig, Embryonen im unkompaktierten 16-Zellstadium zu gewinnen. Hieraus könnte man schließen, dass die Kompaktion im Kaninchen früher als bei anderen Säugerspezies eintritt. Trotz offensichtlich starker Schwankungen in der Entwicklungsgeschwindigkeit zwischen 32 und 42h ermöglichte es sich jedoch

dennoch, Embryonen zu gewinnen, die etwa das 16-Zellstadium erreicht hatten. Diese Embryonen zeigten ein schwaches und völlig diffuses Reaktionsverhalten mit den beiden Antikörpern und verfügten nur über wenige, unproportional große Kerne.

In Embryonen mit Kultivierungsbeginn 24h p.c. zeigte sich im 4-Zellstadium eine starke Reaktionsintensität mit beiden Antikörpern. Die Reaktionsverteilung und das Reaktionsmuster des PG2-Antikörpers waren seltener homogen als mit dem MTC02-Antikörper. Im Bereich des auch in dieser Gruppe von Embryonen auftretenden Randsaums niedrigerer PG2-Intensität war in diesen Präparaten auch die MTC02-Intensität leicht herabgesetzt. Dies könnte eine Zone herabgesetzter mitochondrialer Aktivität im Embryo markieren oder eine - PG2-positiven Mitochondrien übergeordnete - Umverteilung von Mitochondrien und deren Untergang bedeuten. In diesem Stadium war das Reaktionsmuster des PG2-Antikörpers in Embryonen nach Entwicklung *in vitro* häufiger granulär als in Embryonen nach Entwicklung *in vivo* und könnte so ein Anhaltspunkt für eine verzögerte Entwicklung dieser Embryonen gegenüber den Embryonen nach Entwicklung *in vivo* sein.

Im 16-Zellstadium mit Kultivierungsbeginn 24h p.c. zeigte sich in allen Embryonen mit beiden Antikörpern eine starke Reaktionsintensität. Die Reaktionsverteilung war überwiegend homogen und das Reaktionsmuster stets granulär. Die Antikörper reagierten in diesen Embryonen häufiger stark, homogen und granulär als in Embryonen nach *in vivo* Entwicklung. Jedoch fanden sich auch in diesen Präparaten Störungen in der Entwicklungspotenz. Die in einem Präparat dieser Versuchsreihe nicht mit Dapi gefärbten Zellkerne sowie die in zwei Präparaten MTC02-negativen und in einem Präparat PG2-negativen Blastomeren sprechen für einen Untergang der jeweiligen Embryonen. Jedoch könnten diese Blastomeren auch auf eine verstärkte Kompartimentierung unterschiedlicher Mitochondrien schließen lassen. Die Reaktionsverteilung der beiden Antikörper war auch im 16-Zellstadium der Embryonen mit Kultivierungsbeginn 24h p.c. häufig unterschiedlich. Dies spricht wieder (s.o.) für eine unterschiedliche Polarisierung der Mitochondrien und Selektion keimzellspezifischer Mitochondrien. In Anbetracht des in Embryonen nach Entwicklung *in vivo* beschriebenen Problems, zu bestimmten Zeitpunkten der Trächtigkeit bestimmte Zellstadien zu erhalten, ist davon auszugehen, dass die Proteinbiosynthese in der *in vitro* Kultur qualitativ (gemessen am Reaktionsmuster) und quantitativ (gemessen an der Reaktionsverteilung) ungestörter ablaufen konnte.

Im Morula-Stadium der Embryonen mit Kultivierungsbeginn 24h p.c. war die Reaktionsintensität mit beiden Antikörpern in den meisten Fällen stark, jedoch mit dem PG2-Antikörper häufiger als mit dem MTC02-Antikörper. Die Reaktionsverteilung zeigte sich zwar häufiger mit dem MTC02- als mit dem PG2-Antikörper, überwiegend jedoch mit beiden Antikörpern, homogen. Auch in diesem Stadium zeigten sich Verteilungsunterschiede zwischen den beiden Reaktionen (v.a. unterschiedliche Intensitäten in verschiedenen Bereichen der Embryonen), die die unterschiedliche Dynamik der PG2-

positiven und -negativen Mitochondrien widerspiegeln (s.o.). Das subzelluläre Reaktionsmuster war mit beiden Antikörpern granulär. Diese Ergebnisse unterscheiden sich nur gering von den Ergebnissen in Embryonen nach Entwicklung *in vivo*. Aus diesen Ergebnissen lässt sich auf eine stabile Situation auf Proteinebene in Embryonen schließen, die unabhängig von der Kultivierung *in vitro* oder der Entwicklung *in vivo* dieses Zellstadium erreicht haben.

In Embryonen mit Kultivierungsbeginn 19h p.c. zeigten sich im 2-Zellstadium sehr ähnliche Antikörperreaktionen von PG2 und MTC02. In beiden Fällen war eine starke Reaktionsintensität und eine homogene Reaktionsverteilung zu beobachten. Große Unterschiede finden sich nur im Reaktionsmuster, das mit dem PG2-Antikörper nur selten, mit dem MTC02-Antikörper jedoch in den meisten Fällen granulär war. Das Reaktionsmuster des PG2-Antikörpers unterschied sich deutlich von den Embryonen im 2-Zellstadium nach Entwicklung *in vivo*, die in den meisten Fällen ein granuläres Reaktionsmuster mit dem PG2-Antikörper zeigten. Im Gegensatz dazu war die Reaktionsverteilung beider Antikörper in Embryonen mit Kultivierungsbeginn 19h p.c. häufiger homogen als in Embryonen nach Entwicklung *in vivo*. Jedoch zeigten sich auch in diesen Präparaten in Form von niedrigeren Intensitäten in umschriebenen Bereichen einzelner Blastomeren, eines Randsaums niedrigerer Intensität oder negativen Bereichen an Kontaktstellen von Blastomeren (s.o.) Unterschiede in der Verteilung beider Reaktionen. Auffallend war in diesen Präparaten auch eine niedrigere MTC02-Intensität im Randsaum der niedrigeren PG2-Intensität. Dies könnte wiederum für eine Zone herabgesetzter mitochondrialer Aktivität im Embryo oder für eine weitergehende, PG2-positiven Mitochondrien übergeordnete Umverteilung von Mitochondrien sowie deren Untergang (s.o.) sprechen. Das diffuse PG2-Reaktionsmuster könnte durch eine in diesem Zellstadium instabilere maternale RNA in Embryonen mit Kultivierungsbeginn 19h p.c. im Vergleich zu Embryonen nach Entwicklung *in vivo* bedingt sein. Es könnte auch aus einer fehlerhaften zygotischen Produktion des PG2-Epitops resultieren. Beide Möglichkeiten ließen auf eine beeinträchtigte Proteinbiosynthese schließen. Die homogene Verteilung der PG2-Reaktion, ähnlich wie im 4-Zellstadium anderer Versuchseinheiten beobachtet, legt eine Umverteilung des Epitops in diesen Embryonen nahe.

Im 4-Zellstadium von Embryonen mit Kultivierungsbeginn 19h p.c. zeigten die meisten Embryonen mit dem PG2-Antikörper und dem MTC02-Antikörper eine starke Reaktionsintensität. Allerdings fand sich in zwei Präparaten keine PG2-Reaktion. Dies spricht entweder für ein Fehlen maternaler RNA - wenn diese für die Proteinbiosynthese des PG2-Epitops verantwortlich ist - oder für ein Sistieren der zygotischen Transkription, wenn das PG2-Epitop zygotischen Ursprungs ist. Die Reaktionsverteilung beider Antikörper war in allen Embryonen homogen. Jedoch fanden sich auch in diesen Präparaten Unterschiede in der Verteilung der Reaktionen sowie ein Randsaum niedrigerer Intensität in beiden Antikörperreaktionen (s.o.). Das Reaktionsmuster des PG2-Antikörpers zeigte sich im Gegensatz zu Embryonen anderer Versuchsreihen im 4-Zellstadium in einigen Präparaten granulär. Das

Reaktionsmuster des MTC02-Antikörpers war auch in dieser Versuchsreihe in beinahe allen Embryonen granulär. Die in dieser Versuchsreihe erhöhte Zahl granulär mit dem PG2-Antikörper reagierender Embryonen lässt auf eine Entwicklungsretardierung der Embryonen nach Entwicklung *in vitro* mit Kultivierungsbeginn 19h p.c. gegenüber Embryonen nach Entwicklung *in vivo* und Embryonen mit Kultivierungsbeginn 24h p.c. schließen. Das Reaktionsmuster in diesen Embryonen ist eher dem des 2-Zellstadiums in Embryonen nach Entwicklung *in vivo* als dem des 4-Zellstadiums in Embryonen nach Entwicklung *in vivo* und mit Kultivierungsbeginn 24h p.c. ähnlich.

Im 8- bis 16-Zellstadium der Embryonen mit Kultivierungsbeginn 19h p.c. zeigten alle Embryonen eine starke, jedoch im Vergleich zu Embryonen des 16-Zellstadiums mit Kultivierungsbeginn 24h p.c. schwächere Reaktionsintensität mit beiden Antikörpern. Die Reaktionsverteilung der Antikörper in höheren Stadien (12-16 Zellstadium) war häufiger homogen. Allerdings fanden sich deutliche Unterschiede und ein uneinheitliches Bild in der Verteilung der Antikörper, die neben den oben genannten Möglichkeiten auch für eine Störung der Proteinbiosynthese sprechen könnten. Das subzelluläre Reaktionsmuster zeigte sich dagegen in höheren Stadien in allen Embryonen granulär, in niedrigeren Stadien selten diffus. Dieses Reaktionsverhalten entspricht den Beobachtungen in Embryonen des gleichen Stadiums nach Entwicklung *in vivo*, die neben einer eingeschränkten Entwicklung morphologische Auffälligkeiten zeigten (s.o.). Weitere Stadien mit Kultivierungsbeginn 19h p.c. konnten aufgrund ihrer schlechten Entwicklung nicht untersucht werden. So könnte die inhomogene Verteilung, die auch in diesen Embryonen gefunden wurde, für die hier gefundene eingeschränkte Entwicklungspotenz dieser Embryonen sprechen.

4.2.2 Entwicklungspotenz verschiedener Klone und ihre Beurteilung nach PG2 immunhistochemischer Färbung

In diesem Kapitel soll die Entwicklungspotenz, also der erreichte Grad der Entwicklung der durch Kerntransfer erzeugten Embryonen, abzulesen an der Zellzahl und dem Färbemuster besprochen werden.

Embryonen aus Kerntransfer mit Blastomeren zeigten im 4-Zellstadium eine schwache Reaktionsintensität mit dem PG2- und dem MTC02-Antikörper. In sieben Embryonen war keine PG2-Reaktion und in zwei Embryonen keine MTC02-Reaktion nachweisbar. In wenigen Embryonen zeigte sich - soweit bei der schwachen Reaktionsintensität erkennbar - ein granuläres subzelluläres PG2-Reaktionsmuster. Mit dem MTC02-Antikörper zeigt sich in allen Embryonen ein granuläres subzelluläres Reaktionsmuster. Beide Epitope waren in dieser Versuchsreihe nur schwach oder gar nicht nachweisbar. Diese Ergebnisse lassen sowohl auf dem Niveau konstitutioneller Proteine, dargestellt durch den MTC02-Antikörper, als auch auf dem Niveau der Proteinbiosynthese, dargestellt

durch den PG2-Antikörper, auf einen beeinträchtigten Zustand der kultivierten Embryonen schließen. Blastomeren selbst verfügen schon über PG2-positive Mitochondrien, im Gegensatz zu adulten Zellen wie Cumuluszellen oder Fibroblasten. Die schwache Intensität und häufige Negativität der PG2-Reaktion verdeutlicht hier also die eingeschränkte Entwicklungspotenz, für die auch die häufig beobachtete eckige Form der Blastomeren (im Gegensatz zu der runden Form in normalen Embryonen nach Entwicklung *in vivo* und *in vitro*) und die oft negative Dapi-Färbung spricht.

Eine Veränderung dieses Reaktionsverhaltens zeigte sich im 16-Zellstadium der Embryonen aus Kerntransfer mit Blastomeren, in dem beide Antikörper in den meisten Fällen eine starke Reaktion aufwiesen. Die PG2-Reaktionsverteilung war in der Hälfte der Embryonen, die MTC02-Reaktionsverteilung sogar in der Mehrzahl der Embryonen homogen. In der Reaktionsverteilung des MTC02-Antikörpers fiel in drei Embryonen ein schmaler positiverer Randsaum auf. Dies kann für Apoptosevorgänge in zentralen Bereichen des Embryos sprechen oder für eine vorangeschrittene, aber noch nicht abgeschlossene Fragmentation der betreffenden Embryonen. Das subzelluläre Reaktionsmuster des PG2-Antikörpers war in den meisten Fällen (und häufiger als das subzelluläre MTC02-Reaktionsmuster) granulär. Diese Ergebnisse demonstrieren eine erhöhte Entwicklungspotenz der rekonstruierten Embryonen im 16-Zellstadium im Gegensatz zum 4-Zellstadium. Trotzdem fiel auch in diesem Stadium die häufig eckige Form der Blastomeren auf. Diese Beobachtung wird durch die in der Hälfte der Präparate negative Kernfärbung unterstützt und belegt eine weiterhin eingeschränkte Entwicklungspotenz und einen Unterschied innerhalb der Embryonen. Solche, die eine bessere Entwicklung aufweisen, zeigen auch ein stärkeres und homogeneres Reaktionsverhalten der eingesetzten Antikörper mit einem häufiger granulären subzellulären Reaktionsmuster.

