

Regine Schreiner

Klonen durch Zellkerntransfer

Stand der Forschung

Klonen durch Zellkerntransfer Stand der Forschung

Literaturlauswertung im Auftrag
des Nationalen Ethikrates

Klonen durch Zellkerntransfer Stand der Forschung

Literaturauswertung im Auftrag
des Nationalen Ethikrates

INHALT

» Vorwort	9
» 1. Definitionen und Erläuterungen	11
1.1 Klon	11
1.2 Klonen	11
1.3 Reproduktives Klonen	15
1.4 Interspezies-Kerntransfer	16
1.5 Therapeutisches Klonen	17
1.6 Hemiklonen	19
» 2. Meilensteine der Kerntransfertechnik	20
» 3. Gesetzliche Regelung des Klonens durch Kerntransfer in Deutschland	21
» 4. Effizienz des Klonens durch Kerntransfer	22
4.1 Effizienz und Sicherheit des reproduktiven Klonens bei Säugetieren	22
4.2 Gründe für die niedrige Effizienz des Klonens (Epigenetik)	27
4.2.1 DNA-Methylierung und Modifikation der Histone	30
4.2.2 Genexpressionsmuster	32
4.2.3 Inaktivierung des X-Chromosoms	34
4.2.4 Erhalt der Telomere	35
4.2.5 Remodellierung des Chromatins	35
4.2.6 Vererbung epigenetischer Modifikationen	36
4.2.7 Variationen im Phänotyp der Klone	36
4.3 Effizienz und Sicherheit des therapeutischen Klonens bei Säugetieren	37
» 5. Veröffentlichungen im Hinblick auf Kerntransfer beim Menschen	45
» 6. Nutzen und Risiken	47
6.1 Nutzen und Risiken des reproduktiven Klonens	47
6.2 Nutzen und Risiken des therapeutischen Klonens	52
» 7. Aussichten	54
7.1 Kerntransfer beim Menschen	54
7.2 Reproduktives Klonen von Tieren	54
7.3 Mögliche Relativierung der postulierten Notwendigkeit des therapeutischen Klonens	55
» Tabellen	57
» Abkürzungsverzeichnis	71
» Glossar	73
» Bibliographie	75

Herausgegeben vom Nationalen Ethikrat

Vorsitzender: Prof. Dr. Drs. h. c. Spiros Simitis
Jägerstraße 22/23 • D-10117 Berlin
Telefon: +49/30/203 70-242 • Telefax: +49/30/203 70-252
E-Mail: kontakt@ethikrat.org
www.ethikrat.org

Nationaler Ethikrat
Klonen durch Zellkerntransfer. Stand der Forschung

© 2005 Nationaler Ethikrat
Alle Rechte vorbehalten
Eine Abdruckgenehmigung wird auf Anfrage gern erteilt.
Gestaltung: BartosKersten Printmediendesign, Hamburg
Herstellung: Druckhaus Berlin-Mitte

VORWORT

Die vorliegende Zusammenfassung hat das Ziel, weltweit angewandte Techniken auf dem Gebiet des Klonens, insbesondere des Kerntransferklonens mit somatischen Zellen, erklärend darzustellen und deren aktuelle Perspektiven und Limitierungen aufzuzeigen. Erst wenn die technischen Möglichkeiten samt ihren Chancen und Risiken systematisch untersucht sind, kann ein möglicher Rahmen von Anwendungen definiert und die notwendige gesetzliche Reglementierung durchgesetzt werden.

1. Definitionen und Erläuterungen

1.1 Klon

Ein Klon (griechisch: κλων Zweig, Schößling) ist eine Gruppe von genetisch identischen Zellen oder Organismen, die durch Teilung (ungeschlechtliche Fortpflanzung) aus einer einzigen Zelle oder einem einzelnen Organismus hervorgegangen ist.

Als Klone kann man demnach eineiige Zwillinge oder Mehrlinge betrachten, ebenso Tiere, die gezielt durch mikrochirurgische Teilung früher Embryonalstadien, das so genannte Embryo-Splitting, entstanden sind (Willadsen, 1986). Derzeit wird aber vor allem von solchen Tieren als Klone berichtet, die durch Kerntransfer entstanden sind, wie z.B. das Schaf *Dolly* (Wilmut et al., 1997). Streng genommen handelt es sich bei diesen Individuen nicht um echte Klone, sondern um genomische Kopien, da sie zwar die identische Erbinformation in ihren Zellkernen enthalten, sich aber hinsichtlich ihrer mitochondrialen DNA unterscheiden können (Wolf, 2000).

Mit Blick auf die oben angeführte klassische Definition ist zu betonen, dass auch Zellpopulationen, wie z.B. embryonale Stammzellen, Klone voneinander sind, ohne allerdings zwingenderweise geklont worden zu sein, d.h. sie wurden im Regelfall nicht aus Embryonen gewonnen, welche aus Kerntransfer stammen (Kennedy, 2003).

1.2 Klonen

Der Begriff Klonen kann also grundsätzlich die Anwendung von zwei Techniken bedeuten:

- I. Embryo-Splitting oder
- II. Kerntransfer

I. Embryo-Splitting

Die Technik basiert auf der Teilung von Embryonen in frühen Entwicklungsstadien. So wurden im Jahr 2000 durch Teilung einer Affenzygote vier genetisch identische, gesunde Kloneschwester geboren (Chan et al., 2000).

Die embryonale Entwicklung beginnt mit der Zellteilung (Furchung) der Zygote unmittelbar nach der Befruchtung. Die entstehenden Furchungszellen (Blastomeren) bilden als sekundäre Struktur zuerst einen soliden Zellverband: die Morula (von lat. *Morus* für Maulbeere). Danach folgt das Stadium eines mit Flüssigkeit gefüllten bläschenartigen Gebildes: die Blastozyste. Im Blastozystenstadium besteht der Embryo aus Zellen der inneren Zellmasse (ICM, Embryoblast), Zellen der

äußeren Hülle (Trophoblast) und dem flüssigkeitsgefüllten Hohlraum (Blastocoel). Erst gegen Ende der Furchung löst sich die primäre Hülle der Eizelle (*Zona pellucida*) vom Embryo ab. Damit ist der Embryo reif für die Einnistung in den Uterus (Implantation). Die weitere Entwicklung des Embryos setzt sich nach der Furchung mit der Keimblattbildung fort (Schnorr, 1989).

Die Embryo-Splitting-Technik ist unter anderem für die Spezies Maus, Kaninchen, Schaf, Rind, Schwein, Ratte und Rhesusaffe etabliert. Generell können zwei Methoden angewandt werden: 1. Zwillinge können durch Spaltung von Morulae oder Blastozysten entlang einer Mittelachse entstehen. Innere Zellmasse und Trophoblast werden dabei gleichmäßig aufgeteilt. 2. Mehrlinge entstehen, indem die *Zona pellucida* eines Embryos entfernt, die Blastomeren isoliert und in Gruppen in leere Eihüllen eingesetzt werden (Escriba et al., 2002).

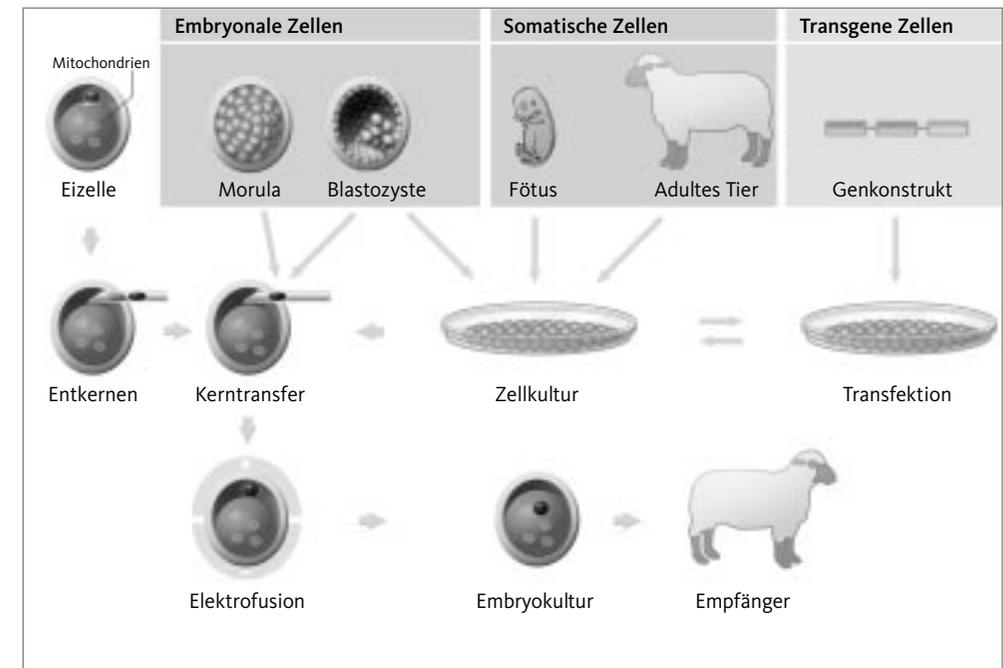
II. Kerntransfer (Nukleus Transfer; NT)

Beim Kerntransfer, wie er für das Schaf *Dolly* etabliert wurde (siehe Abbildung 1, S. 13), wird der Zellkern einer Empfängerzelle, eine Eizelle in der Metaphase der zweiten Reifeteilung, durch Absaugen mit einer Mikropipette entfernt (Campbell et al., 1994; Wilmut et al., 1997). Danach wird der Zellkern einer Spenderzelle (Karyoplast) in die entkernte Empfängerzelle (Zytoplast) übertragen. Durch den Gebrauch von Mikromanipulatoren bleibt die *Zona pellucida* dabei erhalten. Karyoplast und Zytoplast werden danach durch elektrische Impulse fusioniert (Elektrofusion) bzw. aktiviert.

Dieses Protokoll wurde nicht nur zum Klonen unterschiedlicher Spezies verändert (Galli et al., 2003), sondern auch innerhalb einer Spezies, z.B. beim Rind, wurden viele Variationen des Protokolls experimentell ausgelotet. Als Beispiele sind der Kerntransfer ohne die *Zona pellucida* (*handmade cloning*) oder Protokolle zu nennen, in denen zuerst der Spenderzellkern transferiert wird und danach die Entkernung der Empfängerzelle erfolgt (*reverse-order cloning*) (Peura et al., 2003). Insbesondere bei der Aktivierung der Eizelle sind viele Variationen bekannt: Je nach Protokoll kann sie durch elektrische Impulse, virale oder chemische Stimuli (u.a. Ca⁺⁺-Ionen, 6-Dimethylaminopurin, Cytoheximide, Cytochalasin B) erfolgen. Die Eizelle kann vor, während oder nach der Fusion von Karyoplast mit Zytoplast aktiviert werden.

Da die Erbinformation von Eukaryontenzellen im Zellkern in Form von Chromatin bzw. Chromosomen enthalten ist, verfügen alle Embryonen nach dem Kerntransfer von Zellen desselben Individuums über die gleiche DNA im Zellkern. Im Zytoplasma der Empfängerzellen befinden sich die Mitochondrien, Zellorganellen, die für die Energiegewinnung der Zellen verantwortlich sind und eigene, ringförmige DNA (mtDNA) enthalten. Diese kodiert einen Teil der mitochondrialen Proteine. Da die Spenderzellkerne in unterschiedliche Empfängerzellen eingesetzt

Abbildung 1 Reproduktives Klonen durch Kerntransfer



werden, können sich die so hergestellten Embryonen in ihrer mitochondrialen DNA unterscheiden. Zudem können beim Verfahren des Kerntransfers auch zytoplasmatische Anteile der Spenderzelle, inklusive Mitochondrien, mit dem Zellkern übertragen werden. Eine solche mitochondriale Heteroplasmie wurde bei geklonten Rindern vorgefunden (Hiendleder et al., 1999; Steinborn et al., 2000; Takeda et al., 2003), während Forscher bei anderen Untersuchungen bei geklonten Schafen keine Heteroplasmie nachweisen konnten (Evans et al., 1999). Mittlerweile gibt es erste Versuche, die mitochondriale DNA der Spenderzellen und deren Transkripte vor dem Transfer in die Empfängerzelle zu eliminieren, um eine einseitige Vererbung der mtDNA, nur von der Empfängereizelle auf den Kerntransferembryo zu garantieren (Lloyd et al., 2004).

Damit es zur Entwicklung eines durch Kerntransfer entstandenen Embryos kommen kann, müssen Empfänger- und Spenderzelle hinsichtlich ihrer Zellzyklen synchron sein. Dies ist Voraussetzung für das Entstehen von Embryonen mit normalem, euploidem Chromosomensatz (Campbell, 1999 b). Deshalb werden beim somatischen Nukleustransfer in der Regel Spenderzellkerne in der Ruhephase ihres

Zellzyklus (G0) transferiert (Wilmut et al., 1997). Aber auch Spenderzellkerne seneszenten Zellen wurden bereits erfolgreich für den Nukleustransfer verwendet (Lanza et al., 2000 b). Diese sind kurz vor dem Ende ihrer Zellteilungskapazität in der späten G1-Phase ihres Zellzyklus arretiert. Das optimale Zyklusstadium des Spenderzellkerns hängt zudem vom Typ der Spenderzelle ab. So ergaben vergleichende Studien zum reproduktiven Klonen beim Rind, dass NT von fetalen Fibroblasten in der G0-Phase zu den meisten lebenden Kälbern führte, während NT von transgenen, fetalen Fibroblasten in der G1-Phase am effizientesten war (Wells et al., 2003 a).

Als Empfängerzelle beim Kerntransfer mit somatischen Zellen dient in den meisten Fällen eine Eizelle in der Metaphase der zweiten Reifeteilung, selten eine Eizelle in der Telophase der zweiten Reifeteilung (Baguisi et al., 1999) oder eine Zygote (Polejaeva et al., 2000). Die entkernte Eizelle in der Metaphase der zweiten Reifeteilung ist durch eine hohe Aktivität des M-Phase-Förderfaktors (MPF) charakterisiert, der aus der regulatorischen Untereinheit Cyclin B sowie der katalytischen Komponente p34^{cdc2} besteht. Das aktive Dimer wird durch eine weitere zytoplasmatische Komponente, den *cytostatic factor* (CSF) stabilisiert. Werden die Spenderkerne in einen Zytoplasten mit hoher MPF-Aktivität transferiert, kommt es zur Auflösung der Kernmembran (*nuclear envelope breakdown*; NEBD) und zur Kondensation des Chromatins (*premature chromatin condensation*; PCC). Nach der Aktivierung der Eizelle sinkt die Aktivität des MPF durch die Dissoziation seiner Komponenten. Infolgedessen dekondensiert das Chromatin, die Kernmembran bildet sich wieder, und die DNA der Spenderzelle wird repliziert. Da diese Vorgänge bei der Verwendung von Zytoplasten mit hoher MPF-Aktivität immer ablaufen, hängt die Ploidie des Kerntransferembryos vom Zellzyklusstadium des verwendeten Spenderkerns ab. Befindet sich der Karyoplast in der G1- oder G0-Phase, entstehen bei der PCC einzelne Chromatiden, die nach Aktivierung der Eizelle wieder dekondensieren und nach der Formation der Kernmembran repliziert werden. Nach der Zellteilung liegen dann zwei normale diploide Zellen vor (Wolf, 2000).

