

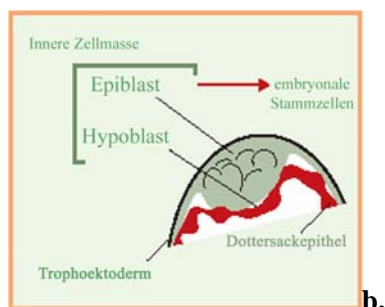
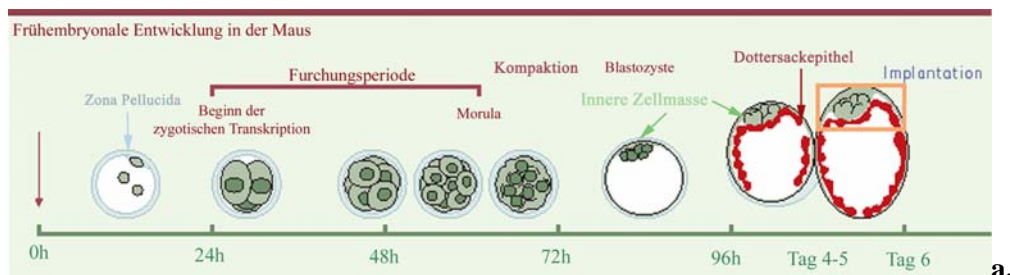
## 1. Einleitung

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 kernähnlichen 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  $\alpha$ -Amanitin als Transkriptionsinhibitor 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 Spermatozoen und somatischer Kerne zu remodellieren (Gurdon, J.B. et al., 1979). Schon die Charakteristika der Oozyte, die aus der 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 Schwankungen 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 Transkriptionsinhibitoren  $\alpha$ -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.