

## 4. Diskussion

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

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

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

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

## **4.1 Methodik**

### **4.1.1 Gewebearbeitung, Immunhistochemie, Modellorganismus**

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

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

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

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

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

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

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

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

### 4.1.2 Transkriptionsinhibitoren

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

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

### **4.1.3 Kerntransfer**

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

## ***4.2 Funktionelle Aspekte im Vergleich der normalen und künstlichen embryonalen Entwicklung***

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

#### **4.2.2 Entwicklungspotenz verschiedener Klone und ihre Beurteilung nach PG2 immunhistochemischer Färbung**

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

#### **4.2.3 Entwicklungspotenz parthenogenetischer Embryonen**

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

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

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

#### **4.2.4 Die Rolle von Mitochondrien in der Reprogrammierung**

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

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

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

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

### **4.3 Einblicke in natürliche embryonale Entwicklung**

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

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

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

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

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