Diese Grundvoraussetzungen eines erfolgreichen Kerntransfers mit somatischen Zellen waren beispielsweise bei der wichtigen Versuchstierspezies Ratte lange nicht gegeben, da sich deren Oozyten 60 Minuten nach der Entnahme aus den Eileitern spontan aktivierten, also ihre MPF-Aktivität verminderten. Erst durch reversible Stabilisierung der MPF-Aktivität von Oozyten mit dem Proteaseinhibitor MG132 konnten Empfängerzellen mit hoher MPF-Aktivität für den Nukleustransfer zur Verfügung gestellt werden, was dann erstmals zu Nachkommen aus somatischem Kerntransfer führte (Zhou et al., 2003).

Als Empfängerzelle beim Kerntransfer mit embryonalen Zellen hingegen werden Zytoplasten mit niedriger MPF-Aktivität verwendet: so genannte präaktivierte Eizellen. Im Gegensatz zu somatischen Zellkernen befinden sich embryonale Zellen aufgrund ihrer hohen Zellteilungsaktivität hauptsächlich in der Synthesephase (ca.

80 % einer Zellpopulation zu einem bestimmten Zeitpunkt befinden sich in der S-Phase). Nach dem Transfer eines solchen embryonalen Zellkerns in eine Eizelle mit niedriger MPF-Aktivität bleibt die Kernmembran intakt, und die Phase der Zellteilung (M-Phase) kann direkt im Anschluss beginnen.

1.3 Reproduktives Klonen

Als reproduktives Klonen wird die Anwendung der Kerntransfer-Technik zum Zweck der ungeschlechtlichen Vermehrung von Organismen bezeichnet. Der so gewonnene Embryo wird zum Austragen in ein Empfängertier eingesetzt (Abbildung 1, S. 13). Bei der Auswahl von Donor- und Akzeptorzellen gibt es verschiedene Möglichkeiten. Besonders die Herkunft der Kernspenderzelle verleiht dem reproduktiven Klonen unterschiedliche Bedeutung.

I. Somatische Zellen als Kernspender (SCNT)

Beim so genannten SCNT (*somatic cell nuclear transfer*) durchlaufen differenzierte fetale oder adulte Spenderzellkerne nach dem Einsetzen in die Empfängerzelle eine Reprogrammierung der Genexpression. Der funktionelle Status des Zellkerns wird mit dem Transfer in eine enukleierte Eizelle oder Zygote neu definiert. Dieses Phänomen der Reprogrammierung eröffnet die Perspektive, die Kerntransfertechnik sowohl in der Grundlagenforschung zur Genregulation in somatischen Zellen als auch beim so genannten therapeutischen Klonen anzuwenden. Aus diesem Grund setzt sich die vorliegende Zusammenfassung mit dem SCNT als Schwerpunkt auseinander. Neben differenzierten Zellen konnten bei der Spezies Rind auch adulte, mesenchymale Stammzellen durch Kerntransfer erfolgreich reprogrammiert werden (Kato et al., 2004).

II. Embryonale Zellen oder Embryonale Stammzellen als Kernspender (ECNT oder ESCNT)

Entnimmt man Zellen aus Embryonen im Morulastadium oder aus der inneren Zellmasse von Embryonen im Blastozystenstadium, so geht man davon aus, dass deren Zellkerne noch undifferenziert, also pluripotent, sind. Bemerkenswert ist in diesem Zusammenhang, dass die Aktivierung des embryonalen Genoms je nach Tierart zu unterschiedlichen Zeitpunkten erfolgt. Bei der Maus beginnt dieser Vorgang im 1-bis-2-Zell-Stadium, beim Schwein im 4-bis-8-Zell-Stadium und bei Schaf und Rind erst im 8-bis-16-Zell-Stadium, wobei limitierte Transkriptionsaktivität auch bei diesen Spezies schon ab dem 2-Zell-Stadium beobachtet wird (Campbell, 1999 b; Wolf et al., 1998). Kerntransfer von Zellkernen embryonaler Spenderzellen war der Wegbereiter des gleichen Verfahrens mit somatischen Zellen. Die Effizienz ist bei den meisten Tierarten höher als die des SCNT. So wurden beispielsweise bei Mäusen bis zu 43 % der Blastozysten aus NT embryonaler Zellkerne erfolgreich ausgetragen (Kwon and

Kono, 1996), während beim SCNT maximal 15,6% Nachkommen aus transferierten Blastozysten entstanden (Yamazaki et al., 2001). Auch die bei der Spezies Maus zur Verfügung stehenden embryonalen Stammzellen können als Kernspender verwendet werden (ESCNT) (Wakayama et al., 1999). In diesem Falle ist die Effizienz des Kerntransfers ebenfalls meist höher als beim SCNT (17%) (Eggan et al., 2001). Allgemein wird demnach angenommen, dass Zellkerne von weniger differenzierten Zellen leichter durch Transfer in eine Eizelle zu reprogrammieren sind.

III. Genetisch modifizierte (transgene) Zellen als Kernspender

Die genetische Modifikation von Spenderzellen embryonalen oder somatischen Ursprungs vor dem Kerntransfer ist in dem Zeitraum möglich, in dem die Zellen kultiviert werden. Das Klonen von Säugetieren durch Kerntransfer mit genetisch modifizierten Spenderzellkernen eröffnet die Möglichkeit, das Genom von Nutztieren gezielt zu verändern (Schnieke et al., 1997). Solche Tiere könnten zum Beispiel zur Gewinnung therapeutischer Proteine aus dem Blutserum (Kuroiwa et al., 2002) oder aus der Milchdrüse dienen. Durch Expressionsuntersuchungen der Embryonen vor dem Einsetzen in das Empfängertier könnten dabei Nachkommen vorselektiert werden, die solche Proteine tatsächlich produzieren (Chen et al., 2002). Die Tiere müssten dabei in jedem Falle frei sein von Transmissiblen Spongiformen Enzephalopathien (TSE) (Cyranski, 2003). Auch als Organspender für die Xenotransplantation (Phelps et al., 2003) oder als Tiermodelle in der TSE-Forschung könnten transgene Nachkommen aus NT genutzt werden.

IV. Chromatin-Transfer (CT)

Als Fortentwicklung der Idee des SCNT wird beim Chromatin-Transfer die somatische Zelle so vorbehandelt, dass nur noch kondensiertes Chromatin übertragen wird. Bei ersten Experimenten wurde eine embryonale Entwicklung mit ähnlicher Effizienz wie beim SCNT erreicht, wobei sich während einer einmonatigen Beobachtungszeit beim CT eine verbesserte Überlebensrate der Klonkälber abzeichnete (Sullivan et al., 2004).

1.4 Interspezies-Kerntransfer

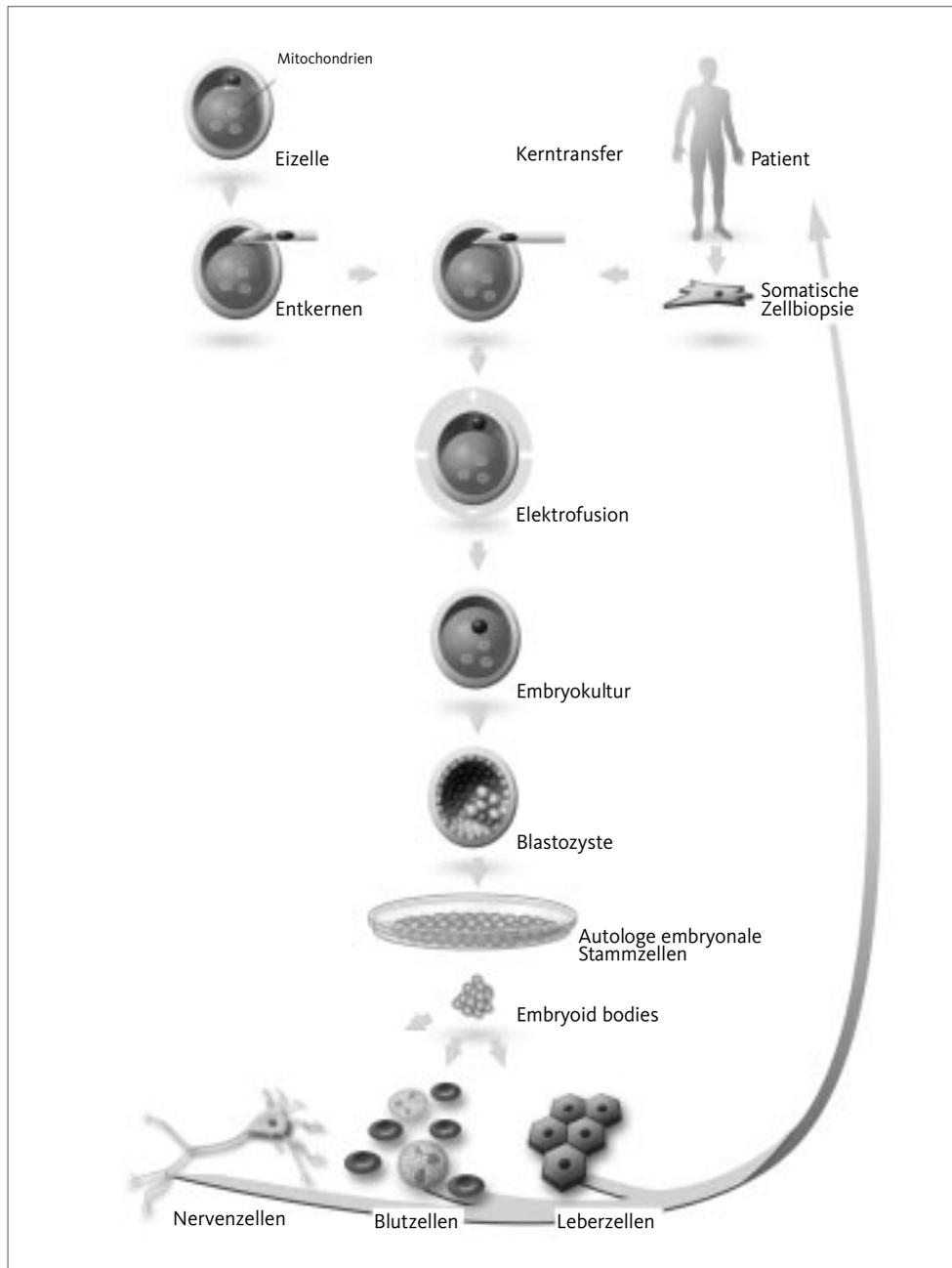
Das Einsetzen von Spenderzellkernen einer Spezies in Eizellen einer anderen Spezies bezeichnet man als Interspezies-Kerntransfer. Man geht davon aus, dass derartige Experimente bei nah verwandten Spezies Erfolg versprechend sein können, da in diesen Fällen der Zellkern mit den Faktoren des Zytoplasmas der Eizelle wahrscheinlich noch kompatibel ist. Bei entfernten Verwandten wie Maus und Rind sind nach Interspezies-Kerntransfer bereits im 2-bis-8-Zell-Stadium aberrante Expressionsmuster embryonaler Gene festgestellt worden (Arat et al., 2003). Schafeizellen unterstützten

embryonales Wachstum von SCNT-Embryonen mit Rinder- und Schweinezellkernen nur in den ersten drei embryonalen Zellzyklen (Hamilton et al., 2003). Beim Transfer von Zellkernen fetaler Kaninchenfibroblasten in enukleierte Rinderoozyten teilten sich die entstandenen Embryonen zwar zunächst, erreichten aber nicht das Blastozystenstadium (Shi et al., 2003b). Bei Interspezies-Kerntransfer von Ziegenzellkernen in Schweineeizellen entwickelten sich die Embryonen bis ins Morulastadium (Park et al., 2003). Bovine Oozyten waren sogar in der Lage, nach SCNT mit Hautzellkernen von Schafen, Schweinen, Affen, Ratten und Ziegen (Dominko et al., 1999; Park et al., 2003) eine embryonale Entwicklung bis zum Blastozystenstadium zu unterstützen. Interspezies-Kerntransfer im Sinne des reproduktiven Klonens kann zur Erhaltung bedrohter Tierarten eingesetzt werden (Kitiyanant et al., 2001; Lanza et al., 2000a). Besondere Aufmerksamkeit gilt jedoch stets Interspezies-Kerntransferexperimenten mit Beteiligung menschlicher Zellen, wie es im Zusammenhang mit dem therapeutischen Klonen versucht wird.

1.5 Therapeutisches Klonen

Beim therapeutischen Klonen handelt es sich um die Anwendung der Kerntransfer-Technik mit dem Ziel, eine Linie autologer, pluripotenter embryonaler Stammzellen (ES-Zellen) zu erhalten, die man für therapeutische Zwecke nutzen kann. Grundlage dieser Strategie ist die Reprogrammierung von Kernen individueller Spenderzellen durch Kerntransfer in enukleierte Eizellen. Aus den sich entwickelnden Kerntransferembryonen sollen autologe, pluripotente Zelllinien etabliert und in den Zelltyp differenziert werden, der für die Therapie der betroffenen Patienten benötigt wird (Wolf, 2000) (Abbildung 2, S.18). Der *proof of principle*, dass differenzierte Zellkerne aus somatischen Zellen durch Kerntransfer so reprogrammiert werden können, dass aus den entstehenden Embryonen Stammzelllinien gewonnen werden können, wurde von Munsie et al. im Jahre 2000 an Mäusen erbracht (Munsie et al., 2000). Mittlerweile scheint dieses Prinzip auch für die Spezies Mensch bestätigt (Hwang et al., 2004).