Eine Steigerung der Entwicklungspotenz, bezogen auf die untersuchten Färbungscharakteristika, war auch im Morulastadium festzustellen. In der überwiegenden Mehrzahl der Präparate war die Reaktionsintensität mit dem PG2-Antikörper stark, die Reaktionsverteilung jedoch häufig inhomogen. In etwas mehr als der Hälfte fiel ein negativer Randsaum in der PG2-Reaktivität auf. Dies kann für einen Abbau des PG2-Epitops in peripheren Bereichen des Embryos im Zuge von Degradation maternaler RNA oder für eine Umverteilung des Epitops in zentrale Bereiche sprechen. Auch eine Erkennung keimzellspezifischer Mitochondrien und deren Selektion ist als Erklärung nicht auszuschließen (s. 4.2.1). In allen Embryonen war das subzelluläre PG2-Reaktionsmuster granulär. Der MTC02-Antikörper zeigte ebenfalls in den meisten Embryonen eine starke Reaktionsintensität mit einer inhomogenen Reaktionsverteilung. Ein granuläres subzelluläres Reaktionsmuster zeigte sich in der überwiegenden Mehrzahl der Embryonen mit beiden Antikörpern. Trotz des in den meisten Fällen granulären Reaktionsmusters und der starken Reaktionsintensität ist noch eine gewisse Instabilität auf Transkriptions- oder Translationsebene in diesen Embryonen anhand der häufig inhomogenen Verteilung der Reaktionen erkennbar. Hier könnte auch eine gestörte zytoplasmatische Verteilung des

PG2-Epitops zugrunde liegen, die auf Probleme im Klonierungsprozeß oder der Kultivierung zurückzuführen ist. Auch sprechen die weiterhin bestehenden morphologischen Auffälligkeiten in Form eckiger Blastomeren und die nicht immer in der Hoechst-Färbung nachweisbaren Kerne für eine noch eingeschränkte Entwicklungspotenz.

In einer Studie des INRA, Jouy-en-Josas, wurde eine Entwicklung *in vitro* nach Kerntransfer mit Blastomeren in 33% bis zum Blastozystenstadium beobachtet. In 9,5% entwickelte sich eine Schwangerschaft bis zum Ende; die Gesamteffizienz (Anzahl der geborenen Kaninchen im Verhältnis zur Anzahl der transplantierten Embryonen) lag bei 0,9% (Patrick Chesné, pers. Mitteilung). In ersten Studien mit Embryonen aus Kerntransfer mit Blastomeren lagen die Zahlen bei 12% (13/108) *in vitro* Entwicklung bis zum Blastozystenstadium, 27,3% Trächtigkeitsbeendigungen (3/11) und 3,9% (8/207) Gesamteffizienz (Heyman, I. et al., 1990). Die in dieser Studie erzielten Resultate decken sich auch mit anderen Beobachtungen einer niedrigeren Entwicklungsrate von Embryonen aus Kerntransferversuchen mit embryonalen Stammzellen (Jouneau, A. et Renard, J.P., 2002; Rideout, et al., 2001). Embryonale Stammzellen haben sich in Klonierungsversuchen als epigenetisch instabil und somit in der frühen Entwicklungsphase als wenig verlässliche Kernspenderzellen erwiesen (s. Einleitung; Rideout, W. et al., 2001). Im Vergleich zu anderen Spenderkernen allerdings wurde bei embryonalen Stammzellklonen, die sich *in vitro* bis zur Blastozyste entwickelt hatten, eine höhere Entwicklungsrate bis zur Geburt beobachtet (Rideout, W. et al., 2001; Wakayama, T. et al., 1999; Wakayama, T. et al., 1998; Egan, K. et al., 2001). Diese steigende Entwicklungspotenz embryonaler Zellen mit zunehmendem Alter ist auch in den hier erhobenen Resultaten wieder zu finden.

Embryonen aus Kerntransfer mit fetalen Fibroblasten zeigten im 4-Zellstadium nur in sehr wenigen Fällen eine starke PG2-Reaktionsintensität. Die PG2-Reaktionsverteilung hingegen war in den meisten Fällen homogen, das subzelluläre Reaktionsmuster aber in allen Embryonen diffus. In dieser Versuchsreihe zeigte sich damit ein PG2-Reaktionsverhalten im 4-Zellstadium, das - im Vergleich zu Embryonen nach Kerntransfer mit Blastomeren und Cumuluszellen - dem von Embryonen nach *in vitro* Entwicklung 24h p.c. in diesem Stadium am meisten entspricht. Die Reaktionsintensität des MTC02-Antikörpers war in der überwiegenden Mehrzahl stark mit homogener Reaktionsverteilung und in allen Fällen fand sich granuläres subzelluläres Reaktionsmuster.

Im 8- bis 20-Zellstadium zeigten etwa die Hälfte der Embryonen aus Kerntransfer mit fetalen Fibroblasten eine starke PG2-Reaktionsintensität und ein granuläres subzelluläres Reaktionsmuster. Nur selten war die Reaktionsintensität mit dem MTC02-Antikörper stark, der wie der PG2-Antikörper in etwa der Hälfte der Fälle ein granuläres subzelluläres Reaktionsmuster zeigte. Beide Antikörper zeigten nur sehr selten eine homogene Reaktionsverteilung. In den niedrigeren Zellstadien zeigte sich v.a. eine auffallende Kernmorphologie. Die Kerne waren im Vergleich zu Embryonen nach

Entwicklung in vitro 24h p.c. und nach Entwicklung in vivo größer. In höheren Zellstadien stellte sich wieder häufig ein Randsaum niedrigerer Intensität im Reaktionsverhalten beider Antikörper dar. Dies unterstützt die Beobachtung eines im Gegensatz zum 4-Zellstadium eingeschränkteren Reaktionsverhaltens der Antikörper im 16-Zellstadium im Vergleich zu Embryonen nach Kerntransfer mit Blastomeren oder Cumuluszellen.

Die Entwicklungspotenz von Embryonen aus Kerntransfer mit fetalen Fibroblasten, die das Morulastadium erreicht haben, war höher als in den vorangehenden Stadien. Die PG2-Reaktionsintensität war stark, nur die Reaktionsverteilung war noch seltener homogen als die MTC02-Reaktionsverteilung. Das subzelluläre Reaktionsmuster des PG2-Antikörpers war jedoch in der überwiegenden Mehrzahl granulär. Der MTC02-Antikörper zeigte in den meisten Fällen eine starke Reaktionsintensität, allerdings in weniger als der Hälfte der Fälle eine homogene Reaktionsverteilung. In der überwiegenden Mehrzahl war auch das subzelluläre MTC02-Reaktionsmuster granulär. In beiden Reaktionsverteilungen zeigte sich erneut ein peripherer Randsaum niedrigerer Intensität. Aufgrund der deutlich eingeschränkten Verteilung der Antikörper in diesen Embryonen ist die Entwicklungspotenz in diesem Stadium als schwächer zu beurteilen als in den untersuchten Morulastadien der Embryonen nach Kerntransfer mit Blastomeren oder Cumuluszellen. Diese Beobachtung wird unterstützt von den in höheren Zellstadien häufig schwankenden Kerngrößen. Auch die beschriebenen Entwicklungsprobleme der Embryonen nach Kerntransfer mit fetalen Fibroblasten korrelieren mit diesen Resultaten.

Nach aktuellen Veröffentlichungen konnte in Kerntransferversuchen mit fetalen Fibroblasten im Kaninchen eine Entwicklung bis zum Schwangerschaftsende nicht erzielt werden. Z.T. wird von einer hohen in vitro Entwicklungsrate berichtet, nämlich von 59% (Yang, X.J. et al., 2002) und von 51,4% bis zum Blastozystenstadium mit einer Implantationsrate von 8,9% (Galat, V. et al., 2002). In Versuchen mit 12 Tage alten fetalen Fibroblasten wurden Furchungsraten von 50% bis 83,9% am ersten Tag erreicht. In der weiteren Entwicklung zum Blastozystenstadium schwanken die Ergebnisse von 8,3% bis 40% (Li, G.-P. et al., 2002), aber auch in diesem Versuch konnte kein Klon sich bis zum Ende der Schwangerschaft entwickeln. In noch unveröffentlichten Ergebnissen aus einer Studie des INRA, Jouy-en-Josas (Mireille Challah-Jacques (Vivalis, Frankreich), pers. Mitteilung), tritt die Furchung nach Kerntransfer und Fusion in 73% der Embryonen ein, die dem Kerntransfer mit fetalen Fibroblasten entstammen. Am fünften Tag konnte in 43% eine Entwicklung bis zur Blastozyste beobachtet werden. In neuesten Ergebnissen mit adulten Fibroblasten erreichte maximale Furchungsraten lagen bei 86% und die Entwicklung bis zum Morula-Stadium gelang in 32% (Techakumphu, M. et al., 2003).

Embryonen nach Kerntransfer mit Cumuluszellen zeigten im 4-Zellstadium nur in der Hälfte der Fälle eine starke PG2-Reaktionsintensität bei in überwiegender Mehrzahl homogener Reaktionsverteilung. In vier Präparaten war keine PG2-Färbung zu finden. Auch die MTC02-Reaktionsintensität war in diesen Embryonen nur schwach. Das subzelluläre PG2-Reaktionsmuster war nur sehr selten granulär, in diesen Fällen spricht es wieder für eine Entwicklungsretardierung. Mit dem MTC02-Antikörper zeigte sich nur in den wenigsten Fällen eine starke Reaktionsintensität. Die Reaktionsverteilung dagegen war in allen Embryonen homogen und das subzelluläre Reaktionsmuster granulär. Auch in diesen Embryonen fielen wieder die schwankenden Kerngrößen auf, die für Probleme in der Entwicklungspotenz sprechen. Die schwache bis negative Reaktionsintensität der Antikörper spricht für eine Fragmentation der entsprechenden Embryonen.

Im 16-Zellstadium von Embryonen nach Kerntransfer mit Cumuluszellen jedoch zeigte sich eine Veränderung beider Reaktionen. Beide Antikörper reagierten in allen Embryonen stark. Sowohl der PG2-Antikörper als auch der MTC02-Antikörper ist in der Hälfte der Embryonen homogen verteilt. Allerdings zeigte die andere Hälfte sehr ausgeprägte Verteilungsstörungen beider Antikörper - eine Beobachtung, die für erhebliche Probleme in der zytoplasmatischen Dynamik der Mitochondrien und damit für eine eingeschränkte Entwicklungspotenz spricht. Diese Vermutung wird bestärkt durch das beobachtete diffuse PG2-Reaktionsmuster in 1/3 der Embryonen. Ein granuläres subzelluläres Reaktionsmuster fand sich mit dem PG2-Antikörper in etwas mehr als der Hälfte der Embryonen, mit dem MTC02-Antikörper jedoch in der überwiegenden Mehrzahl.

Im Morulastadium reagierten beide Antikörper in allen Embryonen stark. Die Verteilung der PG2-Reaktion war in der Hälfte der Embryonen, die MTC02-Verteilung in etwa $\frac{3}{4}$ der Embryonen homogen. Ebenfalls in etwa $\frac{3}{4}$ der Embryonen fand sich ein granuläres subzelluläres Reaktionsmuster mit beiden Antikörpern. Insgesamt lässt dies auf einen stabileren Zustand der Embryonen auf Transkriptions- und Translationsebene schließen. Auch die konstitutionellen mitochondrialen Proteine, dargestellt durch den MTC02-Antikörper, zeigten im Vergleich zu den vorhergehenden Stadien eine starke Reaktionsintensität mit homogener Verteilung und granulärem subzellulärem PG2-Reaktionsmuster. Allerdings standen insgesamt nur vier Embryonen in diesem Stadium zur Untersuchung zur Verfügung. Um exaktere Aussagen treffen zu können, sind weitere Untersuchungen mit Embryonen im Morulastadium nach Kerntransfer mit maternalen Cumuluszellen notwendig.

Aktuelle noch unveröffentlichte Ergebnisse aus dem INRA, Jouy-en-Josas, mit Cumuluszellen als Kernspenderzellen, zeigen in 55% einen Beginn der Furchung am ersten Tag nach dem Kerntransfer (Mireille Challah-Jacques, pers. Mitteilung). Von 176 rekonstruierten Embryonen, die über 5 Tage in vitro in B2 Medium kultiviert wurden, entwickelten sich 100 (56,8%) zur Blastozyste. Sieben klonierte Kaninchen wurden durch Kerntransfer mit fetalen Fibroblasten in zwei verschiedenen

Versuchen erzeugt. Zuerst wurden aus einem Versuch, in dem 27 Muttertieren insgesamt 371 4-Zellembryonen implantiert wurden, von vier Empfängertieren sechs Junge erhalten (Chesné, P. et al., 2002). Dies entspricht einer Gesamteffizienz von 1,6%. Vier dieser sechs Kaninchen entwickelten sich normal zu erwachsenen Tieren und verfügten nachgewiesen über eine normale Fruchtbarkeit.

In einer aktuelleren Studie aus demselben Labor, in der Cumuluszellen als Kontrolle dienten und genetisch modifizierte sowie kultivierte fetale Fibroblasten als Kernspenderzellen benutzt wurden, konnte nach Transfer von 87 rekonstruierten 4-Zellembryonen in insgesamt fünf Muttertiere ein weiteres Kaninchen mit folliculären Kernspenderzellen erzeugt werden; das bedeutet eine Gesamteffizienz von 1,2%. Da ausgiebige Dysregulation des „imprinting“ in embryonalen Stammzellklonen, nicht aber in Cumuluszellklonen zu finden war (Humpherys, D. et al., 2001; Rideout, W.M. et al., 2001), werden Cumuluszellen auch in anderen Veröffentlichungen als verlässlicher in der Reprogrammation nach Kerntransfer in die Oozyte betrachtet als andere Kernspenderzellen.

