

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 Hepes-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 Transkriptionshemmung, bei denen für eine effektive Unterdrückung der Proteinbiosynthese die Inkubation mit den Transkriptionshemmern 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.