Embryonale Stammzellen sind neben morphologischen und physiologischen Besonderheiten vor allem dadurch gekennzeichnet, dass man sie dauerhaft in undifferenziertem Zustand kultivieren und vermehren kann. Zu einem beliebigen Zeitpunkt können embryonale Stammzellen dann *in vitro* differenziert oder *in vivo* transplantiert werden, wo sie zu allen Zelltypen, einschließlich Keimbahnzellen, differenzieren können (Labosky et al., 1994; Wobus et al., 1997). Embryonale Stammzellen sind seit den 80er-Jahren für die Spezies Maus bekannt (Evans and Kaufman, 1981; Martin, 1981). Ähnliche pluripotente Zelllinien wurden seitdem auch für Kaninchen, Schwein, Rind, Schaf, Huhn und Medaka-Fische generiert (Prelle et al., 2002). Die Eigenschaft der *In-vivo*-Pluripotenz, inklusive der Besiedlung der Keimbahn, wurde bislang jedoch nur bei der Spezies Maus bewiesen. Im Jahr

Abbildung 2 Therapeutisches Klonen

1998 gelang erstmals die Etablierung von menschlichen ES-Zelllinien aus Blastozysten von IvF-Embryonen (Thomson et al., 1998) und aus primordialen Keimzellen von abortierten Feten (Shamblott et al., 1998). Aus ethischen Gründen ist es nicht möglich zu prüfen, ob humane ES-Zellen nach Injektion in einen Embryo dessen Keimbahn besiedeln können. Gleichwohl hat sich die Bezeichnung embryonale Stammzellen in Wissenschaft und Öffentlichkeit durchgesetzt.

Die Möglichkeit, aus der inneren Zellmasse von menschlichen Blastozysten eine Zelllinie mit den Charakteristika embryonaler Stammzellen zu entwickeln, eröffnet in Kombination mit dem SCNT die Idee des therapeutischen Klonens:

- » Einem Patienten wird zu therapeutischen Zwecken Zellmaterial entnommen, z. B. in Form einer Hautbiopsie. Zellkerne aus den Patientenzellen werden in jeweils eine entkernte menschliche Eizelle transferiert. Der resultierende Embryo wird bis zum Stadium der Blastozyste kultiviert.
- » Aus der inneren Zellmasse des Embryos wird eine ES-Zelllinie etabliert, welche denselben Genotyp trägt wie der Patient.
- » Die embryonalen Stammzellen werden in eine Zellpopulation differenziert, aus der die für den Patienten benötigten Zellen isoliert werden können. Im Zuge einer Zellersatztherapie werden ihm die differenzierten Zellen schließlich transplantiert.

1.6 Hemiklonen

Die Vermehrung genetisch gleicher, paternaler oder maternaler Keimzellen bezeichnet man als Hemiklonen. So kann durch chemische oder physikalische Stimulation die Furchung einer unbefruchteten Eizelle bis zum Blastozystenstadium induziert werden (Parthenogenese). Die embryonale Entwicklung einer parthenogenetisch aktivierten Eizelle bis zur Geburt eines lebenden Nachkommen wurde bei Säugetieren noch nicht beobachtet: Parthenoten entwickeln sich maximal bis ins Blastozystenstadium (Escriba et al., 2002). Man erklärt dies mit dem *Imprinting*-Phänomen, welches für die weitere embryonale Entwicklung die Präsenz von maternalem wie paternalem Erbgut erfordert (Escriba et al., 2002). Embryonen aus parthenogenetisch aktivierten Eizellen kann man demnach nicht als totipotent bezeichnen.

Hemiklonen ist zwar nicht zwingend mit NT verbunden und zielt auch nicht auf den Erhalt genetisch gleicher Nachkommen ab, eröffnet aber auf dem Niveau der Grundlagenforschung Möglichkeiten, Einzelaspekte der Kerntransfertechnik wie z. B. die Aktivierung von Eizellen zu erforschen (Escriba et al., 2002). Interessant in diesem Zusammenhang ist die Tatsache, dass humane parthenogenetisch aktivierte Eizellen im 1-Zell-Stadium im Gegensatz zu unbefruchteten Eizellen gut kryokonserviert werden können (Azambuja et al., 1996). Zudem ist es auf diese Weise

möglich, Stammzellen aus unbefruchteten Eizellen von nicht menschlichen Primaten zu gewinnen (Cibelli et al., 2002).

Cibelli et al. (2002) behandelten Makaken-Eizellen in der Metaphase der zweiten Reifeteilung derart, dass die Reifeteilung vorzeitig unterbrochen und die Mitose angeregt wurde. Einige dieser Parthenoten entwickelten sich bis zum Blastozystenstadium. Es gelang, aus Zellen der inneren Zellmasse eine ES-Zelllinie zu etablieren. Die erhaltenen Zellen differenzierten nach Transplantation in immunsupprimierte Mäuse zu Teratomen und *in vitro* zu dopaminergen Neuronen. Die Autoren beendeten ihren Artikel mit der Einschätzung, eine alternative Perspektive zum therapeutischen Klonen insofern eröffnet zu haben, als die Etablierung von Stammzellen aus unbefruchteten Eizellen beim Menschen möglich erscheint. Im Kommentar dieses Artikels wird eine Konsequenz dieses hypothetischen Ansatzes verdeutlicht: Es erscheint unmöglich, auf diese Weise Stammzellen für männliche Patienten zu erhalten (Holden, 2002).

Ganz außerhalb des Themenbereichs Klonen durch Kerntransfer, dafür eng verbunden mit dem Hemiklonen, seien weitere Beobachtungen von Hubner et al. (2003) erwähnt. Über die Entwicklung von murinen embryonalen Stammzellen zu eizellähnlichen Zellen hinaus beobachteten die Forscher in der Folge die Bildung von blastozystenähnlichen Strukturen. Sie gingen von parthenogenetischer Aktivierung der eizellähnlichen Zellen aus. Je nach Genotyp der Stammzelle konnten die eizellähnlichen Zellen bzw. blastozystenähnlichen Strukturen auch Y-Chromosomen enthalten (Hubner et al., 2003).

2. Meilensteine der Kerntransfertechnik

Die Technik des Kerntransfers nimmt ihren Ursprung in den Ideen des deutschen Entwicklungsbiologen Hans Spemann (1869-1941). Dieser führte mit partieller, temporärer Abschnürung von Salamanderembryonen Pionierexperimente auf dem Gebiet des Kerntransfers durch (Spemann, 1938). Briggs und King gelang 1952 der erste Transfer von Kernen embryonaler Spenderzellen in enukleierte Eizellen von Fröschen der Spezies *Rana pipiens*: Die resultierenden Embryonen entwickelten sich zu Kaulquappen. Bei Säugetieren wurden Kerntransferexperimente erstmals 1983 mit dem Austausch von Vorkernen zwischen befruchteten Eizellen von Mäusen durchgeführt (McGrath and Solter, 1983). Willadsen (1986) gelang wenig später das Klonen des ersten Schafes, durch die Fusion einer Blastomere aus einem 8-Zell-Embryo mit der enukleierten Eizelle (Willadsen, 1986). In der Folge wurde das Klonen durch Kerntransfer von embryonalen Kernspenderzellen für weitere Säugetierspezies etabliert: Maus (Tsunoda et al., 1987), Rind (Prather et al., 1987),

Kaninchen (Stice and Robl, 1988), Schwein (Prather et al., 1989), Ziege (Yong and Yuqiang, 1998), Rhesusaffe (Meng et al., 1997) und Ratte (Roh et al., 2003). Die Geburt des Schafes *Dolly* (Wilmut et al., 1997) belegte erstmals, dass das Klonen von Säugetieren durch Kerntransfer auch mit somatischen Zellen als Kernspender möglich ist. In der Folgezeit wurde diese Technik bei folgenden Säugetieren angewandt: Maus (Wakayama et al., 1998), Rind (Cibelli et al., 1998), Ziege (Baguisi et al., 1999), Schwein (Polejaeva et al., 2000), Kaninchen (Chesne et al., 2002), Katze (Shin et al., 2002), Muli (Woods et al., 2003), Pferd (Galli et al., 2003) und Ratte (Zhou et al., 2003). Die Möglichkeit, durch Kerntransfer mit transfizierten Spenderzellen landwirtschaftliche Nutztiere genetisch zu modifizieren, wurde erstmals im Jahr 1997 mit der Geburt des Schafes *Polly* realisiert (Schnieke et al., 1997). Im Februar 2004 wurde schließlich die Etablierung der ersten Stammzelllinie aus menschlichen Kerntransferblastozysten bekannt gegeben (Hwang et al., 2004).

3. Gesetzliche Regelung des Klonens durch Zellkerntransfer in Deutschland

Da durch Kerntransfer eine totipotente Zelle, also eine Zelle, aus der sich ein Gesamtorganismus bilden könnte, entsteht und diese als Embryo gilt, fallen alle Verfahren des Kerntransfers beim Menschen unter das Embryonenschutzgesetz (Taupitz, 2002). Nach geltendem ESchG sind sämtliche Verfahren des Klonens von Menschen, gleichgültig, mit welcher Zielrichtung diese durchgeführt werden, verboten. Therapeutisches und reproduktives Klonen unterscheiden sich hier lediglich in der Zielrichtung der Handlung zum Zeitpunkt des Kerntransfers. Klonen ist definiert als Handlung, die künstlich bewirkt, dass „ein menschlicher Embryo mit der gleichen Erbinformation wie ein anderer Embryo, ein Fetus, ein Mensch oder ein Verstorbener entsteht“ (ESchG §6). Allerdings ist umstritten, ob die Embryonen wegen des im Zytoplasma der Eizelle enthaltenen mitochondrialen genetischen Materials – beim Menschen 0,01-0,02% des Gesamtgenoms – wirklich als genetisch gleich zu bezeichnen sind (Taupitz, 2002). Als übergeordnetes Rechtsgut verpflichtet der Art. 1 des Grundgesetzes der Bundesrepublik Deutschland zum Schutz der Menschenwürde.

Das Klonen von Tieren ist in Deutschland prinzipiell zulässig und unterliegt nur bedingt rechtlichen Einschränkungen. So berücksichtigt das Tierschutzgesetz (TierSchG) in der Fassung vom Mai 1998 das Klonen von Tieren nicht ausdrücklich. Es ist jedoch durch die Regelungen des §7 TierSchG erfasst, da dieser Paragraph Bestimmungen zu Tierversuchen enthält und das Klonen von Tieren überwiegend experimenteller Natur ist. Für den Fall, dass Kerntransfer bei Nutztieren in der Zukunft Praxisreife erlangt und durch solche Verfahren quälerische Veränderungen an Tieren

provoziert werden würden, könnte § 11b des TierSchG (Verbot von Qualzucht) zum Tragen kommen. Aus verfassungsrechtlicher Sicht ist das Klonen von Tieren durch die Grundrechte der Forschenden und Berufstätigen legitimiert: Art. 5 Abs. 3 GG (Forschungsfreiheit) und Art. 12 Abs. 1 GG (Berufsfreiheit).

4. Effizienz des Klonens durch Kerntransfer

4.1 Effizienz und Sicherheit des reproduktiven Klonens bei Säugetieren

Das Klonen von Säugetieren durch Kerntransfer somatischer Zellen in entkernte Eizellen wird weltweit mit sehr unterschiedlichen Ergebnissen durchgeführt. Eine Übersicht der bis dato veröffentlichten Experimente und deren Effizienz bietet Tabelle 1 (modifiziert nach Shi et al., 2003b). Ein häufig angeführter Parameter beschreibt das Verhältnis „Morulae oder Blastozysten pro fusionierte oder injizierte Eizellen“, der auch als „Blastozystenrate“ bezeichnet wird. Für die verschiedenen Tierarten liegen die Blastozystenraten bei 5-69% (Rind), 13-21% (Schaf), 42-71% (Ziege), 1-37% (Schwein), 30-59% (Maus), 57-61% (Kaninchen), 94% (Muli) und 3% (Pferd). Die Effizienz des Klonens kann man weiterhin über den Parameter „Nachkommen pro transferierte Embryonen definieren“, der den Erhalt lebend geborener Tiere aus transferierten Embryonen beschreibt. Der Wert variiert stark, abhängig von untersuchter Tierart und untersuchender Arbeitsgruppe. Fasst man zusammen, aus wie vielen Embryonen, die durch Kerntransfer generiert wurden, ein geklontes Tier geboren wird, so liegt der Prozentsatz durchschnittlich bei 0-4% (Wilmot et al., 2002), außer bei der Spezies Rind, wo im Schnitt 10% erreicht werden. Teilweise werden Kerntransfer-Experimente auch nur bis zum Blastozystenstadium durchgeführt und davon Aussagen über die Effizienz des durchgeführten Protokolls abgeleitet. Die so gewonnenen Daten lassen jedoch keine Schlüsse auf das gesamte Entwicklungspotenzial des Kerntransferembryos zu: Eine Korrelation zwischen der „Blastozystenrate“ und dem Parameter „Nachkommen per transferierte Embryonen“ konnte in einer groß angelegten Studie mit insgesamt 167 lebend geborenen Kälbern aus SCNT nämlich nicht festgestellt werden (deLegge et al., 2004). Diese Bewertung der Effizienz des Klonens durch Kerntransfer mit somatischen Zellen ist über die Zahlen hinaus in mancherlei Hinsicht zu ergänzen:

- I. Einerseits muss das Schicksal der transferierten Embryonen beleuchtet werden, die sich nicht zu lebensfähigen Klonen entwickelt haben.
- II. Andererseits muss hinterfragt werden, wie gesund die lebensfähigen Tiere bzw. wie „normal“ die gesunden Klone wirklich sind.

III. Zudem ist es von Interesse zu wissen, wie ähnlich der Phänotyp der erhaltenen Klone dem des Zellkernspenders ist bzw. wie ähnlich die Klone einander sind.

I. Die Entwicklung der meisten Kerntransferembryonen sistiert kurz nach dem Transfer in das Empfängertier. In einem solchen Falle kommt es zur Resorption der Frucht. Besonders problematisch ist dieser Sachverhalt bei multiparen Tieren wie Schweinen und Mäusen. Beim Schwein müssen sich mindestens vier Embryonen einnisten und entwickeln, um eine Trächtigkeit ohne zusätzliche Hormonbehandlung einzuleiten und aufrechtzuerhalten (Polejaeva et al., 2000). Werden die Embryonenempfänger dennoch trächtig, so können im Verlauf der Trächtigkeit Komplikationen auftreten, die sich in ihrer Ausprägung und Häufigkeit tierartsspezifisch unterscheiden.