Die drei in dieser Studie verwendeten Kernspenderzellen zeigen unterschiedliche Reaktionsverhalten mit den angewandten Antikörpern und unterschiedliche Entwicklungspotenzen. Embryonen nach Kerntransfer mit Blastomeren zeigen erst in höheren Stadien eine stabile Entwicklungspotenz, weisen dann aber eine hohe Konstanz in den Färbecharakteristika auf. Embryonen nach Kerntransfer mit fetalen Fibroblasten zeigen insgesamt betrachtet das unkonstanteste Reaktionsverhalten und die unkonstanteste Entwicklungspotenz. Auch die noch in höheren Stadien auftretenden Auffälligkeiten in der Kernmorphologie unterstützen diese Interpretation. Eine große Konstanz in der Entwicklungspotenz über alle untersuchten Stadien hinweg zeigen die Cumuluszellen, auch wenn die Embryonen nach Kerntransfer mit Blastomeren in den höheren Stadien die äquivalentesten Ergebnisse im Vergleich zu Embryonen nach Entwicklung *in vivo* oder mit Kultivierungsbeginn 24h p.c. zeigen. Hier stellt sich die Frage, wie zukünftig die „Anlaufschwierigkeiten“ in den früheren Stadien der embryonalen Entwicklung von Embryonen nach Kerntransfer mit Blastomeren behoben werden können, um eine gleichmäßig stabile Entwicklungspotenz dieser Embryonen gewährleisten zu können.

4.2.3 Entwicklungspotenz parthenogenetischer Embryonen

Die überwiegende Mehrzahl der Embryonen zeigte eine starke Reaktionsintensität mit dem PG2-Antikörper bei einer homogenen Verteilung in $\frac{3}{4}$ der Fälle. Ähnlich wie in Embryonen nach Kerntransfer mit Blastomeren waren häufig einzelne Blastomeren mit einer stärkeren Reaktionsintensität erkennbar. Das subzelluläre Reaktionsmuster war in allen Embryonen granulär. Die untersuchten parthenogenetischen Embryonen zeigten im Morula-Stadium mit dem PG2-Antikörper ein Ergebnis, das im Gegensatz zu Embryonen nach Kerntransfer im gleichen Stadium,

näher am Ergebnis der untersuchten Embryonen nach Entwicklung *in vitro* mit Kultivierungsbeginn 24h p.c. lag. Ganz anders verhielt sich die Reaktion mit dem MTC02-Antikörper. Hier wiesen nur wenige Embryonen eine starke Reaktionsintensität auf und die Reaktionsverteilung war nur selten homogen. Das subzelluläre MTC02-Reaktionsmuster war in nur etwas mehr als der Hälfte der Embryonen granulär. Diese Ergebnisse demonstrieren ein in Embryonen ohne paternales Erbgut eingeschränktes Reaktionsverhalten des MTC02-Antikörpers bezogen auf sowohl die Reaktionsintensität und -stärke als auch das subzelluläre Reaktionsmuster. Es wird von Nutzen sein, den Einfluss der unterschiedlichen parentalen Faktoren auf das Reaktionsverhalten des MTC02 und des PG2-Antikörpers genauer zu untersuchen.

Die künstliche Aktivierung der Eizelle ist eine essentielle Komponente der aktuellen Kerntransferprotokolle (Ozil, J.P., 1990; Liu, C. T. et al., 2002). Ein periodischer intrazellulärer Anstieg von Calciumströmen ist kritisch für die Aktivierung von Eizellen. Im Kaninchen hat das Alter der empfangenden Eizelle einen starken Einfluss auf die Effizienz der Eizellaktivierung (Mitalipov, S.M. et al., 1999). Ältere Eizellen (>24-25h nach LH-Injektion) können durch mehrere elektrische Stimulierungen effizienter aktiviert werden als jüngere Eizellen (18-19h nach LH-Injektion); die Fähigkeit zur Entwicklung zur Blastozyste sinkt jedoch mit dem Alter (Stice, S.L. et Robl, J.M., 1988; Collas, P. et Robl, J.M., 1990). In Versuchen, die den Einfluss verschiedener Aktivierungsbehandlungen und Kulturmedien auf MetaphaseII-Eizellen untersuchten, konnten Mitalipov, S.M. et al., 1999 abhängig von der Versuchsreihe eine maximale Furchungsrate parthenogenetischer Embryonen von 83,9% resp. 93,7% am zweiten Tag nach der Aktivierung und eine maximale Entwicklung zur Blastozyste am sechsten Tag in 50% resp. 40,6% der untersuchten Embryonen beobachten.

4.2.4 Die Rolle von Mitochondrien in der Reprogrammierung

Die Rolle von Mitochondrien in der frühen embryonalen Entwicklung bleibt unklar. So konnte keine Korrelation einer biochemischen Differenzierung der Mitochondrien mit den verschiedenen in dieser Studie verwendeten Kernspenderzellen gefunden werden. Im Hinblick auf bekannte Funktionen der Mitochondrien in der Apoptose (s. Einleitung), könnten negative Bereiche mit den Antikörpern PG2 und MTC02 u.a. für apoptotische Vorgänge sprechen.

Es ist bekannt, dass asymmetrische mitochondriale Verteilung im Pronukleusstadium mit unproportionaler Verteilung von Mitochondrien zwischen den Blastomeren der folgenden Zellteilungszyklen assoziiert ist und dass signifikant erniedrigte mitochondriale Vererbung in Furchungsembryonen ungünstige Auswirkungen auf die Entwicklung menschlicher Embryonen beinhaltet, die in Arretierung der Zellteilung und Zelltod aufgrund inadäquater ATP-Produktion

resultieren können (Van Blerkom, J. et al., 2000). Die mitochondrialen Antikörper PG2 und MTC02 zeigen in verschiedenen Stadien der embryonalen Entwicklung unterschiedliche Reaktionsverhalten, die auf eine unterschiedliche Verteilung und Expression der entsprechenden Epitope schließen lassen. Insbesondere auffallend ist die diffuse Reaktion des PG2-Antikörpers ab dem 4-Zellstadium bis zum 8-16-Zellstadium, während in diesen Stadien der MTC02-Antikörper granulär reagiert. Dies könnte eine Umverteilung des PG2-Epitops im Zytoplasma darstellen, die entscheidend sein kann für die weitere Entwicklung des Embryo. Weiterführende Untersuchungen, die diese subzelluläre Dynamik erklären könnten, wie z.B. Multiphoton - Laserscanning - Mikroskopie (Squirrell, J.M., et al., 2003), sind in zukünftigen Versuchen in Betracht zu ziehen. Mit einer solchen Technik könnte z.B. in lebenden Präparaten nach Immunfluoreszenz - Markierung der Mitochondrien ihre subzelluläre Dynamik dargestellt werden und in Beziehung zur beobachteten Entwicklung *in vitro* beurteilt werden

Mitochondrien durchlaufen eine große Anzahl spezies-spezifischer Organisationsvorgänge während der frühen embryonalen Entwicklung; verschiedene Studien berichten von einer Verbindung zwischen Mitochondrienorganisation und Entwicklungspotenz in verschiedenen Säugetieren (Barnett, D.K. et al., 1997; Squirrell, J.M. et al., 2001; Muggleton-Harris, A.L. et Brown, J.J. 1988). Mäuseembryonen verfügen nach normaler Entwicklung *in vitro* über eine homogene Verteilung von Mitochondrien im Zytoplasma, während Embryonen, die in ihrer Entwicklung behindert werden, eine eher perinukleäre Verteilung zeigen (Muggleton-Harris, A.L. et Brown, J.J., 1988). Eine direkte Verbindung zwischen zytoplasmatischer Organisation und Entwicklung ist wahrscheinlich nicht existent, eher beeinflusst die zytoplasmatische Organisation andere Parameter (und wird von ihnen beeinflusst), die sich auf die Gesundheit des Embryos auswirken. Die unterschiedlichen Verteilungen und Reaktionsmuster der Antikörper in den verschiedenen Versuchsreihen können Hinweise auf die Entwicklungspotenz der einzelnen Populationen geben. Unterstützt wird diese Vermutung durch die beobachtete Entwicklung der Embryonen *in vitro* und durch in anderen Versuchen erhobene Daten (s.o.). Vermutungen darüber, dass das PG2-Epitop als keimzellspezifisches Epitop ein sensiblerer Marker ist als das MTC02-Epitop, bedürfen noch der Bestätigung durch weitere Versuche. Die hier erhobenen Ergebnisse lassen besonders vor dem Hintergrund der aktuellen Problematik in der somatischen Klonierung die Annahme der höheren Sensibilität des PG2-Epitops als wahrscheinlich erscheinen.

4.3 Einblicke in natürliche embryonale Entwicklung

Der Zeitraum zwischen dem 4-Zell und 16-Zellstadium kann als eine Schlüsselphase für die erfolgreiche Beendigung der embryonalen Entwicklung im Kaninchen angesehen werden. Diese Annahme kann aus der Vermutung hergeleitet werden, dass die beobachtete Umverteilung des PG2-Epitops in dieser Phase durch die MZT im Kaninchen bedingt ist und die Embryonen nach

Entwicklung *in vitro* mit Kultivierungsbeginn 19h p.c. oft noch ein granuläres statt diffuses Reaktionsmuster aufweisen und so eine verzögerte Entwicklungspotenz dokumentieren.

Ein weiteres entscheidendes Stadium erscheint nach den hier erhobenen Ergebnissen das Morulastadium zu sein, in dem sich entscheidende Verbesserungen in den beobachteten Parametern, in Form einer homogeneren Reaktionsverteilung, gleichmäßiger Reaktionsintensität und granulärem subzellulärem Reaktionsmuster zeigten. Dies ist besonders auffallend in den Embryonen nach Kerntransfer mit Blastomeren. Die für den Kerntransfer verwendeten Embryonen befanden sich im Morulastadium, also einem schon vorangeschrittenen Stadium der embryonalen Entwicklung; eine Tatsache die auf eine günstige Entwicklungspotenz der Zellkerne und ein stabiles zytoplasmatisches Milieu schließen lassen. Blastomeren verfügen selbst schon - im Gegensatz zu fetalen Fibroblasten und maternalen Cumuluszellen - über PG2-positive Mitochondrien, die sie so auch in die durch den Kerntransfer entstehende Zygote mit einbringen. Diese Tatsache lässt besonders in frühen Stadien auf ein Reaktionsverhalten des PG2-Antikörpers schließen, das sich (im Gegensatz zu Embryonen nach Kerntransfer mit maternalen Cumuluszellen oder fetalen Fibroblasten) ähnlich dem in normalen Embryonen verhält. In dieser Studie zeigten sich jedoch gerade in den frühen Stadien sehr schwache PG2-Reaktionsintensitäten; eine Beobachtung, die die häufig fehlerhafte Reprogrammation in diesen Embryonen unterstützt. Da in dieser Population somit die Ergebnisse im 4-Zellstadium eine eingeschränktere Entwicklungspotenz widerspiegeln als in den anderen untersuchten Embryonen, liegt die Vermutung eines entscheidenden funktionellen Differenzierungsprozesses der Mitochondrien in der Zeit zwischen Befruchtung und Morulastadium und eines bedeutenderen embryonalen Entwicklungsschrittes im Morulastadium als in frühen Furchungsstadien nahe. In den ersten 72 Stunden der embryonalen Entwicklung wird demnach die Entscheidung über die letztlich erreichte Entwicklung getroffen.

Ob sich an diesen ersten Entwicklungsschritten ablesen lässt, dass die Entwicklung eines klonierten Tieres in einem lebensfähigen Neugeborenen resultiert oder in bedeutenden Entwicklungsproblemen wie z.B. dem large offspring syndrom (s. Einleitung) resultiert, kann jedoch nur durch prospektive Studien beantwortet werden, in denen der Differenzierungsstatus von lebendmarkierten PG2-positiven Mitochondrien während der Entwicklung z.B. fluoreszenzmikroskopisch dargestellt wird und die Embryonen danach in ihrer weiteren Entwicklung beobachtet werden.

Beobachtung und Beschreibung der zytoplasmatischen Dynamik von Mitochondrien in Präimplantationsstadien versprechen auch weiterhin für die Zukunft neue Einblicke in die frühembryonale Entwicklung. Sie könnten möglicherweise darüber hinaus wichtige Erkenntnisse und Perspektiven für eine erfolgreiche Klonierungstechnik liefern.