Bei Kerntransferembryonen von Rindern, Schafen und Mäusen stellt die physiologische Ausbildung der Plazenta oft ein Problem dar. Bei höheren Säugetieren (*Placentalia sive Eutheria*) besteht die Plazenta aus einer *Pars maternalis* und einer *Pars fetalis*, die an ineinander greifenden Strukturen (Chorionzotten) verbunden sind. Die äußere Form der Plazenta wird weitgehend von der Verteilung und Anordnung der Chorionzotten bestimmt. Bei Menschen, Primaten, Meerschweinchen, Kaninchen, Ratten und Mäusen bilden die Chorionzotten eine scheibenförmige Plazenta (*Placenta discoidalis*), während bei Wiederkäuern runde Zottenfelder (Plazentome oder Cotyledonen) flächenhaft verstreut sind (*Placenta cotyledonaria*). Des Weiteren unterscheiden sich die feto-maternalen Verbindungsstellen, die Chorionzotten, in der Ausbildung ihrer Schichten. Während bei Menschen, Primaten und Meerschweinchen der fetale Blutkreislauf nur durch ein so genanntes Chorionepithel vom maternalen Blutraum getrennt ist (*Placenta haemomono-chorialis*), trennen bei Mäusen und Ratten insgesamt drei Chorionepithel den fetalen Blutkreislauf vom maternalen Blutraum (*Placenta haemotrichorialis*). Bei Wiederkäuern liegen zusätzlich zum Chorionepithel noch das Uterusepithel und das Endothel der mütterlichen Blutgefäße zwischen fetaler Kapillare und mütterlichem Blut (Schnorr, 1989).

Bei SCNT von Rind und Schaf sind vor allem im ersten und zweiten Trächtigkeitsmonat hohe Verluste von Embryonen zu verzeichnen. Als Hauptursache gilt die ungenügende Entwicklung der *Placenta cotyledonaria* (De Sousa et al., 2001; Hill et al., 2000). Im dritten Trimester der Trächtigkeit kann es bei Rindern zu Missbildungen der Plazenta, wie Hydroallantois, Ödemen, Verminderung der Anzahl der Plazentome und Vergrößerung der Plazentome bei bis zu 50% der Empfängertiere kommen (Heyman et al., 2002; Hill et al., 1999). Die veränderte Plazenta kann Bestandteil des *Large-offspring-Syndroms* (LOS) sein, welches bei Rindern und Schafen auftritt (Heyman et al., 2002). Bei diesem Syndrom kommt es nicht nur zu einem erhöhten Geburtsgewicht von Feten bzw. Neugeborenen; es kann auch mit erhöhter

Abortrate, verzögerter Einleitung der Geburt, Schweregeburt, Totgeburt sowie pathologischen Veränderungen von Feten und erhöhter Morbidität oder Mortalität von Neugeborenen einhergehen (Lazzari et al., 2002; Walker et al., 1996; Young et al., 1998). Das LOS bei Wiederkäuern wird allgemein mit suboptimalen Bedingungen bei der *In-vitro*-Kultur von Oozyten und Embryonen in Verbindung gebracht, kann also nicht nur bei Nachkommen aus Kerntransfer, sondern z. B. auch bei Embryonen aus der *In-vitro*-Fertilisation auftreten. Zu den typischen pathologischen Veränderungen bei Kälbern aus SCNT zählen außerdem die Linksherzinsuffizienz, die mit Blutstau (Kongestion) in den Lungen und Erweiterung (Dilatation) der rechten Herzkammer einhergehen kann, sowie Missbildungen von Leber, Nieren und Gliedmaßen (Rhind et al., 2003 b). Die erhöhten bzw. erniedrigten Geburtsgewichte korrelieren bei Kerntransferkälbern direkt mit deren Lebensfähigkeit (Yang et al., 2004).

Untersuchungen an lebensschwachen Schafen aus Kerntransfer beschreiben ein erhöhtes Geburtsgewicht, Vorfälle von Baucheingeweiden bei angeborenen Bauchwanddefekten (Eventration bzw. Eviszeration), verkürzte Beugesehnen, Kiefer- und Tarsalgelenksdeformationen sowie Missbildungen von Niere (Zysten oder dilatierte Nierenbecken), Lunge, Herz und Leber (Rhind et al., 2003 a). Die Art der Läsionen weist auf Probleme wie Bluthochdruck im Lungenkreislauf, also pulmonale Hypertension und Rückstau in das Nierenbecken während der embryonalen Entwicklung hin (Rhind et al., 2003 a).

Bei der Maus stellt, anders als bei Rind und Schaf, die *In-vitro*-Kultur von Embryonen *per se* keinen Grund für das Auftreten des LOS dar (Suemizu et al., 2003). Bei SCNT-Experimenten mit der Spezies Maus wurden lediglich Vergrößerungen der Plazenta beschrieben (Ogura et al., 2000 a; Wakayama and Yanagimachi, 1999). Beim Transfer von Kernen embryonaler Stammzellen wurde zusätzlich zur Plazentomegalie von pathologischen Veränderungen der funktionellen Plazentaschichten (Suemizu et al., 2003) und übergroßen Feten (Eggen et al., 2001) berichtet. Der größte Teil der geklonten Mausembryonen jedoch wird kurz nach der Einnistung in den Uterus resorbiert (Ogura et al., 2000 a; Wakayama et al., 1998; Wakayama and Yanagimachi, 1999).

NT-Embryonen von Schwein, Ziege, Kaninchen (Challah-Jacques et al., 2003) und Katze werden ebenfalls vornehmlich in der frühen Trächtigkeit resorbiert. Bei etablierter Trächtigkeit kann es bei Ziege und Schwein zur verzögerten Einleitung der Geburt kommen (Wilmut et al., 2002). Beim Schwein wird teilweise von vermindertem Geburtsgewicht der Klonferkel berichtet (Polejaeva et al., 2000).

Laut Studien, die mehr als fünf lebend geborene Nachkommen aus SCNT beschrieben, überlebten je nach Tierart 15-85% (Schaf), 50-100% (Rind), 57-100% (Schwein), 74-100% (Maus), 77-100% (Ziege) bzw. 66% (Kaninchen) der Neugeborenen die erste Lebenswoche. Unterschiedliche Ausprägungen neonataler Sterblichkeit sind in Tabelle 2 (S. 60 ff.) in der Spalte „Komplikationen bis sieben Tage nach der Geburt“ näher beschrieben.

II. Jungtiere aus SCNT, deren prä- und neonatale Entwicklung klinisch unauffällig verläuft, wachsen in der Regel zu klinisch gesunden, fertilen Vertretern ihrer Art heran. In den in Tabelle 2 (S. 60 ff.) erfassten Versuchen sind beispielsweise, mit Ausnahme der Mäuse (74%), 100% der angepaarten Rinder, Schafe, Ratten und Kaninchen aus SCNT fruchtbar. Dies wird als Anzeichen für eine gute Gesamtverfassung der Tiere interpretiert.

Es wird allerdings auch von Spätfolgen des Kerntransfers berichtet (Tabelle 2, S. 60 ff.). So beschrieb eine französische Arbeitsgruppe einen Fall letaler Immundefizienz bei einem sieben Wochen alten geklonten Kalb (Renard et al., 1999). Auch bei Ziegen aus SCNT wurden Beeinträchtigungen des Immunsystems festgestellt (Keefer et al., 2001), was sich in verstärkter Anfälligkeit für Lungenentzündungen manifestierte. Dieser Eindruck wurde darüber hinaus bei Mäusen aus SCNT bestätigt: Die Antikörperproduktion bei 20 männlichen vier bis fünf Monate alten Klonen war im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant reduziert (Ogonuki et al., 2002).

Studien von Tamashiro et al. (2000) berichteten von Fettleibigkeit, bedingt durch veränderten Metabolismus bei Mäusen aus SCNT ab einem Alter von acht bis zehn Wochen. Züchtete man mit besagten Mäusen weiter, so erhielt man Nachkommen mit normalem Körpergewicht (Tamashiro et al., 2002). Andere Forscher konnten diese Symptomatik bei Mäusen aus SCNT nicht entdecken (Ogonuki et al., 2002; Ogura et al., 2002), dafür aber eine signifikante Verkürzung des Lebenszeit (50% der Mäuse aus SCNT starben mit 550 Tagen im Vergleich zu 1028 Tagen bei der Kontrollgruppe). Dies war wahrscheinlich auf die pathologischen Veränderungen, welche bei der Autopsie diagnostiziert wurden, zurückzuführen: Pneumonien, Lebernekrosen, Leukämie und Lungentumoren (Ogonuki et al., 2002; Ogura et al., 2002).

Bei einem 17 Tage alten Schwein aus SCNT diagnostizierten Lai et al. 2002 eine Dilatation der rechten Herzkammer mit Verdickung des Herzseptums (Lai et al., 2002; Lee et al., 2003). Drei Schweine aus SCNT verendeten im Alter von fünf bis sechs Monaten an akutem Herzversagen (Lee et al., 2003). Dieses Phänomen wurde als *adult clone sudden death syndrome* bezeichnet (Pearson, 2004). Bei einer Gruppe männlicher Nachkommen aus SCNT, die innerhalb der ersten zwei Lebensmonate plötzlich verendeten, wurden entzündliche Erkrankungen von Hirn und Hirnhäuten (Cerebromeningitiden) sowie Blutstau in Leber und Lungen diagnostiziert (Park et al., 2004). Studien an transgenen Schweinen aus SCNT berichten ebenfalls von erhöhter Mortalität bei adulten Tieren (Carter et al., 2002).

Bei Untersuchungen an 21 klinisch unauffälligen Kälbern aus SCNT wurden in der ersten bis siebten Lebenswoche eine erhöhte Körpertemperatur und erhöhte Leptinwerte im Plasma bei gleichzeitig erniedrigtem Schilddrüsenhormonspiegel (T4) im Blut diagnostiziert (Chavatte-Palmer et al., 2002). Zusätzlich war die Igf2-Konzentration im Plasma kurz nach der Geburt in den Nachkommen aus SCNT erhöht und zwei Wochen nach der Geburt im Vergleich zur Kontrollgruppe erniedrigt. Auch bei

Schafen aus SCNT wurden in den ersten vier Lebenswochen Störungen des endokrinen Systems mit erhöhter ACTH-Konzentration im Plasma (Adrenocorticotropes Hormon) beschrieben (Edwards et al., 2002).

In der Debatte über verdeckte Langzeitfolgen bei Tieren aus SCNT wurde insbesondere das Beispiel des Schafs *Dolly* oft angeführt (Wilmut et al., 1997). Das erste Schaf aus SCNT lebte fünf Jahre und sieben Monate (Schafe haben eine Lebenserwartung von 10 bis 15 Jahren) (Rhind et al., 2004). Bereits 1999 wurden bei *Dolly* Epimutationen in Form verkürzter Telomere diagnostiziert (Shiels et al., 1999). Nach fast fünf Jahren mit gutem Allgemeinbefinden, leichtem Übergewicht und drei erfolgreichen Trächtigkeiten, aus denen sechs gesunde Lämmer hervorgingen, entwickelte das Mutterschaf eine Arthritis in Hüft- und Kniegelenk. Arthritiden kommen bei Schafen dieser Altersgruppe durchaus häufig vor. Ungewöhnlich war in diesem Falle die Lokalisation der Erkrankung, die normalerweise die Ellenbogen betrifft (Adam, 2002). Ein Jahr später wurde *Dolly* wegen viral induzierter Lungentumoren (Ovine Pulmonale Adenomatose, verursacht durch das *Jaagsiekte-sheep-Retrovirus*) euthanasiert (Rhind et al., 2004). Als verdeckte Spätfolge von SCNT werden derzeit lediglich die Arthritis und die verkürzte Telomerlänge interpretiert (Rhind et al., 2004).

Insgesamt steht also fest, dass durch SCNT Phänotypen generiert werden können, die klinisch zwar unauffällig, subklinisch jedoch pathologisch sind. Während manche Forscher aufgrund der beschriebenen Folgen des Kerntransfers die Frage stellten: „*Are there any normal cloned mammals?*“ (Wilmut, 2002), gab es bereits Vermutungen von anderen Wissenschaftlern: „*There may be no normal clones.*“ (Vogel, 2003b). Zur Beantwortung dieser Frage ist man darauf angewiesen, die Tiere genau und über einen längeren Zeitraum zu untersuchen. Bei der Bewertung von Langzeitfolgen des Kerntransfers sollte man bedenken, dass für eine Langzeitstudie an einer Population geklonter Rinder im Durchschnitt 15 Jahre lang klinische Daten und Ergebnisse molekularbiologischer Untersuchungen gesammelt werden müssten (Giles and Knight, 2003). Abgesehen von Aufwand und Kosten solcher Studien, wurde das erste Rind erst 1998 geklont, d. h. bis dato können nur begrenzte Erkenntnisse über Langzeitfolgen vorliegen.

III. Kommt es nach reproduktivem Klonen zur Geburt mehrerer lebensfähiger Nachkommen, so hat man seit der Etablierung des NT mit embryonalen Spenderzellkernen festgestellt, dass der Phänotyp der Klone untereinander wie auch im Vergleich zum Zellkernspender variieren kann. Bei morphometrischen Untersuchungen an SCNT-Rinderembryonen an den Tagen 50, 100 und 150 der Trächtigkeit variierten insbesondere die Charakteristika der embryonalen Membranen und die Ausbildung der Plazentae ebenso wie die fetalen Organengewichte der Kerntransferembryonen stärker untereinander als bei Feten aus künstlicher Besamung (Lee et al., 2004). Bei

Rinderklonen aus NT mit embryonalen Kernspendern variierten nicht nur die Geburtsgewichte stärker als bei Kontrollgruppen (verwandte Kälber aus natürlicher Anpaarung, künstlicher Besamung oder Embryotransfer) (Wilson et al., 1995); auch Körpergröße, Gewichtszunahme und Musterung unterschieden sich (Renard, 1998). Schweine aus NT variierten in der Dicke ihres Rückenspeckes fast wie Vollgeschwister (Lamberson, 1994). Schweine aus SCNT legten ähnlich individuelle Verhaltensmuster an den Tag wie verwandte Kontrollschweine (Archer et al., 2003). Die aus SCNT hervorgegangene Katze *Copycat* unterschied sich in Farbe und Körperbau von der Katze, welche die Zellkerne gespendet hatte (Evers, 2003; Shin et al., 2002).

4.2 Gründe für die niedrige Effizienz des Klonens (Epigenetik)

Als Ursache für die niedrige Effizienz des Kerntransfers mit somatischen Zellen wird eine unvollständige oder abnorme epigenetische Reprogrammierung der Spenderzellkerne nach dem Transfer in die Eizelle vermutet. Man spricht in diesem Zusammenhang von „Epimutationen“ bzw. „Epimutanten“ (Reik et al., 2003). Beim Phänomen epigenetische Programmierung (oder Genregulation) handelt es sich um ein Zusammenwirken von Mechanismen, die über die Anordnung der DNA im Zellkern (Chromatinstruktur) festlegen, welche Gene wann und wo aktiv werden (Shi et al., 2003b). Nur so können Organismen funktionieren, welche sich wie Säugetiere aus einer Vielfalt von Zellen zusammensetzen, die in Morphologie und Funktion unterschiedlich, genetisch jedoch gleich sind (Ausnahmen bilden Lymphozyten und Keimzellen). Bei SCNT wird somit die festgelegte, differenzierte Genexpression im Spenderzellkern, welche mit epigenetischen Modifikationen des Chromatins verbunden ist, revidiert. Um die Totipotenz des SCNT-Embryos herzustellen, müssen epigenetische Programme neu definiert werden. Folgende Mechanismen spielen im Zuge der epigenetischen Reprogrammierung des Spenderzellkerns nach dem Einsetzen in die Eizelle eine Rolle (Reik et al., 2003; Shi et al., 2003b):

- I. DNA-Methylierung
- II. Modifizierung der Histone
- III. *Imprinting* von Genen
- IV. Inaktivierung des X-Chromosoms
- V. Remodellierung des Chromatins
- VI. Erhalt der Telomere
- VII. Vererbung von epigenetischen Strukturen

Globale Methylierungsmuster, Chromatinstruktur und Expression von imprintierten und/oder embryonalen Genen in Embryonen, Feten, Neonaten und adulten Nachkommen aus SCNT stehen derzeit im Mittelpunkt des Forscherinteresses. Diese

Fragestellungen gehen beim reproduktiven Klonen insofern über Trächtigkeitsraten und pathologische Befunde bei Tieren aus SCNT hinaus, als man sich um das Verständnis jener molekularen Mechanismen bemüht, die den Erfolgen oder Misserfolgen des Kerntransfers zugrunde liegen.

I. Durch DNA-Methylierung, d.h. die Bindung von Methylresten an Cytosine, im Bereich von Cytosin-Guanin-Dinucleotiden, wird die Expression von Genen beeinflusst. Bei den meisten Genen bewirkt eine Methylierung der DNA die Unterdrückung der Expression (Repression). Die Methylierung von DNA wird durch Enzyme, so genannte DNA-Methyltransferasen (Dnmt), bewirkt. Die Dnmt1 ist für den Erhalt von Methylierungsmustern zuständig, während die Dnmt3a und -3b eine *De-novo*-Methylierung bewirken können. Durch Inhibitoren der DNA-Methyltransferasen, wie 5-aza-2'-Deoxycytidine (5-aza-dC), kann die DNA-Methylierung unterbunden werden. Die Methylierung des Genoms während der Reifung der Keimzellen und später nach der Befruchtung in der frühen embryonalen Entwicklung ist ein dynamischer Prozess, dem folgendes Muster zugrunde liegt: globale Demethylierung des Genoms in primordialen Keimzellen mit darauf folgender globaler Remethylierung in den gereiften Keimzellen. Nach der Befruchtung folgt eine zweite Demethylierungswelle, einhergehend mit der Aktivierung des embryonalen Genoms, mit darauf folgender Remethylierungswelle ab dem Blastozystenstadium. Diese Vorgänge variieren nicht nur tierartspezifisch in Zeitablauf und Ausprägung, sondern darüber hinaus bei jedem einzelnen Embryo in maternalen und paternalen Allelen.

Nach dem Transfer differenzierter, stark methylierter Zellkerne aus somatischen Zellen in Eizellen kann es zu aberranter De- und Remethylierung im frühen Embryo mit weit reichenden Folgen für dessen Entwicklung kommen (Reik et al., 2003; Shi et al., 2003b).

II. Die Bindung von Acetylresten (Acetylierung) an die in den Nukleosomen vorkommenden Histonproteine H3 und H4 wird in der Regel mit der Expression von Genen in Verbindung gebracht. Das Gleiche gilt für die Inhibition von Histondeacetylasen durch Behandlung mit Trichostatin A (TSA). Deacetylierung und Methylierung der Histone wiederum werden generell mit der Repression von Genen assoziiert. Auch hier gibt es genspezifische Ausnahmen und Besonderheiten (Reik et al., 2003; Shi et al., 2003b).

III. Das *imprinting* betrifft im Säugetiergenom 0,1-1 % aller Gene. Es handelt sich um einen epigenetischen Effekt, der während der Ontogenese eines Organismus die Genexpression von der Herkunft der Gene abhängig macht. Bei imprintierten Genen werden in verschiedenen Abschnitten der Entwicklung entweder das von der Mutter oder das vom Vater vererbte Allel inaktiviert, sodass es zu einer mono-allelischen

Genexpression kommt (Surani et al., 1984). Die Genregulation wird dabei vor allem über die Methylierung von Cytosinresten auf Cytosin-Guanin-Dinucleotiden (CpG-Inseln) gesteuert, die sich in sog. *differentially methylated regions* (DMRs) konzentrieren. *Imprints*, also die Methylierungsmuster der CpG-Inseln, werden während der Reifung der Keimzellen (Gametogenese) im Genom von Ei- und Samenzellen gesetzt. Man geht davon aus, dass die *imprints* während der frühen embryonalen Entwicklung trotz der globalen De- und Remethylierungswelle im embryonalen Genom erhalten bleiben. Imprintierte Gene spielen in den Bereichen Reproduktion, Plazentation, Homöostase des Energiestoffwechsels, Laktation und Verhalten eine Rolle (Shi et al., 2003b). Ob imprintierte Gene in geklonten Embryonen korrekt exprimiert werden, ist Gegenstand vieler Untersuchungen (Hiendleder et al., 2004a; Inoue et al., 2002; Young et al., 2001).

IV. Die Inaktivierung eines X-Chromosoms erfolgt bei weiblichen Säugetieren, um eine Überproduktion X-Chromosom-spezifischer Genprodukte zu vermeiden. Das inaktivierte X-Chromosom (Xi) ist, im Gegensatz zum aktiven X-Chromosom (Xa), durch epigenetische Modifikationen der DNA wie DNA-Methylierung und H3/H4-Hypoacetylierung gekennzeichnet. Das RNA-Transkript *Xist* (*x inactive specific transcript*), wird nur vom inaktiven X-Chromosom exprimiert und erhält dessen Repression (Shi et al., 2003b).

V. Chromatin ist die räumliche Struktur, welche die genomische DNA in Verbindung mit Histon- und Nicht-Histon-Proteinen bildet. Diese Struktur verändert sich in jeder Zelle in Abhängigkeit von ihrem Zyklusstadium und ihrer Differenzierung. Befindet sich die Zelle z.B. in der G1-Phase ihres Zyklus, so liegt das Chromatin dekondensiert vor. Befindet sich die Zelle in der M-Phase, so liegt das Chromatin kondensiert, in der Form von Chromosomen vor. Ein Grundelement des Chromatins stellt das Nukleosom dar: Es besteht aus einem DNA-Strang (167 bp), der um Histonproteine (H2A, H2B, H3, H4) gewunden ist. Zwischen den Nukleosomen befinden sich kurze, „linke“ DNA-Stränge und H1-Histon-Proteine. Die Organisation von DNA in Nukleosomen unterdrückt die Expression von Genen, da die Bindungsstellen für die Transkription blockiert sind. Nukleosomen können sich jedoch dynamisch verändern. Deshalb stellt die Remodellierung von Chromatin im Sinne einer Dekondensation die Voraussetzung für Transkriptionsaktivität auf einem Gen dar (Shi et al., 2003b). Eine bereits diskutierte Voraussetzung für die Entstehung eines euploiden Kerntransferembryos beim SCNT besteht darin, dass Spenderzellkerne mit dekondensiertem Chromatin in Eizellen mit hoher MPF-Aktivität transferiert werden, wo dann nach dem *nuclear envelope breakdown* eine *premature chromatin condensation* stattfinden kann. Die Remodellierung von Chromatin in der weiteren Entwicklung des Kerntransferembryos beinhaltet aber noch zahlreiche andere Aspekte.

VI. Telomere, repetitive DNA-Sequenzen am Ende von Chromosomen der Eukaryonten, schützen die Chromosomenenden vor Degradation, erleichtern den Abschluss der DNA-Replikation und unterstützen die Positionierung der Chromosomen in den Zellkernen. Bei somatischen Zellen geht die Verkürzung der Telomere mit Verlust der Zellteilungskapazität (Seneszenz) einher (Shi et al., 2003b). Derzeit stehen nicht genügend Daten zur Verfügung, um eine direkte Korrelation zwischen verkürzter Telomerlänge und frühzeitiger Alterung oder verlängerten Telomeren und Anfälligkeit für Tumoren in Tieren aus SCNT zu belegen (Sedivy, 2003).

VII. Einige der beschriebenen epigenetischen Modifikationen der DNA sind vererbbar (Shi et al., 2003b). Dies führt zu der Fragestellung, ob auch epigenetische Mutationen, welche bei Tieren aus SCNT nachweislich häufig vorkommen, weitervererbt werden (Transgenerationen-Effekte). Der Ausschluss solcher Transgenerationen-Effekte wäre eine Voraussetzung für die Nutzung von Tieren aus SCNT als Zuchttiere.

4.2.1 DNA-Methylierung und Modifikation der Histone

I. DNA-Methylierung

Bei geklonten Rinderembryonen stellten Dean et al. (2001) eine frühzeitige Hypermethylierung von Zellkernen der Trophoblasten fest. Auch Kang et al. (2002) beschrieben eine aberrante Methylierung von Satellit-I-Sequenzen im Trophektoderm von Rinderembryonen aus SCNT. Da sich aus dem Trophektoderm der embryonale Anteil des Mutterkuchens bildet, wird dieses Phänomen mit Missbildungen der Plazenta bei Wiederkäuern aus Kerntransfer in Zusammenhang gebracht. Auch pathologische Befunde bei Neonaten wie Rechtsherzdilatation und Blutstau in den Lungen können als Folge von embryonalem Bluthochdruck interpretiert werden, dem ein gestörter Blutaustausch durch Missbildung der Plazenta zugrunde liegt (Rhind et al., 2003b). Des Weiteren gibt es Untersuchungen, die Anhaltspunkte für eine immunologische Abstoßung des SCNT-Fetus durch das Muttertier an der Plazenta liefern (Hill et al., 2002). Bei den meisten Spezies bedingt die anfängliche Repression des MHC-Klasse-I-Antigens in den Trophoblasten eine erfolgreiche Trächtigkeit. Bei geklonten Rinderembryonen im ersten Trimester wurde eine aberrante Expression des MHC-Klasse-I-Antigens im Trophoblasten und Lymphozyteninfiltration im maternalen Teil der Plazenta nachgewiesen. Eine solche Immunreaktion beeinflusst den Verlauf der Plazentaentwicklung wahrscheinlich negativ (Edwards et al., 2003) und könnte deshalb einen Grund für die Resorption zahlreicher SCNT-Feten im ersten Drittel der Trächtigkeit darstellen (Hill et al., 2002).

Insgesamt bestätigte sich im Zuge weiterer Untersuchungen bei Rindern der erhöhte Methylierungsgrad von Blastozysten bzw. Morulae aus SCNT im Vergleich zur Kontrollgruppe (Bourchis et al., 2001; Kang et al., 2001; Kang et al., 2002). Der

epigenetische Status der Blastomeren erinnerte also mehr an den der Spenderzellkerne als an den embryonaler Zellen (Reik et al., 2003). Übereinstimmend damit wiesen Untersuchungen an 60 Tage alten, übergroßen Rinderfeten aus Kerntransfer auf eine signifikante Hypermethylierung fetalen Lebergewebes hin (Hiendleder et al., 2004b). Damit wurde ein direkter Zusammenhang der Symptome des LOS mit aberranter, globaler Methylierung fetalen Gewebes hergestellt (Hiendleder et al., 2004c). Die Ergebnisse stehen allerdings im Gegensatz zu Daten, die eine signifikante Hypomethylierung fetalen Hautgewebes in geklonten, normalgewichtigen Rinderembryonen beschreiben (Cezar et al., 2003). Als Begründung für diese Diskrepanz werden derzeit Unterschiede im Aufbau der Experimente wie unterschiedliches Testgewebe, unterschiedlicher Spenderzelltyp und das unterschiedliche Alter der untersuchten Feten diskutiert. Zudem liegen alle beschriebenen DNA-Methylierungslevel im Experiment von Cezar et al. (10 – 40%) außerhalb des Referenzbereichs für DNA-Methylierung bei Wirbeltieren (3 – 5%), der von anderen Autoren angeführt wird (Hiendleder et al., 2004c).

Da die Methylierung genomischer DNA durch DNA-Methyltransferasen bewirkt wird, wurde die Transkriptionsaktivität bei Genen, die diese Enzyme kodieren, bei Rinderembryonen aus Kerntransfer untersucht. Die Aktivität des Dnmt3a-Gens war bei Kerntransferembryonen im Blastozystenstadium im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant erhöht (Wrenzycki et al., 2004). Möglicherweise ist dies ein Hinweis auf eine verstärkte *De-novo*-Methylierung, die im Zusammenhang mit Hypermethylierung embryonalen Gewebes aus SCNT stehen könnte (Dean et al., 2001; Reik et al., 2003). Eine abnorme Regulation der Dnmt1 wurde auch bei Mausembryonen aus SCNT beobachtet (Chung et al., 2003).

In geklonten Mausblastozysten wurde zudem eine aberrante Methylierung von DMRs-imprintierten Genen festgestellt (Mann et al., 2003). Auch in Haut und Plazenta von neugeborenen Mäusen aus Kerntransfer wurden aberrante Methylierungsmuster nachgewiesen, wobei die Mäuse augenscheinlich normal, die Plazentae jedoch pathologisch vergrößert waren (Ohgane et al., 2001). Auch nach dem Transfer muriner ES-Zellen wurden aberrante Genmethylierungsmuster in Neonaten nachgewiesen (Humpherys et al., 2001).

II. Modifikation der Histone

Bei Untersuchungen zur Acetylierung der Histone von Spenderzellkernen verglich man Fibroblasten mit Kumuluszellen. Beide Zelltypen werden besonders häufig beim SCNT eingesetzt, wobei sich aus Kerntransferembryonen mit Kumuluszellen in vielen Fällen mehr Blastozysten und in der Folge mehr lebensfähige Nachkommen entwickeln (Forsberg et al., 2002; Tian et al., 2003). Unabhängig von der Dauer der Zellkultur befanden sich in beiden Gruppen 80% der Zellen in der G0/G1-Phase ihres Zellzyklus, also dem bevorzugten Zustand für Kerntransfer (Enright et al.,

2003 a). Die Acetylierungsmuster in Kumuluszellen und Fibroblasten unterschieden sich jedoch: In der G0/G1-Phase waren der Grad der Acetylierung der Histone H3 und H4 sowie die absolute Menge an Histone H3 bei Kumuluszellen höher als bei Fibroblasten (Enright et al., 2003 a). Dies stellt eine mögliche Begründung für die bessere Reprogrammierbarkeit der Kumuluszellen im Vergleich zu Fibroblasten dar. Mit Verlängerung der Zellkultur (über 15 Passagen) kommt es dann sowohl bei Fibroblasten als auch bei Kumuluszellen zu einer verstärkten Acetylierung der Histone, also zum Abbau epigenetischer Modifikationen (Enright et al., 2003 b). Dies könnte ein Grund für die verbesserte SCNT-Effizienz sein, die bei Verwendung von Spenderzellen aus verlängerter Zellkultur (15 Passagen) beobachtet wurde (Arat et al., 2001).