5. Literaturverzeichnis

1. Aoiki, F. et al.: Regulation of transcriptional activity during the first and second cell cycles in the preimplantation mouse embryo, *Dev. Biol.* 181 (2) (1997) 296-307
2. Barnett, D.K. et al.: Glucose and Phosphate toxicity in hamster preimplantation embryos involves disruption of cellular organization including distribution of active mitochondria. *Mol Reprod Dev* 48 (1997) 204-213
3. Barrit, J.A. et al.: Mitochondria in human offspring derived from ooplasmic transplantation. *Hum Reprod* 16 (2001) 513-516
4. Barrit, J.A. et al.: Spontaneous and artificial changes in human ooplasmic mitochondria. *Hum Reprod* 15 Suppl 2 (2000) 207-217
5. Beddington, R. S. and E. J. Robertson: An assessment of the developmental potential of embryonic stem cells in the midgestation mouse embryo. *Development* 105 (1989), 733-737
6. Behboodi, E. et al.: Birth of large calves that developed from in vitro-derived bovine embryos. *Theriogenology* 44 (1995) 227-232
7. Blandau, R. J.: In vitro fertilization and embryo transfer. *Fertil Steril* 33(1980), 3-11
8. Bouniol, C. et al.: Endogenous transcription occurs at the 1-cell stage in the mouse embryo. *Exp Cell Res* 218 (1995) 57-62
9. Brannan, C.I. et Bartolomei, M.S.: Mechanisms of genomic imprinting. *Curr Opin Genet Dev* 9 (1999) 164-170
10. Brenner, C.A. et al.: Mitochondrial DNA heteroplasmy after human ooplasmic transplantation. *Fertil Steril* 74 (2000) 573-578
11. Buehr, M.: The primordial germ cells of mammals: some current perspectives. *Exp. Cell Res.* 232 (1997) 194-207
12. Calarco, PG.: Polarization of mitochondria in the unfertilized mouse oocyte. *Dev Genet.* 16 (1995) 36-43
13. Chen, J.M. et al.: A combined analysis of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator: implications for structure and disease models. *Mol Biol Evol* 18 (2001) 1771-1788
14. Chesné, P. et al.: Cloned rabbits produced by nuclear transfer from adult somatic cells. *Nature Biotechnology* 20 (2002) 366-369
15. Collas, P. et Robl, J.M.: Factors affecting efficiency of nuclear transplantation in the rabbit embryo. *Biol Reprod* 43 (1990) 165-174
16. Constancia, M. et al.: Imprinting mechanisms. *Genome Res.* 8 (9) (1998) 881-900
17. Cummins, J.M. et al.: Fate of microinjected spermatid mitochondria in the mouse oocyte and embryo. *Zygote* 6 (1998) 213-222
18. Cummins, J.M.: The role of maternal mitochondria during oogenesis, fertilization and embryogenesis. *Reprod Biomed* 4 (2) (2002) 176-82

19. DeRenzo, C. et Seydoux, G.: A clean start: degradation of maternal proteins at the oocyte-to-embryo transition. *Trends Cell Biol* 8 (2004) 420-426
20. De Sousa, P.A. et al.: Evaluation of gestational deficiencies in cloned sheep fetuses and placent. *Biol. Reprod.* 65 (2001) 23-29
21. De Vries, W. N. et al.: Maternal beta-catenin and E-cadherin in mouse development. *Development* 131 (2004) 4435-4445
22. Eddy, E.M.: Germ plasm and the differentiation of the ger cell line. *Int. Rev. Cytol.* 43 (1975) 229-281
23. Edwards, R.G.: IVF and the history of stem cells. *Nature* 413 (2001) 349-351
24. Eggan, K. et al.: Hybrid vigor, fetal overgrowth and viability of mice derived by nuclear cloning and tetraploid embryo complementation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98 (2001) 6209-6214
25. Enders, G.C. et May, J.J.: Developmentally regulated expression of a mouse germ cell nuclear antigen examined from embryonic day 11 to adult in male and female mice. *Dev. Biol* 163 (1994) 331-340
26. Evans, M.J. et al.: Mitochondrial DNA genotypes in nuclear transfer-derived cloned sheep. *Nat Genet* 23 (1999) 90-93
27. Forlani, G. et al.: Relief of a repressed gene expression state in the mouse 1-cell embryo requires DNA replication. *Development* 125 (1998) 3152-3166
28. Fulka, J. Jr. et al.: Nuclear transplantation in mammals: remodelling of transplanted nuclei under the influence of maturation promoting factor. *Bioessays.* 18 (1996) 835-40
29. Fulka, J. Jr. et Mrazek, M.: Cloning in mammals - biological aspects. *Cas Lek Cesk.* (2004) 143 (5) 295-8
30. Galat, V. et al.: Effect of donor cell age on the efficiency of nuclear transfer in rabbits. *Reprod Biomed* 4 (2002) 32-37
31. Gardner, R.L., Surani M.A. et al.: Epigenesis versus preformation during mammalian development. Introduction. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* (2003), 358 (1436) 1313-5
32. Graur, D. et al.: Phylogenetic positions of the order Lagomorpha (rabbits, Hares and allies). *Nature* 379 (1996) 333-335
33. Gregory, P.W.: The early embryology of the rabbit. *Contr Embryol Carneg Instn* (1930) 21 141-168
34. Gurdon, J.B. et al.: Reprogramming of transplanted nuclei in amphibia. *Int. Rev. Cytol.* S9 (1979) 161-178
35. Gurdon, J.B.: Genetic reprogramming following nuclear transplantation in amphibia. *Cell. Dev. Biol.* 10 (1999) 239-243
36. Gyllenstein, U. et al., 1991: Paternal inheritance of mitochondrial DNA in mice. *Nature* 352 (1991) 255-257

37. Haaf, T.: The battle of the sexes after fertilization: behavior of paternal and maternal chromosomes in early mammalian embryo. *Chromosome Research* 9 (2001) 263-271
38. Hahnel, A.C. et Eddy, E.M.: Cell surface markers of mouse primordial germ cells defined by two monoclonal antibodies. *Gamet Res* 15 (1986) 25-34
39. Heath, J.K.: Mammalien primordial germ cells. In: Johnson, M.H. (ed) *Development in mammals*, vol. 3, North Holland, New York (1978), 267-298
40. Henrion, G. et al.: Differential Regulation of the Translation and the stability of two maternal transcripts in preimplantation rabbit embryos. *Mol Reprod Dev* 56 (2000) 12-25
41. Heyman, Y. et al. : Reprogrammation complète de noyaux embryonnaires congelés, après transfert nucléaire chez le lapin. *C.R. Acad. Sci. Paris*, t. 311, Série III, (1990) 321-326
42. Hill, J.R. et al.: Clinical and pathologic features of cloned transgenic calves and fetuses. *Therionology* 51 (1999) 1451-65
43. Hill, J.R. et al.: Development rates of male bovine nuclear transfer embryos derived from adult and fetal cells. *Biol. Reprod.* 62 (2000) 1135-1140
44. Hoeg, J.M. et al.: Overexpression of lecithin: cholesterol acetyltransferase in transgenic rabbits prevents diet-induced atherosclerosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93 (1996) 11448-11453
45. Hogan, B., Beddington, R., Costantini, F., Lazy, E.: *Manipulating the mouse embryo. A laboratory manual.* 2nd edition Cold Spring Harbour Press, Cold Spring Harbour, 1994, S. 191 und S. 415
46. Holliday, R: Inheritance of epigenetic defects. *Science* 238 (1987) 163-170
47. Humpherys, D. et al.: Abnormal gene expression in cloned mice derived from embryonic stem cell and cumulus cell nuclei. *Proc Natl Acad Sci USA* (2002) 12889-12894
48. Humpherys, D. et al.: Epigenetic instability in ES cells and cloned Mice. *Science* 293 (2001) 95-97
49. Jansen, R.P. et de Boer, K.: The bottleneck: mitochondrial imperatives in oogenesis and ovarian follicular fate. *Mol Cell Endocrinol* 145 (1998) 81-88
50. Jouneau, A. et Renard, J.-P.: Cellules souches embryonnaires et clonage thérapeutique. *Medecine/Sciences* 18 (2002) 169-180
51. Kafri, T. et al.: Mechanistic aspects of genome-wide demethylation in the preimplantation mouse embryo *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 90 (1993) 10558-10562
52. Kanka, J. et al.: Onset of RNA synthesis and poly (A) content of early rabbit embryos. Comparison with sheep. *Reprod Nutr Dev* 33 (1993) 465-474
53. Kikyo, N. et Wolffe, A.P.: Reprogramming nuclei: Insights from cloning, nuclear transfer and heterokaryons. *Journal of cell science* 113 (2000) 11-20
54. Kroemer, G. et Reed, J.C.: Mitochondrial control of cell death. *Nat Med* (2000) 6: 513-9
55. Kroemer, G.: Mitochondrial control of apoptosis. *Bull. Acad. Natl. Med.* 185 (2001) 1135-42

56. Lanza, R.P. et al.: Extension of cell life-span and telomere length in animals cloned from senescent somatic cells. *Science* 288 (2000) 665-669
57. Latham, K.E.: Mechanism and control of embryonic genome activation in mammalian embryos, *Int. Rev. Cytol.* 193 (1999) 71-124
58. Lehmann, R. et Ephrussi, A.: Germ plasm formation and germ cell determination in *Drosophila*. *Germline Development* 182 (1994) Ciba Symposium, 68-84
59. Leiser, R. et Denker, H.W.: The dynamic structure of rabbit blastocyst coverings. II. Ultrastructural evidence for a role of the trophoblast in neozona formation. *Anat Embryol* 179 (2) (Berl.) (1988) 129-134
60. Li, G.-P. et al.: Rabbit cloning: Improved fusion rates using Cytochalasin B in the fusion buffer. *Mol Reprod Dev* 61 (2002), 187-191
61. Liu, C. T. et al.: Parthenogenesis of rabbit oocytes activated by different stimuli. *Anim Reprod Sci* 70 (2002) (3-4), 267-76.
62. Majumder, S. et al.: Analysis of a transcriptionally permissive state during the 1-cell stage of mouse embryogenesis. *Dev. Biol.* 149 (1993) 457-462
63. Manes, C.: The participation of the embryonic genome during early cleavage in the rabbit. *Dev. Biol.* 32 (1993) 453-459
64. McCreath, K.J. et al.: Production of gene targeted sheep by nuclear transfer from cultured somatic cells *Nature* 405 (2000) 1066-1069
65. McKay, D.C. et al.: Histochemical observations on the germ cells of human embryos. *Anat rec* 117 (1953) 750-752
66. Mello, C.C. et al.: The PIE-1 protein and germline specification in *C. elegans* embryos. *Nature* 382 (1996) 710-712
67. Ménézo, Y. et Renard, J.-P.: The life of the egg before implantation. In: Thibault C., Levasseur M.C., Hunter R.H.F. (Hrsg.): *Reproduction in mammals and man*, RHF Hunter, Paris, 1993, S. 345-365
68. Meyer, L. et Kim, S.H.: Chemical inhibitors of cyclin-dependent kinases. *Methods Enzymol* 283 (1997) 113-128
69. Mirkes, P.E.: 2001 Warkany lecture: To die or not to die, the role of Apoptosis in normal and abnormal mammalian development. *Teratology* 65 (2002) 228-39
70. Mitalipov, S.M. et al.: Development of nuclear transfer and parthenogenetic rabbit embryos activated with Inositol 1,4,5-triphosphate. *Biol Reprod* 60 (1999) 821-827
71. Monk, M. et al.: Temporal and regional changes in DNA methylation in the embryonic, extraembryonic and germ cell lineages during mouse embryo development. *Development* 16 (1987) 371-382
72. Motta, P.M. et al., 2000: Mitochondrial morphology in human fetal and adult female germ cells. *Hum Reprod* 15 (suppl 2) (2000) 129-147

73. Muggleton-Harris, A.L. et Brown, J.J.: Cytoplasmic factors influence mitochondrial reorganization and resumption of cleavage during culture of early mouse embryos. *Hum Reprod* 3 (1988) 1020-1028
74. Nieuwkoop, P. et Sutasurya, L.: Primordial germ cells in the chordates. In: Cambridge Univ Press, Cambridge, 1979, S. 91-94
75. Nichols, J. et al.: Formation of pluripotent stem cells in the mammalian embryo depends on the POU transcription factor Oct4, *Cell* 95 (3) (1998) 379-91
76. Nothias, J.Y. et al.: Regulation of gene expression at the beginning of mammalian development. *J. Biol. Chem.* 270 (1995) 22077-22080
77. Nothias, J.Y. et al.: Uncoupling of transcription and translation during zygotic gene activation in the mouse. *EMBO J.* 15 (1996) 5715-5725
78. Noto, V. et al.: Mitochondrial distribution after fast embryo freezing. *Hum Reprod* 8 (1993) 2115-2118
79. Ozil, J.P.: The parthenogenetic development of rabbit oocytes after repetitive pulsatile electrical stimulation. *Development* 109 (1990) (117-127).
80. Pacheco-Trigon, S. et al.: Molecular characterization of genomic activities at the onset of zygotic transcription in mammals. *Biol Reprod* 67 (2002) 1907-1918
81. Perreault, S.D.: Chromatine remodeling in mammalien zygotes. *Mutat Res* 296 (1992) 43-55
82. Razin, A. et Shemer, R.: DNA methylation in early development. *Hum. Mol. Genet.* 4 (1995) 1751-1755
83. Renard, J.-P: Chromatin remodelling and nuclear reprogramming at the onset of embryonic development in mammals. *Reprod. Fertil. Dev.* 10 (1998) 573-580
84. Renard, J.-P. et Vignon, X.: Le clonage: état de l'art. *Pour la science* 209 (2001) 40-45
85. Reik, W. et al., 2001: epigenetic reprogramming in mammalien development. *Science* 293 (2001) 1089-93
86. Ricken, A. et Viebahn, C.: Stage specific Expression of Mitochondrial Germ Cell Epitope PG2 During Postnatal Differentiation of Rabbit germ cells. *Biol Reprod* 67 (2002) 196-203
87. Rideout, W.M. et al.: Nuclear Cloning and Epigenetic Reprogramming. *Science* 293 (2001) 1093-1098
88. Robb, D.L. et al.: A kinesin like protein is required for germ plasm aggregation in *Xenopus*. *Cell* 87 (1996) 823-831
89. Saffman, E.E. et Lasko, P.: Germline development in vertebrates and invertebrates. *Cell. Mol. Life Sci.* 55 (1999) 1141-1163
90. Saitou, M. et al.: A molecular programme for the specification of germ cell fate in mice. *Nature* 418 (2002) 293-300
91. Sathanathan, A.H. et al.: Mitochondrial Morphology during preimplantational human embryogenesis. *Hum Reprod* 15 (suppl 2) (2000) 148-159