Bei bovinen Kerntransferembryonen korreliert die Hypermethylierung der Histone H3-Lysine (H3-K9) mit der Hypermethylierung der DNA und darüber hinaus mit dem Entwicklungspotenzial des Embryos bis zum Blastozystenstadium (Santos et al., 2003).

Die Hypothese, dass somatische Zellen leichter zu reprogrammieren wären, wenn deren epigenetische Modifikationen wie DNA-Methylierung oder Histone-Acetylierung vor dem Transfer in die Empfängereizellen ausgelöscht sind, ist von einigen Gruppen untersucht worden (Enright et al., 2003 b; Jones et al., 2001; Shi et al., 2003 a): Bei Rind und Maus führte die Hypomethylierung von Spenderzellkernen vor dem Transfer in die Eizelle mittels 5-aza-dC zu einer Verschlechterung der embryonalen Entwicklungsrate bis zur Blastozyste (Enright et al., 2003 b; Jones et al., 2001; Zhou et al., 2002). Die Inkubation der Spenderzellen mit dem Deacetylase-Inhibitor TSA hingegen kann beim Rind zu einer signifikanten Verbesserung der Blastozystenrate führen (Enright et al., 2003 b). Schon bei geringfügig abweichenden Konzentrationen oder Inkubationszeiten jedoch hat TSA keinen Effekt mehr (Shi et al., 2003 a) oder beeinflusst die Blastozystenentwicklung negativ (Enright et al., 2003 b; Zhou et al., 2002). Ein positiver Einfluss von Stoffen, die epigenetische Modifikationen der Spenderzellkerne vor dem Kerntransfer verringern, auf die Effizienz der Blastozystenentwicklung konnte somit nur für TSA gezeigt werden. Ein höherer Acetylierungsgrad der Histone scheint, in engen Grenzen, einen positiven Einfluss auf die Reprogrammierbarkeit von Spenderzellkernen zu haben.

4.2.2 Genexpressionsmuster

Unabhängig davon, wie Gene epigenetisch modifiziert sind, z. B. ob imprintiert oder nicht imprintiert, ist für die Entwicklung des Kerntransferembryos am Ende die Expression der korrekten Gene zur richtigen Zeit entscheidend. Betrachtet man das Gesamtgenom zu einem beliebigen Zeitpunkt, so stellt man fest, dass im Verhältnis wenige Gene aktiv und viele Gene inaktiv sind (Reik and Dean, 2003). Ein solches Genexpressionsprofil ist je nach Entwicklungsstadium unterschiedlich, d. h. in somatischen Zellen adulter Organismen sind andere Gene aktiv als in embryonalen Zellen. Zwar ist durch SCNT das Prinzip der Reprogrammierbarkeit eines soma-

tischen Zellkerns bewiesen, in welchem Maße jedoch bei den einzelnen Nachkommen aus SCNT die der Entwicklung entsprechenden Gene exprimiert werden, ist unterschiedlich. Bei der Expression imprintierter Gene ist, abgesehen von der Menge an Transkript, entscheidend, ob das richtige Allel aktiv ist.

Bei Mäusefeten aus SCNT (Tag 4) wurde z. B. eine aberrante Expression von Oct4 und neun weiteren, Oct4-verwandten Genen nachgewiesen (Boiani et al., 2002; Bortvin et al., 2003). Oct4 wird als „Pluripotenzgen“ bezeichnet (Reik and Dean, 2003). Es ist nur in Embryonen und primordialen Keimzellen aktiv. So verwundert es nicht, dass in einer Kontrollgruppe, bestehend aus Mäusefeten aus ESCNT, Oct4 und verwandte Gene korrekt exprimiert wurden (Bortvin et al., 2003). Bei weiteren Untersuchungen an Mausblastozysten aus SCNT (Mann et al., 2003) wurde für zwei imprintierte Gene, die bereits in der frühen embryonalen Entwicklung aktiv sein sollten, bei der Hälfte der NT-Embryonen gar keine Transkription festgestellt. Bei morphologischer Einteilung der Blastozysten in die Klassen „exzellent“, „gut“ oder „schlecht“, waren die Ausfälle meist Embryonen von guter bzw. schlechter Qualität zuzuordnen. Bei der Untersuchung der Allelspezifität der Expression von fünf imprintierten Genen zeigte sich, dass die meisten NT-Blastozysten nicht in der Lage waren, ein oder mehrere imprintierte Gene gleichzeitig allelspezifisch korrekt zu exprimieren (Mann et al., 2003). Die Autoren weisen darauf hin, dass der Anteil korrekt exprimierender NT-Embryonen ähnlich niedrig liegt wie der Anteil lebensfähiger Nachkommen aus SCNT mit Kumuluszellen, und schließen, dass die Dysregulation von Genen in Embryonen aus SCNT bereits in der frühen embryonalen Entwicklung beginnt (Mann et al., 2003). Dies könnte die Resorption zahlreicher geklonter Mäuseembryonen zu Beginn der Trächtigkeit erklären.

Bei murinen Feten (Tag 9,5) aus Kerntransfer mit Sertolizellen waren bei ausgewählten imprintierten Genen sowohl in fetalem Gewebe als auch in den dazugehörigen Plazentae die korrekten Allele aktiv (paternal exprimiert: *Igf2*, *PegMest*; maternal exprimiert: *Igf2r*, *H19*, *Meg1/Grb10*, *Meg3/Gil2*, *p57^{kip2}*) (Inoue et al., 2002; Ogura et al., 2002).

Humpherys et al. (2002) verglichen neugeborene Mäuse aus natürlicher Anpaarung mit Nachkommen aus Kerntransfer mit embryonalen murinen Stammzellen bzw. mit Kumuluszellen. Über die Quantifizierung von RNA wurden bei den Mäusen aus Kerntransfer sowohl im Lebergewebe als auch in den dazugehörigen Plazentae aberrante Genexpressionsprofile festgestellt. Makroskopisch fielen alle Nachkommen aus SCNT durch fetalen Riesenwuchs und übergroße Plazentae auf. Im direkten Vergleich der Transkriptionsaktivität von 10000 Genen waren in den NT-Plazentae 4% der Gene aberrant exprimiert. Unterschiede zwischen Genexpressionsmustern bei Plazentae von Kumuluszell-Nachkommen im Vergleich zu ES-Zell-Nachkommen waren dabei vorhanden. Die aberrante Transkriptionsaktivität in den Lebern geklonter Mäuse betraf eine geringere Anzahl von Genen und andere Gene. Auch bei

imprintierten Genen war bei beiden Gruppen aus Kerntransfer eine aberrante Expression in Plazenta (u. a. *Nnat*; *Meg1/Grb10*; *Peg1/MEST*; *Dlk1*; *Slc22a1*; *U2af1-rs1*; *Sgce*) und Leber (u. a. *H19*; *Cdkn1c (p57)*; *Igf2*; *Sgce*) festzustellen. Im Gegensatz zu früheren Untersuchungen (Inoue et al., 2002) ziehen die Autoren den Schluss, dass Mäuse aus ESCNT eine ähnlich schwer wiegende Dysregulation imprintierter Gene aufweisen wie Mäuse aus SCNT mit somatischen Zellen (Humpherys et al., 2002). Die Tatsache, dass bei lebend geborenen Mäusen aus ESCNT die aberrante Expression einiger imprintierter Gene nicht direkt mit erhöhtem Geburtsgewicht und erhöhtem Plazentagewicht korrelierte, weist lediglich darauf hin, dass wahrscheinlich nicht genügend Gene untersucht wurden (Humpherys et al., 2001).

Bei Wiederkäuern wurde das Auftreten des LOS in Zusammenhang mit aberranter Expression imprintierter Gene wie dem *Insulin-like-growth-factor-II-Rezeptor-Gen (Igf2r)* gebracht (Young et al., 2001). Young et al. hatten Schafoozyten, die *in vivo* befruchtet worden waren, fünf Tage *in vitro* kultiviert, bevor man sie in Empfängertiere einsetzte (2001). Mit diesem Protokoll entwickelten 25% der Schafembryonen das Hauptmerkmal des LOS: ein unphysiologisch hohes Gewicht. Die *Igf2r*-Expression war bei diesen übergroßen Feten im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant verändert. Das Methylierungsmuster des *Igf2r*-Gens und die Expression von *Igf2r* unterschieden sich signifikant von der Kontrollgruppe. Abweichend von diesen Ergebnissen wurde in übergroßen Rinderfeten aus IVF ein korrektes Methylierungsmuster des imprintierten *Igf2r*-Gens festgestellt (Hiendleder et al., 2004 a). Der LOS-Phänotyp korrelierte aber auch hier mit veränderter *Igf2r*-Plasmakonzentration. Unter Umständen handelt es sich hier um tierartspezifische Unterschiede.

4.2.3 Inaktivierung des X-Chromosoms

Bei weiblichen Embryonen aus natürlicher Befruchtung sind vor der Implantation bzw. Nidation beide X-Chromosomen aktiv. Im Laufe der Differenzierung wird dann ein Chromosom ausgewählt und inaktiviert. Beim SCNT erhält der weibliche Embryo jedoch ein aktives (Xa)- und ein inaktiviertes (Xi)-Chromosom. Diese epigenetische Markierung der Gonosomen scheint bei Kerntransferembryonen der Spezies Maus keine Probleme zu bereiten (Eggan et al., 2000). In weiblichen, nicht lebensfähigen Kälbern aus Kerntransfer hingegen wurde bei neun von zehn untersuchten Genen der X-Chromosomen eine aberrante Expression entdeckt (Xue et al., 2002). Auch das *Xist*-Gen war bei diesen Tieren hypomethyliert (Xue et al., 2002). Weitere Untersuchungen an weiblichen Rinderembryonen aus SCNT zeigten bereits im Blastozystenstadium eine signifikant erhöhte Transkription der mRNA des *Xist*-Gens (Wrenzycki et al., 2002; Wrenzycki et al., 2004). Beim weiblichen Rind lassen diese Ergebnisse also auf eine aberrante Inaktivierung der X-Chromosom-spezifischen Gene nach SCNT schließen.

4.2.4 Erhalt der Telomere

Als das Schaf *Dolly* (Wilmut et al., 1997) mit fünf Jahren eine Arthritis in Hüft- und Kniegelenk entwickelte, rief der Pionier der Kerntransfertechnik Ian Wilmut zu genaueren Gesundheitskontrollen bei Nachkommen aus SCNT auf (Adam, 2002). Vermutet wurde ein Zusammenhang zwischen der Arthritis und dem fortgeschrittenen genetischen Alter von *Dolly*, postuliert aufgrund einer festgestellten Verkürzung der Telomere (Shiels et al., 1999). Die Länge der Telomere nimmt bei somatischen Zellen im Alter ab und resultiert im Verlust der Zellteilungskapazität (Harley et al., 1990). Werden somatische Zellen als Spender beim Kerntransfer verwendet, so ergibt sich die Frage, ob die verkürzten Telomerlängen des Spenderzellkerns nach dem Einsetzen in die Oozyte beibehalten oder im Zuge der Reprogrammierung des Zellkerns wieder verlängert werden. Eine Verlängerung der Telomere während der embryonalen Entwicklung des SCNT-Embryos wurde von einigen Autoren als Verjüngung des Spenderzellkerns interpretiert.

Verlängerte oder dem Alter der Klone entsprechende Telomerlängen wurden mittlerweile in mehreren Studien bei Rindern und Mäusen aus SCNT beschrieben (Betts et al., 2001; Lanza et al., 2000 b; Tian et al., 2000; Wakayama et al., 2000). Abgesehen von *Dolly* (Rhind et al., 2004; Shiels et al., 1999) wurden noch bei weiteren Schafen aus SCNT verkürzte Telomerlängen gefunden (Alexander et al., 2004). Interessanterweise waren die Telomerlängen der Klon-Nachzucht aus natürlicher Anpaarung nicht verändert (Alexander et al., 2004). Es wird vermutet, dass die Telomerlängen bei Tieren aus Kerntransfer tierartspezifischen und spenderzelltypspezifischen Variationen unterliegen und darüber hinaus von der Kulturdauer der Spenderzellen beeinflusst werden (Rhind et al., 2004; Sedivy, 2003; Xue and Yang, 2003). Unabhängig von Alter und Rasse der Kernspendertiere scheint der Donorzelltyp den größten Einfluss auf die Länge der Telomere zu besitzen (Miyashita et al., 2002). Verkürzte Telomere wurden bei Rindern aus Kerntransfer mit Euterepithelzellen und Eileiterepithelzellen gefunden, normale Telomerlänge bei Rindern aus Kerntransfer mit Muskelzellen und verlängerte Telomere bei Rindern aus Kerntransfer mit embryonalen Zellen (Miyashita et al., 2002). Die Autoren ziehen daraus den Schluss, dass der Vorgang des Kerntransfers im Allgemeinen eine Verlängerung der Telomere bewirkt, die absolute Telomerlänge der Klone aber vom Spenderzelltyp abhängt. Die verkürzten Telomere bei *Dolly* wären damit keine Ausnahme, sondern ein Tribut an ihre Kernspenderzelle – eine Euterepithelzelle.

4.2.5 Remodellierung des Chromatins

Eine veränderte räumliche Anordnung von genomischer DNA in Kerntransferembryonen wurde bei Primaten erstmals von Simerly et al. (2003) publiziert. Die Forscher beschrieben die fehlerhafte Positionierung von Chromosomen während der Mitose bei NT-Primatenembryonen, die durch das Fehlen von Spindelproteinen erklärt werden konnte (Simerly et al., 2003). Bei Kerntransferembryonen der Spezies

Maus wurde eine abnorme Spindelmorphogenese beobachtet (Nguyen et al., 2004). Es gab bereits Überlegungen, durch *reverse order cloning* das vorzeitige Entfernen von Spindelproteinen durch die E nukleation der Eizelle zu unterbinden (Simerly et al., 2003) und so die Effizienz des NT bei Maus und Primaten zu erhöhen (Wakayama et al., 2003). Bei der Maus konnte die Effizienz des Kerntransfers auf diese Weise allerdings nicht erhöht werden (Wakayama et al., 2003).

4.2.6 Vererbung epigenetischer Modifikationen

Studien von Tamashiro et al. (2000) berichten von Fettleibigkeit, bedingt durch veränderten Metabolismus, bei Mäusen aus SCNT ab einem Alter von acht bis zehn Wochen. Züchtete man mit besagten Mäusen weiter, so erhielt man Nachkommen mit normalem Körpergewicht (Tamashiro et al., 2002). Die Tatsache, dass diese Störung des Metabolismus weder von der maternalen noch von der paternalen Seite weitervererbt wurde, weist auf epigenetische Modifikationen als Ursache hin, die noch während der Gametogenese in den Klonen eliminiert oder korrigiert wurden (Tamashiro et al., 2002). Auch Alexander et al. (2004) stellten fest, dass verkürzte Telomerlängen bei Schafen aus Kerntransfer nicht an die nächste Generation weitervererbt wurden. Diese Beobachtungen illustrieren die allgemein geäußerte Ansicht, dass Nachkommen von geklonten Tieren in der Regel normal sind (The Lancet Editorial, 2003). Im Gegensatz zu manchen epigenetischen Modifikationen der DNA vererben sich epigenetische Mutationen anscheinend nicht. Dies ist sehr wichtig für eine eventuelle Zuchttauglichkeit von Tieren aus SCNT, insbesondere dann, wenn die Auswirkungen der Epimutationen nicht zu einem klinischen Bild beim Träger führen. Mehrfach wurden bereits bei klinisch unauffälligen Nachkommen aus SCNT epigenetische Mutationen und deren Folgen beschrieben, so z.B. veränderte Expressionsmuster einiger imprintierter Gene in Niere, Herz und Leber von neugeborenen Mäusen aus ESCNT. Da sich die Tiere trotz der beschriebenen Dysregulationen der Gene unauffällig entwickelten, vermuten die Autoren auch bei augenscheinlich gesunden Nachkommen aus Kerntransfer Fälle von abnormer Genexpression (Humpherys et al., 2001).

4.2.7 Variationen im Phänotyp der Klone

Die Tatsache, dass Nachkommen aus somatischem Nukleustransfer nicht zwangsläufig den gleichen Phänotyp wie der Zellkernspender entwickeln, erklärt sich wahrscheinlich mit dem Epigenotyp der Klone, welcher nachweislich stark variiert. Die Ausbildung der Scheckung bei Rindern z.B. hängt von der Auswanderung der Melanozyten im frühen Embryo ab. Dieser Vorgang beinhaltet lange Wirkungsketten von Genprodukten. Sind die beteiligten Gene unterschiedlich modifiziert, kommt es zu Variationen im Endergebnis, in diesem Falle also der Fellfarbe (Wolf, 2000). Zusätzlich spielen hier noch Umwelteffekte im Uterus der verschiedenen Empfän-

gartiere und Chimärismus der mitochondrialen DNA eine Rolle. Bei Mäusen mit der Fellfarbe Agouti, die gleichzeitig Träger von so genannten *intra-cisternal A particles* (IAPs) sind, gibt es ein einfaches Modell, wie der Epigenotyp den Phänotyp beeinflusst. Wird die Kontrollregion A^{IAP} des Agouti-Gens methyliert, so entwickeln die Mäuse eine charakteristische dunkelbraune Haut und braunmeliertes Fell; ist die Region unmethyliert, so entwickeln die Mäuse ein cremefarbenes Fell. Ist das Methylierungsmuster nicht in allen Körperzellen einheitlich, so kommt es zur Bildung von Mosaiken mit gesprenkeltem Fell (Jaenisch and Bird, 2003).

Um die Effizienz des Kerntransfers mit somatischen Zellen zu erhöhen und damit auch realistische Perspektiven für das therapeutische Klonen zu eröffnen, gilt es, epigenetische Modifikationen des Erbguts grundlegend zu erforschen. Praktisch beinhaltet dies unter anderem, Effekte von Variationen der zahlreichen Schritte des Klonens durch Kerntransfer experimentell auszuloten. Es geht also in einem gewissen Rahmen um technische Probleme. Viele Experimente bewegen sich dabei auf dem Niveau der Embryonenforschung, d.h. sie gehen nicht über embryonale Stadien hinaus. So wurden beispielsweise 80 Tage alte Rinderembryonen aus SCNT untersucht, bei denen Granulosazellen (Braunvieh) in Empfängereizellen mit unterschiedlichem genetischen Hintergrund (Braunvieh, Fleckvieh, Zwergzebu) transferiert wurden. Die Effizienz des SCNT hing mit den unterschiedlichen Nukleus-Zytoplasma-Kombinationen zusammen (Hiendleder et al., 2004d). Weitere aktuelle Ansätze, die Effizienz des Kerntransfers zu erhöhen, sind in Tabelle 3 (S. 69) zusammengefasst.

4.3 Effizienz und Sicherheit des therapeutischen Klonens bei Säugetieren

Ein essenzieller Schritt des therapeutischen Klonens beim Menschen wurde bereits unternommen: die Generierung einer ES-Zelllinie aus menschlichen Kerntransferblastozysten (Hwang et al., 2004). Das komplette Verfahren des therapeutischen Klonens hingegen, vom Kerntransfer über die Etablierung von ES-Zellen bis hin zur Zellersatztherapie, ist bisher lediglich vereinzelt im Tierversuch durchgeführt worden (Barberi et al., 2003; Rideout, III et al., 2002). Die theoretische Aufgliederung des Vorgangs „therapeutisches Klonen“ in drei Schritte erlaubt die Auswertung einer breiten Datenbasis aus Experimenten an Mensch und Tier, die Rückschlüsse auf Effizienz und Sicherheit des gesamten Prozedere zulassen.

I. Geringe Effizienz bei der Gewinnung von Stammzellen aus Kerntransferembryonen

Der Effizienz des ersten Schrittes, der Generierung eines Embryos im Blastozystenstadium aus SCNT, könnte man sich über den Prozentsatz Morulae oder Blastozysten per fusionierte oder injizierte Eizelle nähern, der beim reproduktiven

Klonen je nach Tierart und Arbeitsgruppe zwischen 1 und 69% variiert (Tabelle 1, S. 58 f.). Beim Menschen konnten 17% Blastozysten aus fusionierten Embryonen gewonnen werden (Hwang et al., 2004). Diese Prozentsätze sind allerdings kritisch zu hinterfragen. Zum einen fließt bei manchen Veröffentlichungen das Embryonalstadium Morula in die Bewertung ein. Zellen aus der inneren Zellmasse des Embryos, die zur Etablierung einer ES-Zelllinie benötigt werden, können aber erst im späteren Blastozystenstadium entnommen werden, sodass die Prozentsätze nach unten korrigiert werden müssten. Zum anderen spiegeln die Zahlen lediglich das Ergebnis einer morphologischen Untersuchung der Embryonen wider. Auch Embryonen, deren Zellkerne unvollständig oder abnorm reprogrammiert wurden oder die Zellen mit aneuploiden Chromosomensätzen enthalten (Simerly et al., 2003), sind in diesen Zahlen enthalten. So gibt der für das reproduktive Klonen gültige Durchschnitt von 0 – 4% (mit Ausnahme von 10% beim Rind) geborene Tiere aus Zygoten, die durch Kerntransfer generiert wurden, eine realistischere Vorstellung über den Anteil korrekt reprogrammierter Blastozysten aus SCNT.

Der zweite Schritt, die Etablierung einer ES-Zelllinie, beginnt mit der Isolierung der inneren Zellmasse aus Embryonen im Blastozystenstadium. Die isolierten Zellklumpen können auf *Feeder*-Zellen kultiviert werden, bis sich primäre Kolonien mit der Morphologie von ES-Zellen bilden. Diese werden selektiert, dissoziiert und bilden die Grundlage für die Kultur von embryonalen Stammzellen (Hogan et al., 1994). Bei der Etablierung humaner ES-Zelllinien aus IVF-Blastozysten benötigten Thomson et al. (1998) 36 gespendete menschliche Embryonen, von denen sich 20 bis ins Blastozystenstadium entwickelten. Davon wurden 14 zur Gewinnung von ICM-Zellen selektiert. Insgesamt konnten fünf ES-Zelllinien von fünf verschiedenen Embryonen etabliert werden, sodass für eine ES-Zelllinie durchschnittlich 7,5 Embryonen benötigt wurden. Die Effizienz des zweiten Schrittes birgt große artspezifische Unterschiede. Es ist wesentlich zu begreifen, dass für Spezies mit hoher SCNT-Effizienz wie z. B. das Rind [4 – 87% Nachkommen per transferierte Blastozysten (Tabelle 1, S. 58 f.)] bis dato Schwierigkeiten bei der Etablierung von ES-Zelllinien bestehen (Prelle et al., 2002), während die Spezies Maus eine mit etablierten Methoden zur Generierung von ES-Zelllinien niedrige Effizienz beim SCNT aufweist [0,5 – 15,6% Nachkommen per transferierte Embryonen im Blastozystenstadium (Tabelle 1, S. 58 f.)]. Infolgedessen sind Tierversuche, die therapeutisches Klonen umfassend untersuchen wollen, mit speziesspezifischen Problemen behaftet.

Beim Versuch, murine Stammzellen aus Kerntransferembryonen zu generieren, benötigten Wakayama et al. (2001) für die Etablierung einer pluripotenten Stammzelllinie mit normalem Karyotyp aus SCNT-Embryonen im Durchschnitt 54 Eizellen, wobei die Effizienz je nach Mäusestamm und Gewebe, aus dem die Spenderzelle stammte, variierte. Bei der Spezies Rind benötigten Cibelli et al. (1998) für die Generierung einer ES-ähnlichen Zelllinie aus SCNT-Embryonen 15 Eizellen.

Vor der Etablierung der ersten humanen Stammzelllinie aus Kerntransferblastozysten (Hwang et al., 2004) wurde aufgrund der vorliegenden Daten die Menge der benötigten Eizellen pro Linie auf ca. 100 bis 280 geschätzt (Colman and Kind, 2000; Mombaerts, 2003). Die Schätzungen der Wissenschaftler stellten sich als realistisch heraus: Für die Etablierung einer humanen Stammzelllinie aus menschlichen Kerntransferblastozysten wurden aus 242 gespendeten Eizellen 176 Eizellen in der Metaphase II ihrer zweiten Reifeteilung für SCNT ausgewählt (Hwang et al., 2004). Die Übertragbarkeit von Erkenntnissen über SCNT bei Tieren auf entsprechende Experimente beim Menschen wird hier deutlich.

Es wurde bereits diskutiert, ob sich Kerntransferembryonen zu einem geringeren Prozentsatz *in vivo* zu lebenden Nachkommen entwickeln als *in vitro* zu ES-Zelllinien (Rideout, III et al., 2002). Dies würde eine höhere Effizienz für die Entwicklung von ES-Zellen aus SCNT als für die Entwicklung lebender Nachkommen aus SCNT bedeuten. Als Begründung ist vorstellbar, dass aus der inneren Zellmasse der Blastozysten nur die Zellen *in vitro* expandieren, welche erfolgreich reprogrammiert wurden. Die Autoren führen als Begründung ihrer Hypothese folgendes Beispiel an: Während 2,2% ES-Zellen aus murinen SCNT-Embryonen von Schwanzspitzenzellen gewonnen werden konnten (Wakayama et al., 2001), entwickelten sich lediglich 0,5% lebende Nachkommen aus murinen SCNT-Embryonen von Schwanzspitzenzellen (Wakayama and Yanagimachi, 1999). Es ist allerdings zu bedenken, dass die Effizienz des reproduktiven Klonens mittels somatischen Kerntransfers bei der Maus zwischen 0% und 15,6% variiert und dass sich bei anderen Veröffentlichungen auch Gegenbeispiele zu dieser Hypothese finden: so z. B. bei Ogura et al. (2000), der 2,7% lebende Mäuse aus SCNT-Embryonen von transgenen Schwanzspitzenzellen erhielt (Ogura et al., 2000b). Zudem liegt die Entwicklungseffizienz für die Spezies Mensch mit 0,6% ES-Zelllinien aus SCNT-Embryonen (Hwang et al., 2004) eindeutig in der Spanne der Entwicklungseffizienzen beim reproduktiven Klonen (0-4%, außer beim Rind 10%).

II. Konsequenz der niedrigen Effizienz: hoher Bedarf an Eizellen

Die beschriebenen niedrigen Entwicklungsraten von Kerntransferembryonen bei Mensch und Tier implizieren für das therapeutische Klonen einen großen Bedarf an Eizellen pro Patient, der therapiert werden soll. Menschliche Eizellen werden bei der *In-vitro*-Fertilisation durch hormonelle Stimulation der Eierstöcke gewonnen. Pro Hormonbehandlung werden durchschnittlich 10, im Einzelfall über 30 Eizellen gewonnen. Jene, die den richtigen Reifegrad aufweisen, können befruchtet werden. Überzählige, unbefruchtete Eizellen überleben bei Kryokonservierung nur zu einem geringen Prozentsatz einen Einfrier-Auftau-Zyklus. Alternativen zu gespendeten menschlichen Eizellen stellen tierische Eizellen (Interspezieskerntransfer) oder menschliche Eizellen aus Stammzellen dar.