92. Schäfer-Haas, A. et Viebahn, C.: The germ cell epitope PG2 is expressed in primordial germ cells and in hypoblast cells of the gastrulating rabbit embryo. *Anat Embryol* 202 (2000) 13-23
93. Schultz, R.M.: Regulation of zygotic gene activation in the mouse. *BioEssays* 8 (1993) 531-538
94. Seydoux, G. et al.: Repression of geneexpression in the embryonic germ lineage of *C. elegans*. *Nature* 382 (1996) 713-716
95. Shi, W., Zakhartchenko, V.: Epigenetic reprogramming in mammalian nuclear transfer. *Differentiation* 71(2): 91-113
96. Smith, L.C. et Alcivar, A.A.: Cytoplasmic inheritance and its effects on development and performance. *J Reprod Fertil Suppl* 48 (1993) 31-43
97. Soloy, E. et al.: Time course of pronuclear deoxyribonucleid acid synthesis in parthenogenetically activated bovine oocytes. *Biol. Reprod.* 57 (1997) 27-35
98. Solter, D. and Knowels, B.B.: Monoclonal antibody defining a stage specific mouse embryonic antigen (SSEA-1). *Acad Sci USA* 75 (1978), 5565-5569
99. Solter, D.: Mammalien cloning: advances and limitations *Nat. Rev. Genet.* 1 (2000) 199-207
100. Squirrell, J.M. et al.: Imaging Mitochondrial Organization in Living primate oocytes and Embryos using Multiphoton Microscopy. *Microsc. Microanal.* 9 (2003) 190-201
101. Steeger, K.: Transcriptional and translational regulations of gene expression in haploid spermatids, *Anat. Embryol.* 199 (6) (1999) 145-152
102. Stice, S.L. et Robl, J.M.: Nuclear reprogramming in nuclear transplant rabbit embryos. *Biol Reprod* 39 (1988) 603-613
103. Stinnackre, M.G. et al.: The preparation of recombinant proteins from mouse and rabbit milk for biomedical and pharmaceutical studies. In: Houdebine, L.M. (Hrsg.): *Transgenic animals, generation and use*, Harwood Academic publishers, Amsterdam, 1997, S. 461-463
104. Strome, S. et al.: Specification and development of the germline in *Caenorhabditis elegans*. *Germline Development Ciba Symposium* 182 (1994) 31-45
105. Sutovsky, P. et Prather, R.S.: Nuclear remodeling after SCNT: a contractor's nightmare. *Trends Biotechnol* 22 (5) (2004) 205-8.
106. Sutovsky, P. et al.: Ubiquitin tag for sperm mitochondria. *Nature* 402 (1999) 371-372
107. Szöllösi, D.: Time and duration of DNA synthesis in rabbit eggs after sperm penetration. *Anat Rec.* 154 (1966) 209-212
108. Techakumphu, M. et al.: Preliminary study on somatic cell nuclear transfer in rabbits in Thailand. *J Med Assoc Thai* 86 (2003) 276-281
109. Telford, N. A. et al.: Transition from maternal to embryonic control in early mammalian development: a comparison of several species. *Mol Reprod Dev* 26 (1990) 90-100
110. Tilghman, S.M.: The sins of the fathers and mothers: genomic imprinting in in mammalien development. *Cell* 96 (1999) 185-193

111. Van Blerkom, J. et al.: Differential mitochondrial distribution in human pronuclear embryos leads to disproportionate inheritance between blastomeres: relationship to microtubular organization, ATP content and competence. *Human Reproduction* 15 (2000) 2621-2633
112. Van Blerkom, J. et Runner, M.N.: Mitochondrial reorganization during resumption of arrested meiosis in the mouse oocyte. *Am. J. Anat.* 171 (1984) 335-355
113. Viebahn, C. et al.: Primordial germ cells of the rabbit are specifically recognized by a monoclonal antibody labelling the perimitochondrial cytoplasm. *Histochem Cell Biol* 109 (1998) 49-58
114. Wakayama, T. et Yanagimachi, R.: Cloning of male mice from adult tail-tip cells. *Nature Genet.* 22 (1999) 127-128
115. Wakayama, T. et al.: Full term development of mice from enucleated oocytes injected with cumulus cell nuclei. *Nature* 394 (1998), 369-374
116. Wiekowski, M. et al.: Changes in histone synthesis and in modification at the beginning of the mouse development correlate with the establishment of chromatin mediated repression of transcription. *J Cell. Sci.* 110 (1997) 1147-1158
117. Wiekowski, M. et al.: Regulation of gene expression in preimplantation mouse embryos : effects of the zygotic clock and the first mitosis on promoter and enhancer activities. *Dev. Biol.* 147 (1991) 403-414
118. Wilmut, I., Schnieke, A. et al.: Viable offsprings derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature* 385 (1997) 810-813
119. Worrall, D.M. et al.: Regulation of gene expression in the mouse oocyte and early preimplantation embryo: development changes in Sp1 + TATA box-binding protein TBP, *Development* 120 (8) (1994) 2347-57
120. Yaffe, M.P.: The machinery of mitochondrial inheritance and behavior. *Science* 283 (1999) 1493-1497
121. Yeom, Y.I. et al.: Germline regulatory element of Oct-4 specific for the totipotent cycle of embryonal cells. *Development* 122 (1996) 881-894
122. Yin, X.J. et al.: Effect of delayed enucleation on the developmental potential of nuclear-transferred oocytes receiving adult and fetal fibroblast cells. *Zygote* 10 (3) (2002) 217-22
123. Zernicka-Goetz, M. et al.: Cytoskeletal organization of rat oocytes during metaphase II arrest and following abortive activation: A study by confocal laser scanning microscopy. *Mol Reprod Dev* 35 (1993) 165-175
124. Zheng, Y. L. et al.: Effects of oocyte age, cumulus cells and injection methods on in vitro development of intracytoplasmic sperm injection rabbit embryos. *Zygote* 12 (2004) 75-80

6. Anlage

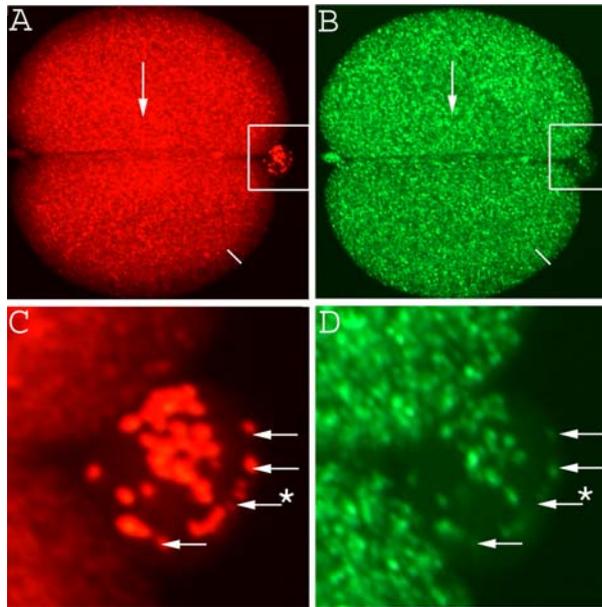


Abb.3: 2-Zellstadium in whole-mount-Präparation nach Entwicklung in vivo und Immunfluoreszenz-Doppelfärbung mit PG2- und MTC02-Antikörpern. Fluoreszenzaufnahmen mit Anregung für PG2- (520 nm, **A** und **C**) und MTC02-Inkubation (450 nm, **B** und **D**) bei schwacher (**A** und **B**) und starker Vergrößerung (**C** und **D**, Ausschnitt aus **A** und **B**). Die Blastomeren zeigen einen Randsaum mit verringerter Reaktionsintensität (Balken) und einen zentralen Bereich mit erhöhter Reaktionsintensität (Pfeil) mit dem PG2-Antikörper (**A**), während die Reaktion mit dem MTC02-Antikörper über die Blastomere gleichmäßig verteilt ist (**B**). Im

Polkörperchen (**C** und **D**) reagieren manche Mitochondrien mit dem MTC02-Antikörper schwächer (Pfeile) Vergrößerung: (**A**) und (**B**) x100, (**C**) und (**D**) x2400.

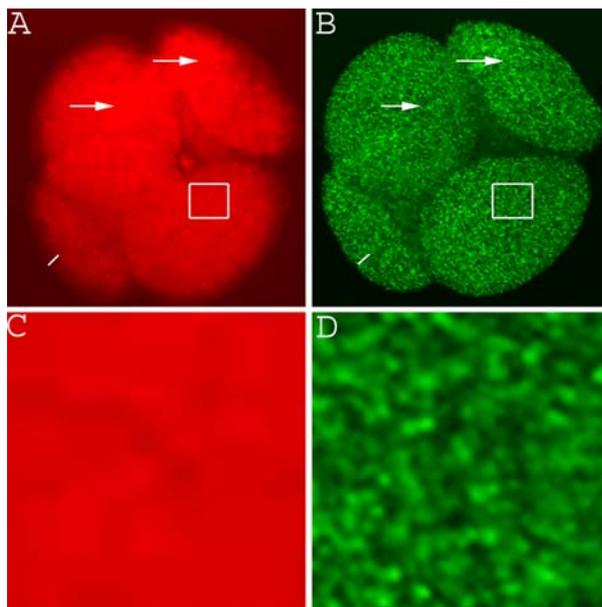


Abb. 4: 4-Zellstadium nach Entwicklung in vivo. (**A** und **C**) PG2- (**B** und **D**) MTC02-Inkubation bei schwacher (**A** und **B**) und starker Vergrößerung (**C** und **D**, Ausschnitt aus **A** und **B**). Die Blastomeren zeigen einen Randsaum verringerter PG2-Reaktionsintensität (Balken) und umschriebene Bereiche erhöhter PG2-Reaktionsintensität (Pfeile) (**A**), während die Reaktion mit dem MTC02-Antikörper über die Blastomere gleichmäßig verteilt ist (**B**). Das Reaktionsmuster des MTC02-Antikörpers ist granulär (**D**), während der PG2-Antikörper (**C**) diffus erscheint. Vergrößerung: (**A**) und (**B**) 100x, (**C**) und (**D**) 4800x

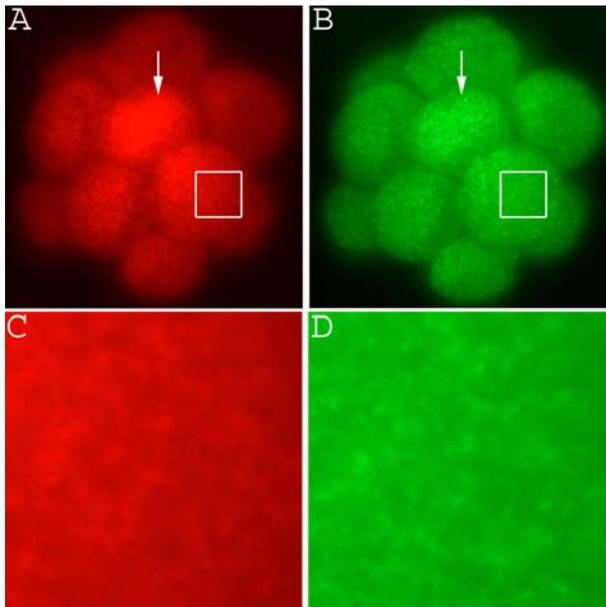


Abb. 5: 17-Zellstadium nach Entwicklung in vivo. (A und C) PG2- (B und D) MTC02-Inkubation bei schwacher (A und B) und starker Vergrößerung (C und D, Ausschnitt aus A und B). Der Embryo zeigt einen zentralen Bereich mit erhöhter Reaktionsintensität (Pfeile) mit dem PG2-Antikörper (A) und leicht erhöhter Reaktionsaktivität mit dem MTC02-Antikörper (B). Das Reaktionsmuster des MTC02-Antikörpers (D) und des PG2-Antikörpers (C) ist granulär. Vergrößerung: (A) und (B) x100, (C) und (D) x4300.

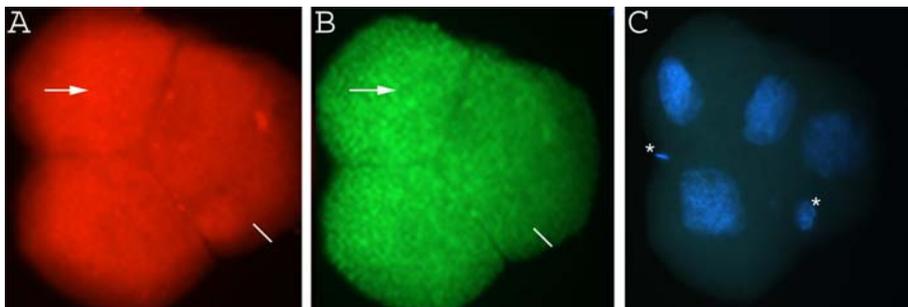


Abb. 6: 4-Zellstadium nach Entwicklung in vitro (24h p.c.). (A) PG2-, (B) MTC02-Inkubation, (C) Dapi-Inkubation. Der Embryo zeigt einen Randsaum mit verringerter Reaktionsintensität (Balken) und eine Blastomere mit erhöhter Reaktionsintensität (Pfeil) mit dem PG2-Antikörper (A), während die Reaktion mit dem MTC02-Antikörper über den Embryo gleichmäßig verteilt ist (B). In der Dapi-Färbung sind die Polkörperchen (Sternchen) noch erkennbar (C). Vergrößerung: x100.

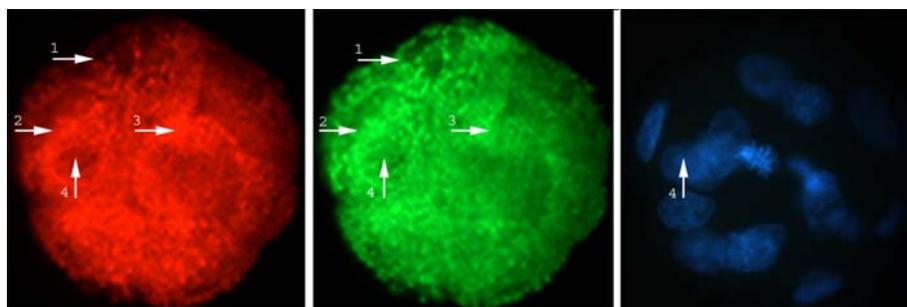


Abb. 7: 16-Zellstadium nach Entwicklung in vitro (24h p.c.). (A) PG2-, (B) MTC02-Inkubation, (C) Dapi-Inkubation. Pfeil 1 markiert Bereich schwächerer, Pfeil 2 gleichstarker, Pfeil 3 stärkerer PG2-Reaktionsintensität mit dem PG2-Antikörper (A) im Vergleich zur Reaktionsintensität mit dem (B) MTC02-Antikörper. Einige Bereiche verringerter Reaktionsintensität mit beiden Antikörpern können in der Dapi-Färbung Zellkernen zugeordnet werden (Pfeil 4). Vergrößerung: x100.

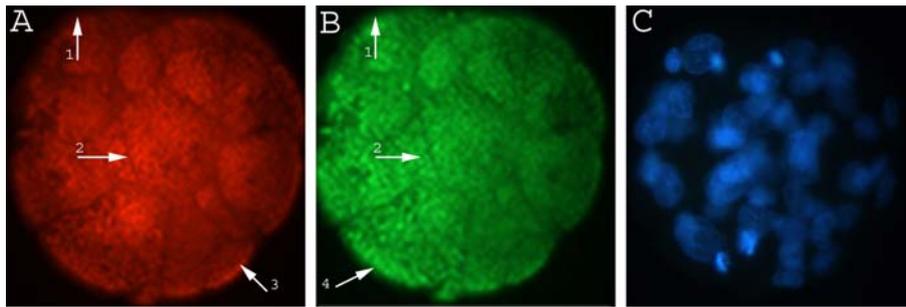


Abb. 8: Morula-Stadium nach Entwicklung in vitro (24h p.c.). (A) PG2-, (B) MTC02-Inkubation, (C) Hoechst-Inkubation. Vertikaler Pfeil markiert schwächere, horizontaler Pfeil stärkere PG2 Reaktionsintensität (A) im Vergleich zur Reaktionsintensität mit dem MTC02-Antikörper (B). Die Dapi-Färbung zeigt in Größe und Form gleichmäßige Kerne (C). Vergrößerung: x100.

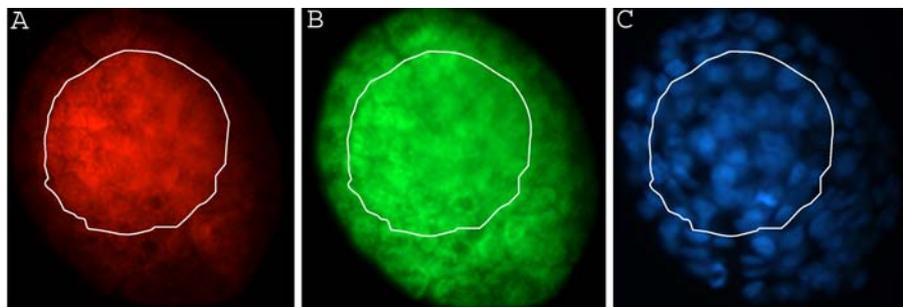


Abb. 9: Blastozyste nach Entwicklung in vitro (24h p.c.). (A) PG2-, (B) CoxIV-Inkubation, (C) Dapi-Inkubation. Die Innere Zellmasse (markiert durch die weiße Umrisslinie) ist in der Dapi-Färbung (C) an einem Bereich mit größeren Zellkernen erkennbar und stellt sich in der PG2-Färbung (A) mit einer starken Reaktionsintensität dar. In der CoxIV-Inkubation (B) ist der Übergang von Innerer Zellmasse zu Trophoblast weniger scharf. Vergrößerung: x100.

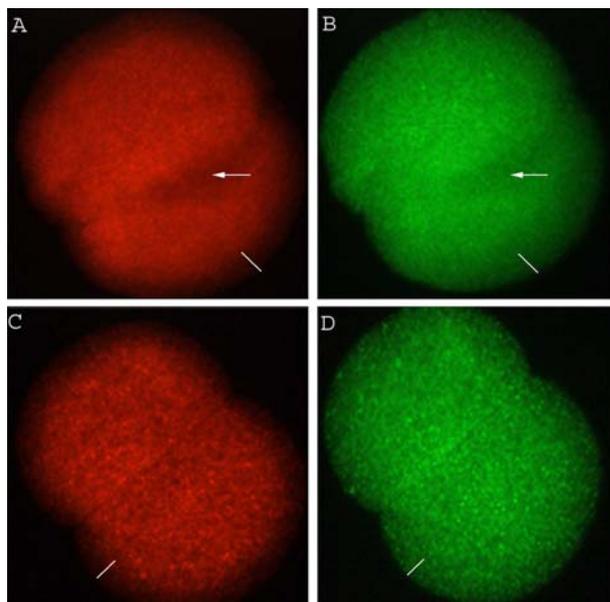


Abb. 10: 2-Zellstadium nach Entwicklung in vitro (19h p.c.). (A und C) PG2-, (B und D) MTC02-Inkubation; (A) und (B) Embryo I, (C) und (D) Embryo II. Die Embryonen zeigen einen Randsaum mit verringerter Reaktionsintensität (Balken) mit dem PG2-Antikörper (A), während die Reaktion mit dem MTC02-Antikörper über den Embryo gleichmäßig verteilt ist (B). Embryo I (A und B) zeigt mit beiden Antikörpern ein eher diffuses Reaktionsmuster, sowie an den Kontaktstellen der Blastomeren Bereiche verringerter Reaktionsintensität. Vergrößerung: x100.

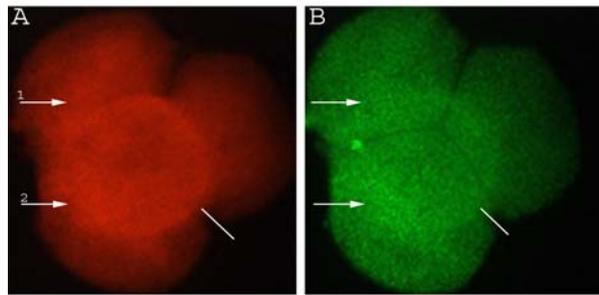


Abb. 11: 4-Zellstadium nach Entwicklung in vitro (19h p.c.). (A) PG2-, (B) MTC02-Inkubation. Der Embryo zeigt Bereiche höherer (Pfeil 1), und gleicher (Pfeil 2) PG2- (A) und MTC02- (B) Reaktionsintensität sowie einen Randsaum mit verringerter Reaktionsintensität (Balken) mit dem PG2-Antikörper. Vergrößerung: x100.

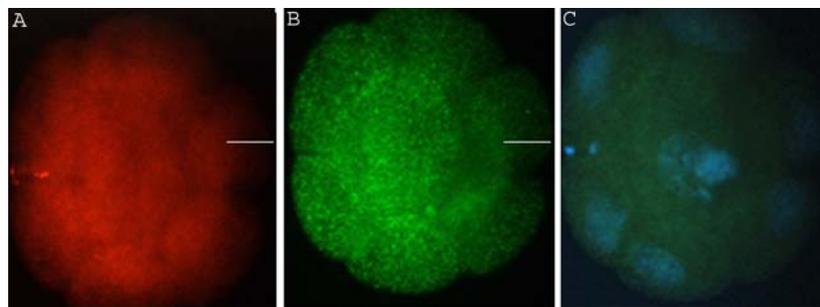


Abb. 12: 8-Zellstadium nach Entwicklung in vitro (19h p.c.). (A) PG2-, (B) MTC02-Inkubation, (C) Dapi-Inkubation. Der Embryo zeigt einen Randsaum mit verringerter Reaktionsintensität (Balken) mit dem PG2-Antikörper. Vergrößerung: x100.

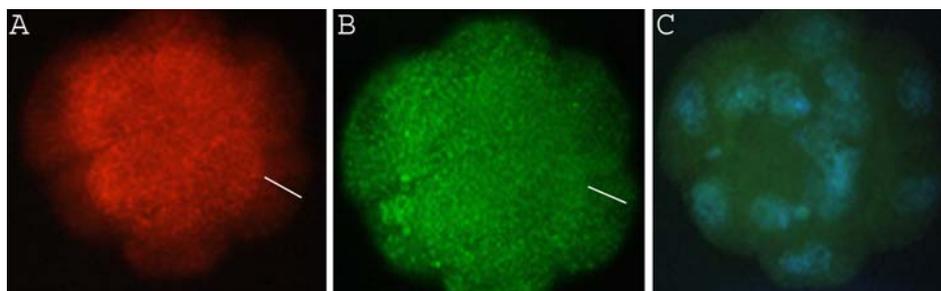


Abb. 13: 16-Zell-Stadium nach Entwicklung in vitro (19h p.c.). (A) PG2-, (B) MTC02-Inkubation, (C) Dapi-Inkubation. Der Embryo zeigt einen Randsaum mit verringerter Reaktionsintensität (Balken) mit dem PG2-Antikörper. Vergrößerung: x100.

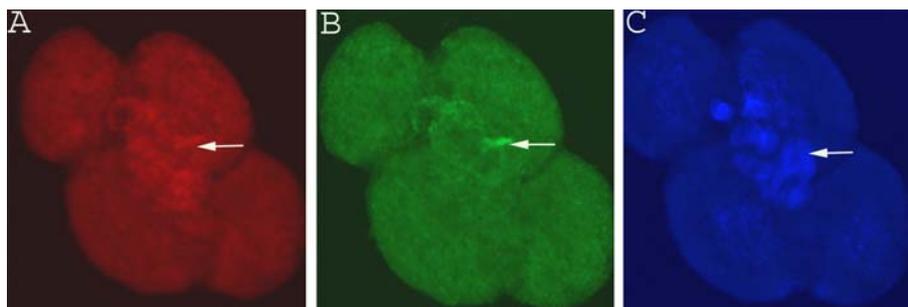


Abb. 14: 4-Zellstadium nach Kerntransfer mit Blastomeren. (A) PG2-, (B) MTC02-Inkubation, (C) Hoechst-Inkubation. Der Embryo zeigt mit dem PG2- (A) und dem MTC02- (B) Antikörper ein granuläres Reaktionsmuster bei allerdings stark erhöhter Belichtungszeit der Aufnahmen (A) u. (B) und in der Hoechst-Färbung (C) einen Bereich mit einer erhöhten Anzahl von für Blastomere ungewöhnlich kleinen Zellkernen (Pfeile). Vergrößerung: x100.

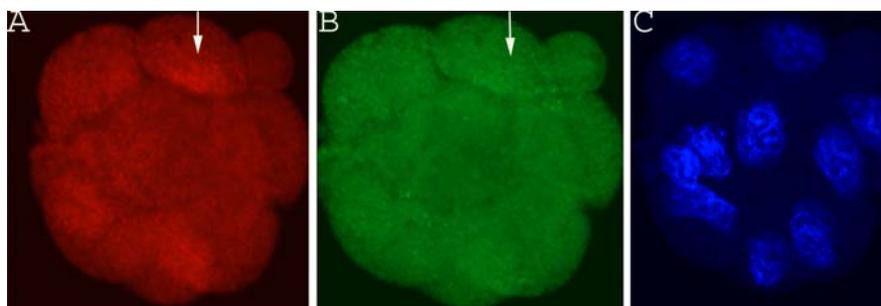


Abb. 15 16-Zellstadium nach Kerntransfer mit Blastomeren. (A) PG2-, (B) MTC02-Inkubation, (C) Hoechst-Inkubation. Der Embryo zeigt Bereiche erhöhter Reaktionsintensität mit dem PG2-Antikörper (A) (Pfeile) und mit dem PG2- und dem MTC02- (B) Antikörper ein granuläres Reaktionsmuster. Vergrößerung: x100.

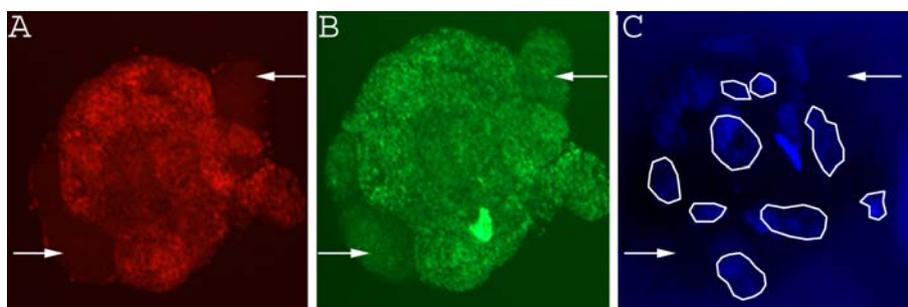


Abb. 16: Morula-Stadium nach Kerntransfer mit Blastomeren. (A) PG2-, (B) MTC02-Inkubation, (C) Hoechst-Inkubation. Der Embryo zeigt Bereiche negativer PG2-Reaktionsintensität (A), die eine normale Reaktionsintensität mit dem MTC02-Antikörper (B) zeigen und in der Dapi-Färbung (C) keine Kerne aufweisen (Pfeile). In der Dapi-Färbung (C) erscheinen die Zellkerne in unterschiedlichen Größen (s. weiße Umrisslinien). Vergrößerung: 100x.

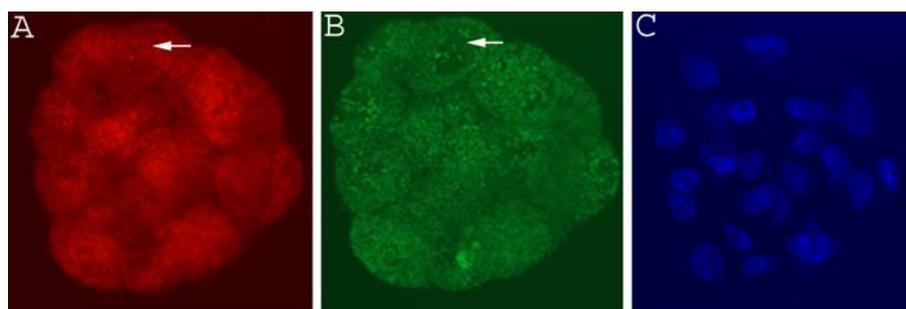


Abb. 17 : Morula-Stadium nach Kerntransfer mit Blastomeren. (A) PG2-, (B) MTC02-Inkubation, (C) Hoechst-Inkubation. Der Embryo zeigt Bereiche, die eine negative Reaktionsintensität mit dem MTC02-Antikörper (B) aufweisen, während die Reaktion mit dem PG2-Antikörper (B) positiv ist (Pfeile). In vielen Fällen stimmen diese Bereiche mit der Ausdehnung von Zellkernen überein, die sich in der Hoechst-Färbung abzeichnen (C). Vergrößerung: x100.

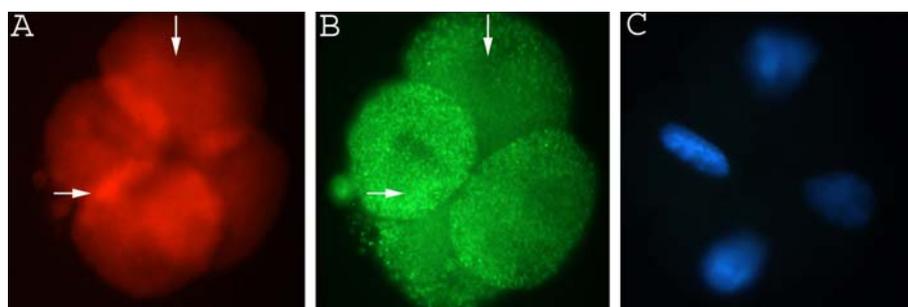


Abb. 18: 4-Zellstadium nach Kerntransfer mit fetalen Fibroblasten. (A) PG2-, (B) MTC02-Inkubation, (C) Dapi-Inkubation. Der Embryo zeigt Bereiche stärkerer Reaktionsintensität mit beiden Antikörpern (horizontaler Pfeil) und unterschiedlicher Reaktionsintensität der Antikörper (vertikaler Pfeil). Vergrößerung: x100.

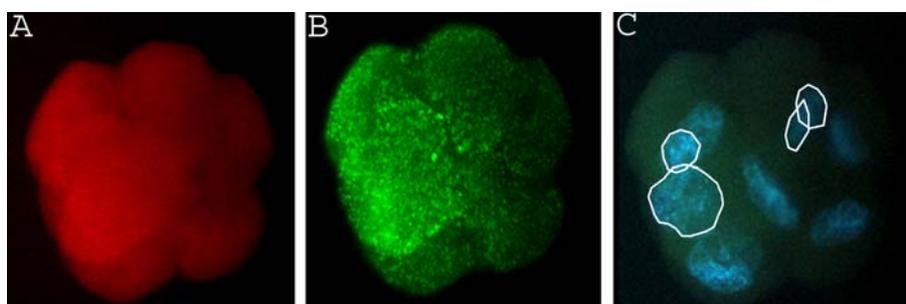


Abb. 19: 8-Zellstadium nach Kerntransfer mit fetalen Fibroblasten. (A) PG2-, (B) MTC02-Inkubation, (C) Dapi-Inkubation. Der Embryo zeigt in der Dapi-Färbung unterschiedliche Größen der Kerne (s. weiße Umrisslinien), mit dem PG2-Antikörper (A) ein diffuses Reaktionsmuster und mit dem MTC02-Antikörper (B) ein granuläres Reaktionsmuster. Vergrößerung: x100.

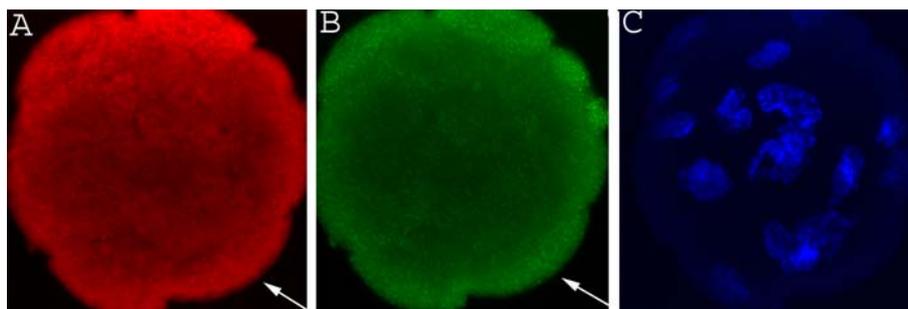


Abb. 20: 16-Zellstadium nach Kerntransfer mit fetalen Fibroblasten. (A) PG2-, (B) MTC02-Inkubation, (C) Dapi-Inkubation. Der Embryo zeigt einen Randsaum mit granulärem Reaktionsmuster (Pfeil) mit dem MTC02-Antikörper (B), während der PG2-Antikörper auch (A) in zentralen Bereichen eine starke Reaktion und durchweg ein weiter verbreitetes granuläres Reaktionsmuster zeigt. Vergrößerung: x100.

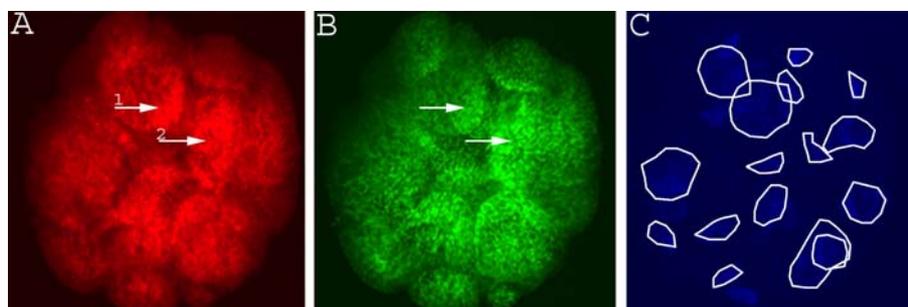


Abb.21: Morula-Stadium nach Kerntransfer mit fetalen Fibroblasten. (A) PG2-, (B) MTC02-Inkubation, (C) Dapi-Inkubation. Der Embryo zeigt Bereiche erhöhter Reaktionsintensität mit dem PG2-Antikörper (A) (Pfeil1) und Bereiche gleicher Reaktionsintensität mit beiden Antikörpern (Pfeil 2), sowie in der Hoechst-Färbung (C) unterschiedliche Größen der Kerne (weiße Umrisslinien). Vergrößerung: x100.

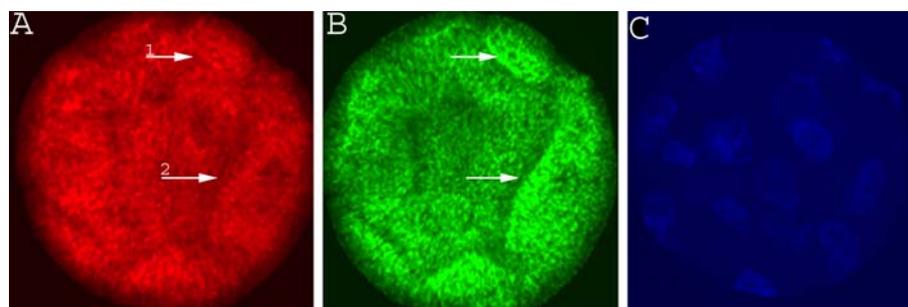


Abb. 22: Morula-Stadium nach Kerntransfer mit fetalen Fibroblasten. (A) PG2-, (B) MTC02-Inkubation, (C) Hoechst-Inkubation. Der Embryo zeigt Bereiche unterschiedlicher Reaktionsintensitäten des PG2- (A) und MTC02- (B) Antikörpers (Pfeile). Vergrößerung: x100.

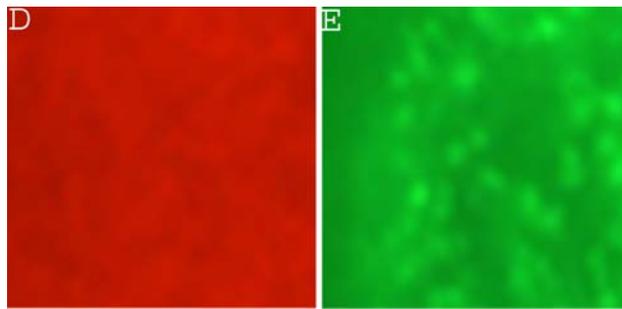
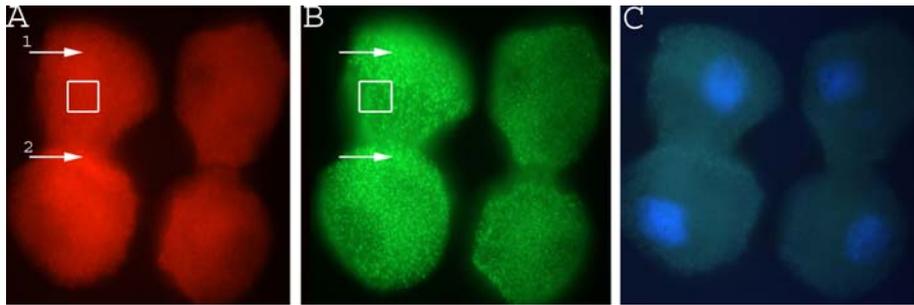


Abb. 23: 4-Zellstadium nach Kerntransfer mit Cumuluszellen. PG2- (A und D) und MTC02-Inkubation (B und E) bei schwacher (A und B) und starker Vergrößerung (D und E, Ausschnitt aus A und B), (C) Dapi-Inkubation. Der Embryo zeigt Bereiche erhöhter Reaktionsintensität mit dem MTC02-Antikörper (B) (Pfeil1) und Bereiche erhöhter Reaktionsintensität mit dem PG2-Antikörper (A) (Pfeil 2). Das Reaktionsmuster mit dem MTC02-Antikörper ist granulär und mit dem PG2-Antikörper diffus (D) und (E). Vergrößerung: (A) und (B) x100, (C) und (D) x8600.

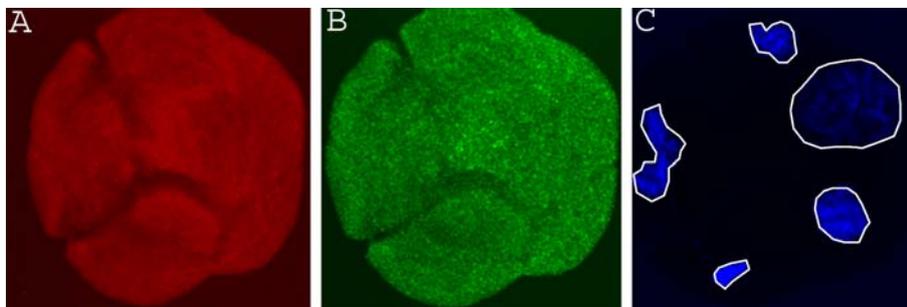


Abb. 24: 4-Zellstadium nach Kerntransfer mit Cumuluszellen. (A) PG2-, (B) MTC02-Inkubation, (C) Hoechst-Inkubation. Der Embryo zeigt in der Hoechst-Färbung unterschiedliche Größen der Kerne (weiße Umrisslinien). Das Reaktionsmuster mit dem PG2-Antikörper (A) zeigt sich diffus, mit dem MTC02-Antikörper (B) hingegen granulär.

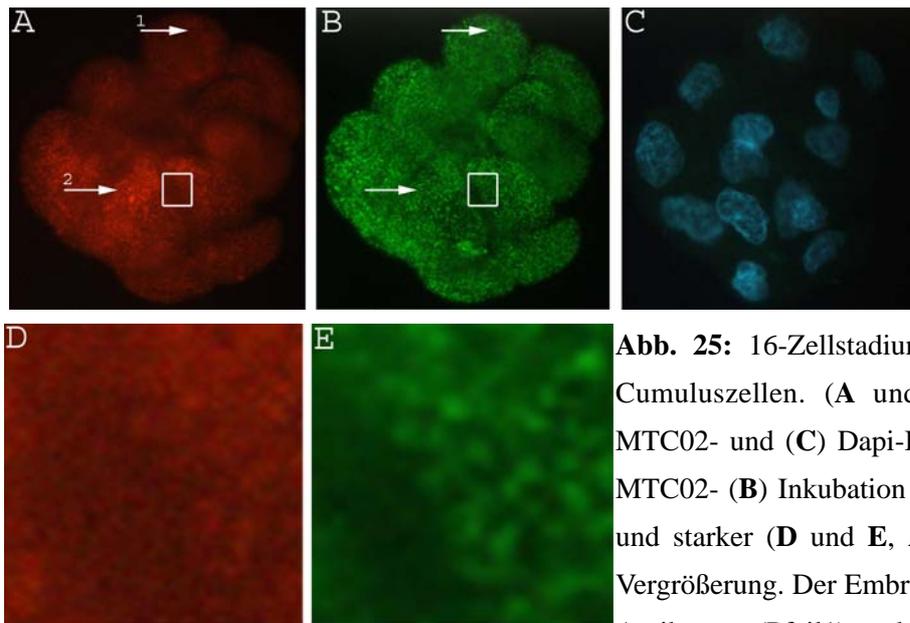


Abb. 25: 16-Zellstadium nach Kerntransfer mit Cumuluszellen. (A und D) PG2-, (B und E) MTC02- und (C) Dapi-Inkubation. PG2- (A) und MTC02- (B) Inkubation bei schwacher (A und B) und starker (D und E, Ausschnitt aus A und B) Vergrößerung. Der Embryo zeigt mit dem MTC02-Antikörper (Pfeil1) und mit dem PG2-Antikörper (Pfeil2) Bereiche stärkerer Reaktionsintensität. Das Reaktionsmuster mit beiden Antikörpern ist granulär (D und E). Vergrößerung: (A) und (B) x100, (C) und (D) x8500.

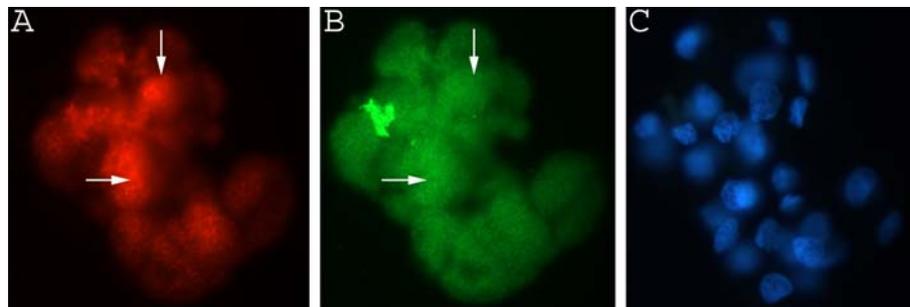


Abb. 26: Morula-Stadium nach Kerntransfer mit Cumuluszellen. (A) PG2-, (B) CoxIV-Inkubation, (C) Dapi-Inkubation. Der Embryo zeigt Bereiche erhöhter Reaktionsintensität mit dem PG2-Antikörper (A) (Pfeile) und mit dem CoxIV-Antikörper (B) eine gleichmäßige Reaktionsintensität. Vergrößerung: x100.

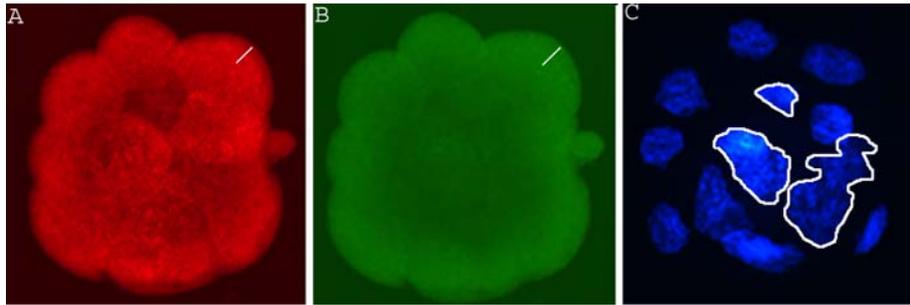


Abb. 27: Morula-Stadium parthenogenetischer Embryonen. (A) PG2-, (B) MTC02-, (C) Hoechst-Inkubation. Der Embryo zeigt mit dem MTC02-Antikörper (B) einen Randsaum mit granulärem Reaktionsmuster (Balken) bei diffusem Reaktionsmuster im Zentrum des Embryos, mit PG2-Antikörper (A) ein granuläres Reaktionsmuster im ganzen Embryo. In der Hoechst-Färbung zeigen sich unterschiedliche Kerngrößen (weiße Umrisslinien). Vergrößerung: x100.

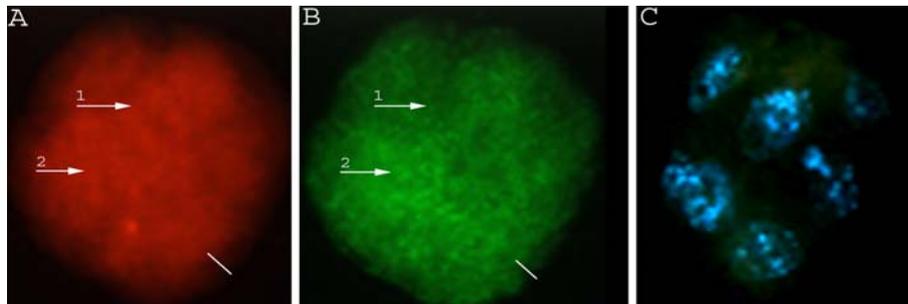


Abb. 28: 6-Zellstadium nach α -Amanitinbehandlung. (A) PG2-, (B) MTC02-Inkubation, (C) Dapi-Inkubation. Der Embryo zeigt Bereiche erhöhter Reaktionsintensität mit dem PG2-Antikörper (A) (Pfeil1) und dem MTC02-Antikörper (B) (Pfeil2) und einen Randsaum schwächerer Reaktionsintensität mit dem PG2-Antikörper (Balken). Das Reaktionsmuster mit dem MTC02-Antikörper (B) ist granulär, während das des PG2-Antikörpers (A) grobgranulär bis diffus erscheint. Vergrößerung: x100.

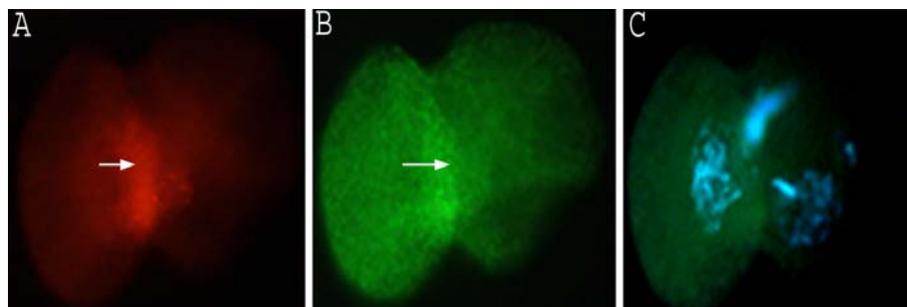


Abb. 29: 2-Zellstadium nach Actinomycin-D-Behandlung. (A) PG2-, (B) MTC02-Inkubation, (C) Dapi-Inkubation. Der Embryo zeigt Bereiche erhöhter Reaktionsintensität mit beiden Antikörpern (Pfeile). Das Reaktionsmuster mit dem MTC02-Antikörper (B) ist granulär, während das des PG2-Antikörpers (A) diffus erscheint. Vergrößerung: x100.

7. Thesen

1. Klonierungstechnik hat ungeahnte Einblicke in Vorgänge der embryonalen Frühentwicklung möglich gemacht.
2. Diese Einblicke betreffen v.a. die epigenetischen Modifizierungen des Genoms und die Reprogrammierung des Genoms adulter Zellen für die embryonale Entwicklung.
3. Die allgemeine Bedeutung des Eizell-Zytoplasmas für die embryonale Frühentwicklung ist seit längerem bekannt; die Demethylierung durch eine "putative Demethylase" zum Zweck der Umprogrammierung liefern neue Erkenntnisse über spezifische Funktionen zytoplasmatischer Faktoren.
4. Eine spezifische kausale Rolle für Mitochondrien bei übergeordneten zellulären Vorgängen ist bisher nur für den Fall der Apoptose näher beschrieben, könnte jedoch auch für ihre ursächliche Beteiligung an epigenetischen Vorgängen der embryonalen Frühentwicklung sprechen.
5. Probleme beim reproduktiven Klonieren bestehen vor allem in einer geringen Gestationsrate und vielfältigen Entwicklungsstörungen wie dem sog. „large offspring syndrom“ nach der Geburt.
6. Aktuelle Klonierungsprotokolle erfordern eine frühzeitige Erkennung der Entwicklungspotenz geklonter Säugetiere.
7. Vergleich konstitutioneller biochemischer Parameter mit keimzellspezifischen Parametern wie dem PG2-Epitop in normalen und klonierten Embryonen könnte Aufschluß über den Entwicklungsverlauf klonierter Embryonen geben.
8. Eine Phase diffuser, wahrscheinlich nicht mitochondrien-gebundener Immunreaktivität des PG2-Epitops zwischen dem 4- und 16-Zell-Stadium fällt mit dem Zeitpunkt des Wechsels von maternaler Transkription zu selbständiger zygotischer Transkription - maternal to zygotic transition (MZT) - zusammen und legt somit nahe, dass Mitochondrien während der MZT eine Umstrukturierung durchmachen.
9. Der keimzellspezifische mitochondriale Antikörper PG2 dient als verlässlicher Parameter in der Beurteilung der Entwicklungspotenz geklonter Kaninchen.

10. Das Morulastadium ist Schlüsselstadium in der embryonalen Frühentwicklung, da ab diesem Stadium die mitochondriale Differenzierung in klonierten Embryonen ähnlich derjenigen in normalen Embryonen ist.

11. Mitochondriale Differenzierung und Dynamik ist ein essentieller Vorgang in der frühen embryonalen Entwicklung von Säugetieren.

Tabellarischer Lebenslauf

1978	Geburt in Haan am 3. Februar als Sohn der Eheleute Ursula Weckelmann, geb. Mewes und Wolfgang Weckelmann
1984 - 1988	Besuch der Gemeinschaftsgrundschule Einern in Wuppertal
1988 - 1997	Besuch des Carl-Duisberg-Gymnasiums in Wuppertal mit Abschluß Abitur
1997 - 1998	Zivildienst am Krankenhaus Martha Maria in München
1998	Im Oktober Beginn des Studiums der Humanmedizin an der Martin-Luther-Universität Halle Wittenberg
2000	Physikum an der Martin-Luther-Universität
2001	Im August 1. Staatsexamen an der Martin-Luther Universität
2001	Im Oktober Beginn der Promotion am Institut für Anatomie und Zellbiologie der Martin-Luther-Universität
2002	Von Januar bis April und von September bis Oktober Aufenthalt am INRA, Jouy-en-Josas, Frankreich
2003	Im April Wechsel an die Georg-August-Universität Göttingen
2004	Im März 2. Staatsexamen an der Georg-August-Universität
2004	Von April an Praktisches Jahr mit Aufhalten am Hôpital Riviera, Montreux, Schweiz, Hôpital St. Vincent de Paul, Paris, Frankreich und am Städt. Klinikum Lüneburg

Selbständigkeitserklärung

Gemäß § 6 der Promotionsordnung der Martin-Luther Universität Halle-Wittenberg, erkläre ich hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet.

Ich versichere, dass ich für die inhaltliche Erstellung der vorliegenden Arbeit nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- und Beratungsdiensten (Promotionsberater oder andere Personen) in Anspruch genommen habe. Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.

Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Lüneburg den 16.01.2005

Erklärung über frühere Promotionsversuche

Gemäß § 6 der Promotionsordnung der Martin-Luther Universität Halle-Wittenberg, erkläre ich hiermit, dass ich außer der vorliegenden Arbeit keine weiteren Promotionsversuche durchgeführt habe.

Lüneburg den 16.1.2005

Danksagung

Vielen Menschen schulde ich großen Dank für unermüdliche Hilfe und Unterstützung während der etwas mehr als drei Jahre anhaltenden Arbeit. Auch wenn sich vielleicht nicht alle an dieser Stelle wieder finden werden, jeder Mensch, dessen Unterstützung mich in dieser Zeit trug, jeder Mensch, den ich treffen durfte auf dem langen Weg dieser Arbeit hat mir geholfen, so manchen Tiefpunkt zu überwinden und die Zuversicht nicht zu verlieren.

Herrn Prof. Dr. Christoph Viebahn danke ich sehr für die Überlassung des Themas, und die gute Betreuung. Ihm verdanke ich meine Einführung in die Wissenschaft, die er mit viel Verständnis und Vertrauen begleitet und gefördert hat. Für die geduldige und freundliche Hilfe bei den ersten wissenschaftlichen Schritten im embryologischen Labor am Institut für Anatomie und Zellbiologie Halle/Saale danke ich sehr herzlich Elke Bernhard und Rosemarie Rappold. Ebenso danke ich Herrn Prof. Dr. Dr. Bernd Fischer für die über einen langen Zeitraum gewährte großzügige Bereitstellung der Räumlichkeiten. Evelyn Axmann und Elisabeth George bin ich für perfekte administrative Unterstützung während dieser Zeit zu großem Dank verpflichtet.

Während meiner Zeit im INRA, Jouy-en-Josas, die ich Herrn Prof. Dr. Christoph Viebahn und Herrn Prof. Dr. Jean-Paul Renard zu verdanken habe, unterstützte mich mit großer Freundlichkeit und persönlichem Engagement die ganze Equipe der Unité Biologie de Développement um Jean-Paul Renard. Insbesondere bin ich Dr. Mireille Challah-Jacques und Dr. Patrick Chesné für die sorgfältige und exzellente Klonierungsarbeit und unermüdliche Unterstützung zu großem Dank verpflichtet. Patrick Chesné begleitete mich auch während der Textarbeit stets mit großer Freundlichkeit und nie endender Geduld. Besonders möchte ich ihm auch danken für einen unvergesslichen Tag auf dem Salon d'Agriculture in Paris. Weitere technische Hilfe gewährten mir Evelyn Campion, Nathalie Daniel und Dr. Pierre Adenot. Dr. Isabelle Hue und Jacqueline Mahé waren immer für mich da bei technischen und menschlichen Problemen. Ebenso Dr. Vincent Brochard und Dr. Laurent Boulanger, die nie zögerten, ihre eigenen Projekte zu verlassen, wenn sie mir helfen konnten. Martine Michel und Valerie Lespinas waren die treuen Seelen des Sekretariates, die so manchen Frust auffingen.

Während der letzten Phase in Göttingen standen mir Irmgard Weiß, Dr. Bernd Püschel und Dr. Peter Schwartz stets hilfreich zur Seite und scheuten keine Mühen, mir bei letzten Versuchen Unterstützung zu gewähren. Darüber hinaus danke ich Heike Altmann für ihre stets engagierte und unbürokratische Hilfe.

Speziellen Dank schulde ich Herrn Prof. Dr. Stefan Wirth, der mich über die letzten beiden Jahre mit außerordentlicher Geduld als unschätzbare Ratgeber begleitete und es schaffte, mich immer wieder neu zu motivieren.

Meinem Bruder danke ich für Rettung in letzter Minute bei der Gestaltung des Bildanhangs und für unendliche Formatierungsarbeiten.

Zu guter letzt möchte ich meiner Familie danken für ihre immerwährende Unterstützung und Geborgenheit, die mir die Kraft gibt, meinen Weg zu gehen.