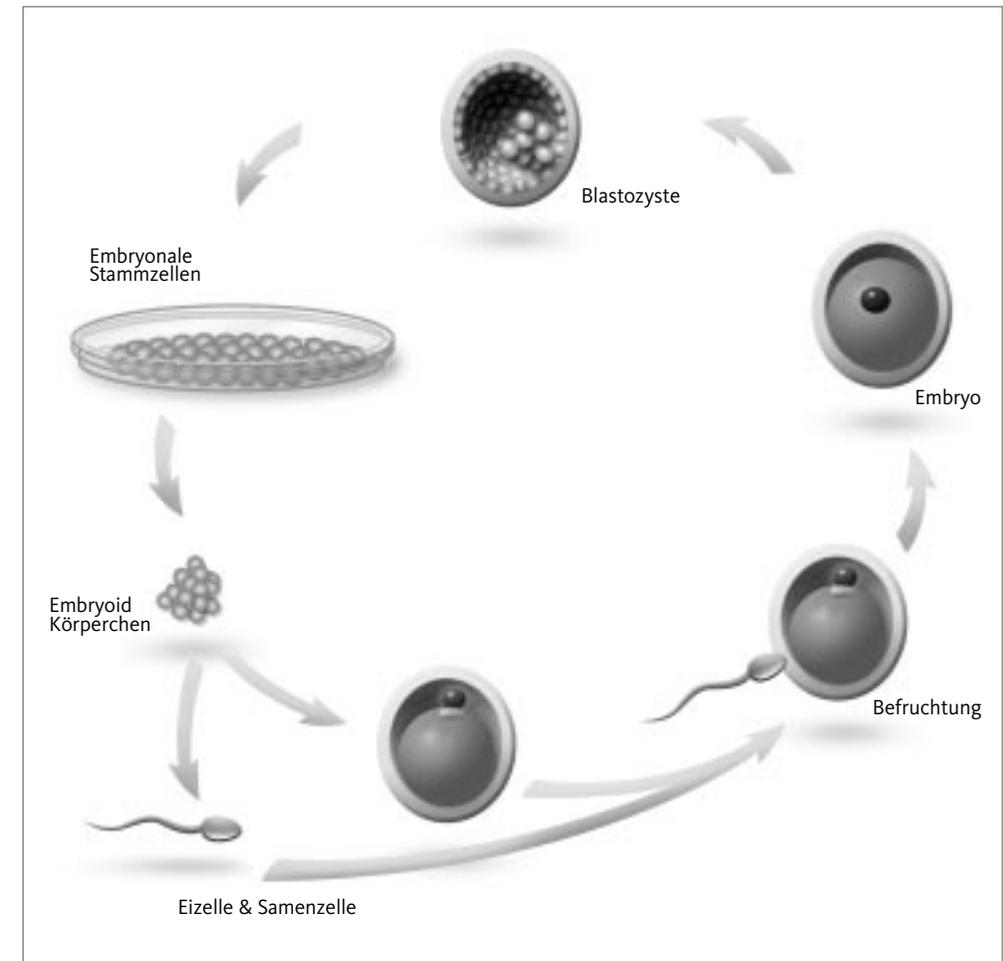
Murine ES-Zellen können zu Keimbahnzellen beiderlei Geschlechts differenzieren. Dieses Phänomen ist *in vivo* wohl bekannt (Joyner, 1993), wo sich Keimbahnchimären aus Blastozysteninjektion mit Stammzellen entwickeln können. Der Nachweis *in vitro* wurde erst später erbracht (Geijsen et al., 2004; Hubner et al., 2003; Toyooka et al., 2003). Hubner et al. beschrieben erstmals die Entwicklung von murinen ES-Zellen zu eizellähnlichen Zellen *in vitro*. Die Zellen exprimierten jedoch einen wichtigen eizellspezifischen Marker nicht, das *Zona-pellucida*-Protein-1 (ZP1). Toyooka et al. publizierten (2003) die Entwicklung von murinen ES-Zellen zu Spermien, zuerst über die *In-vitro*-Differenzierung zu primordialen Keimzellen und danach über *In-vivo*-Reifung nach Transplantation in Samenkanälchen von Mäusen (Toyooka et al., 2003). Geijsen et al. (2004) führten die Ergebnisse weiter, indem sie mit *in vitro* differenzierten Spermien Mäuseeizellen befruchteten. Die entstandenen Embryonen entwickelten sich zu Blastozysten (Geijsen et al., 2004). Der endgültige Beweis, dass es sich tatsächlich um Zellen mit den gleichen Eigenschaften wie Keimzellen handelt, insbesondere ob das genetische *imprinting* während der Reifung der Zellen korrekt stattfindet, steht also noch aus. Dazu müssten aus solchen Zellen nach Befruchtung und Trächtigkeit lebensfähige Nachkommen geboren werden (Vogel, 2003 a).

Sollten humane ES-Zellen ein ähnliches Differenzierungsvermögen wie murine ES-Zellen besitzen, so stünden durch *In-vitro*-Differenzierung von menschlichen Stammzellen zu Eizellen unendlich viele Empfängerzellen für das therapeutische Klonen zur Verfügung (Surani, 2004). Die Möglichkeit, dass solche Oozyten aufgrund der *In-vitro*-Reifung genetische oder epigenetische Mutationen tragen, wäre in diesem Falle nicht problematisch, da die Eizellen ohnehin entkernt würden. Die Tatsache, dass Eizellen und Spermien aus humanen Stammzellen differenziert werden könnten, geht darüber hinaus. Es gibt rein theoretisch einen unendlichen Zyklus, aus dem nach Bedarf sowohl Stammzellen als auch Keimzellen entnommen werden könnten: von der Stammzelle zu Keimzellen, zur Befruchtung, zu Blastozysten, zur Gewinnung von neuen Stammzellen (Abbildung 3, S. 41).

Durch Interspezies-Kerntransfer, in diesem Fall durch Transfer humaner somatischer Zellkerne in bovine Eizellen, gelang es 1998 erstmals, eine embryoähnliche Struktur (von insgesamt 56) ins 60-bis-400-Zell-Stadium zu entwickeln und aus dieser nachfolgend eine Zelllinie mit den Charakteristika embryonaler Stammzellen zu etablieren (WO 98/07841)^a (Robl et al., 1998). Im folgenden Jahr wurde ein weiterer Patentantrag eingereicht, der NT humaner Spenderzellkerne in Schweineoozyten beschrieb, ebenfalls mit dem Ziel, daraus eine ES-Zelllinie zu etablieren (WO 99/21415). Schließlich wurde im Jahr 2003 ein Interspezieskerntransfer-Experiment publiziert, bei dem menschliche Hautzellen in Kanincheneizellen eingesetzt und Zell-

^a Dem Artikel war keine genauere Angabe der Zellzahl zu entnehmen. Da humane Blastozysten aber normalerweise am 4. Tag nach der Befruchtung aus ca. 60 Zellen bestehen und Stammzellen erst ab diesem Stadium entnommen werden können, hat die beschriebene embryoähnliche Struktur also mindestens 60 Zellen.

Abbildung 3 Klonen von Keimzellen



linien mit den Charakteristika embryonaler Stammzellen etabliert worden waren (Chen et al., 2003). Der Versuch zeigt, dass Zellkerne von männlichen wie weiblichen, alten wie jungen Menschen durch Kerntransfer in Kanincheneizellen reprogrammiert werden können (Chen et al., 2003). Experten bezweifeln jedoch, dass die erhaltenen chimären Zellen als Stammzellen bezeichnet werden können, da sie nicht alle wichtigen Charakteristika embryonaler Stammzellen besitzen (Dennis, 2003). So teilen sich die erhaltenen Zellen nicht unendlich, sondern höchstens 44-mal (Chen et al., 2003).

III. Differenzierung embryonaler Stammzellen

Der letzte Schritt beim therapeutischen Klonen, die Entwicklung humaner ES-Zellen zu differenzierten Zellen und deren Einsatz in der Zellersatztherapie oder beim *Tissue-Engineering*, deckt sich zu 100% mit dem weiten Feld der Stammzellforschung (BT-Drs. 14/7052). Diese ist selbst jedoch nicht bedingt durch das Vorhandensein eines Embryos aus SCNT und wird deshalb in ihrer Gesamtheit von dieser Abhandlung nicht erfasst. Hier kann nur grundsätzlich eine Übersicht gegeben werden, verbunden mit aktuellen Versuchen, die im Zusammenhang mit dem Klonen durch Kerntransfer stehen.

Bei der Kultur und Differenzierung embryonaler Stammzellen *in vitro* werden in der Regel folgende Stadien durchlaufen: Undifferenziert wachsen embryonale Stammzellen in Kolonien, meist auf einer Lage *Feeder*-Zellen. Bei humanen ES-Zellen kann es sich dabei um Maus-Fibroblasten handeln; mittlerweile wurden auch *feeder*-unabhängige Kulturbedingungen für humane ES-Zellen entwickelt (Xu et al., 2001). Nach dem Verbringen von ES-Zellkolonien in Suspensionskultur lagern sich die Zellen zu Zellaggregaten, so genannten *embryoid bodies* (EB) oder Embryoidkörperchen zusammen. Nach ein paar Tagen werden die Zellen der EBs dann enzymatisch voneinander getrennt und auf Zellkulturplatten ausgebracht. Dort entwickeln sie sich zu differenzierten embryonalen Zellen (DE) (Prelle et al., 2002). Um embryonale Stammzellen *in vivo* zu differenzieren, werden ES-Zellkolonien in Versuchstiere z.B. immunsupprimierte Mäuse transplantiert. Dort kommt es zur spontanen Ausbildung von Teratomen oder Teratokarzinomen: gut- oder bösartigen Tumoren, die Zelltypen aller drei Keimblätter enthalten (Prelle et al., 2002).

Die drei Keimblätter Ektoderm, Entoderm und Mesoderm bilden sich in der embryonalen Entwicklung aller Wirbeltiere nach dem Blastozystenstadium. Bei diesen frühen embryonalen Strukturen handelt es sich um flächenhafte Zellverbände, die der Bildung von Organanlagen dienen. Aus den Zellen des Ektoderms entwickeln sich im Laufe der embryonalen Entwicklung Haut und deren Anhangsgebilde, Nervensystem, Sinnesorgane sowie Schleimhäute. Zellen des Entoderms bilden epitheliale Anteile des Atmungs- und Verdauungsapparates, einschließlich Leber und Pankreas, sowie Epithelien des Harn- und Geschlechtsapparates. Das Mesoderm differenziert zu Binde- und Stützgewebe, Kreislaufapparat, Niere, Nebenniere, Keimdrüsen und Geschlechtsgängen. Menschliche embryonale Stammzellen entwickeln *in vitro* spontan ein Gemisch aus differenzierten embryonalen Zellen aller drei Keimblätter (Itskovitz-Eldor et al., 2000; Schuldiner et al., 2000). Problematisch ist die Steuerung der Differenzierung. So muss zum Zeitpunkt der Transplantation nicht nur der gewünschte Zelltyp in ausreichender Menge vorhanden sein, sondern alle transplantierten Zellen müssen auch vollständig differenziert sein, da sonst die Gefahr von Teratom- oder Teratokarzinombildung besteht. Wie viele der verabreichten Zellen sich nach einer Transplantation tatsächlich am erforderlichen Ort ansiedeln, ist ebenfalls schwer vorhersehbar.

Da humane embryonale Stammzellen als pluripotent gelten, könnten sie theoretisch für die Behandlung einer sehr breiten Palette von Krankheiten eingesetzt werden (Lanza et al., 1999). Praktisch wurden humane Stammzellen bereits in neuronale, hämatopoietische und endokrine Vorläuferzellen differenziert (Hochedlinger and Jaenisch, 2003). Klinische Studien mit humanen embryonalen Stammzellen wurden bis dato noch nicht begonnen (Zerhouni, 2003). Im Rahmen der so genannten regenerativen Medizin könnten humane Stammzellen therapeutische Bedeutung im Hinblick auf die Gewebe erlangen, die beim erwachsenen Menschen ein nur sehr geringes Regenerationsvermögen aufweisen. Dies trifft insbesondere für das zentrale Nervensystem zu. Als mögliche Einsatzfelder der Stammzellen beim Zell- und Gewebeersatz werden aber nicht nur neurodegenerative Erkrankungen wie Morbus Parkinson und Chorea Huntington, sondern auch Herzinfarkte, Schlaganfälle, Lähmungen, Epilepsie, Diabetes mellitus (Typ 1), Leukämien und Immunschwächen genannt.

Trotz der enormen Entwicklungsmöglichkeiten von embryonalen Stammzellen sollte man nicht vergessen, dass sich murine embryonale Stammzellen, murine embryonale Stammzellen aus Kerntransfer, humane embryonale Stammzellen und humane embryonale Stammzellen aus Kerntransfer unterscheiden können. Obwohl keine Hinweise auf Unterschiede im Entwicklungspotenzial zwischen murinen embryonalen Stammzellen und murinen embryonalen Stammzellen aus Kerntransfer vorliegen (Hochedlinger and Jaenisch, 2003), ist im Prinzip erst seit der Generierung humaner Stammzellen aus menschlichen Kerntransferembryonen der Beweis möglich, dass humane Stammzellen aus Kerntransfer die Erwartungen erfüllen, die durch humane Stammzellen geweckt wurden (Hwang et al., 2004).

Es gibt bereits *in vivo* Modelle, bei denen humane embryonale Stammzellen in differenzierte embryonale (DE-) Zellen entwickelt und danach transplantiert wurden. 2001 gelang es, humane embryonale Stammzellen (hES) *in vitro* zu neuronalen Vorläuferzellen zu entwickeln und diese nach Selektion in das Gehirn neugeborener Mäuse zu transplantieren. Dort kam es zur Verteilung und endgültigen Differenzierung zu Astrozyten, Nerven- und Gliazellen (Reubinoff et al., 2001; Zhang et al., 2001). Die Bildung von Teratomen wurde nicht beobachtet. Die Forscher sahen dies als Beweis für die erfolgreiche Selektion von differenzierten neuronalen Vorläuferzellen vor der Transplantation.

Eine weitere Variante im Tierversuch ist die Durchführung des therapeutischen Klonens ohne die Etablierung von embryonalen Stammzellen. Zawada et al. (1998) generierten Rinderembryonen aus SCNT, setzten diese in Empfängertiere ein und entnahmen die Feten am Tag 42-50 der Trächtigkeit. Aus den Feten wurden dopaminerge Neuronen isoliert, kultiviert und schließlich in immunsupprimierte Ratten, ein Tiermodell für Parkinson, transplantiert. Bei Parkinson handelt es sich um eine Erkrankung, in deren Verlauf erst die dopaminergen Neuronen im mittleren Teil des Gehirns und danach im Bereich des Striatums degenerieren. Infolgedessen kommt es

bei den Betroffenen zu motorischen Ausfällen. Nach der Transplantation kam es zur Verbesserung des klinischen Bildes der Ratten (Zawada et al., 1998).

Barberi et al. (2003) beschrieben erstmals ein Parkinson-Modell des therapeutischen Klonens bei der Maus. Aus murinen Kerntransferembryonen wurden embryonale Stammzelllinien etabliert und diese zu dopaminergen, GABAergen, serotonergen und cholinergen Neuronen sowie Gliazellen differenziert. Nach Transplantation in ein Modell für die Parkinson-Erkrankung (Mäuse mit 6-Hydroxidopamin-induzierten Läsionen) kam es zur nachhaltigen Verbesserung der klinischen Symptome. Obwohl nach der Transplantation bei einigen Mäusen die vierfache Anzahl an dopaminergen Neuronen-entsprechenden Zellen im Striatum nachzuweisen war, kam es nicht zur Überkompensation der Erkrankung. Acht Wochen nach der Transplantation wurde zudem bei Mäusen, die Neuronen aus geklonten Stammzellen erhalten hatten, die doppelte Anzahl an Neuronen nachgewiesen wie bei Mäusen der Kontrollgruppe, welche Neuronen aus herkömmlichen Stammzellen erhalten hatten. Des Weiteren wurde keine Entwicklung von Teratomen beobachtet. Diese Beobachtung ist besonders erfreulich, da vormals für ein Parkinson-Rattenmodell, welches mit dopaminergen Neuronen aus embryonalen Stammzellen therapiert worden war, die Entwicklung von Tumoren bei 5 von 19 behandelten Tiere beschrieben worden war (Bjorklund et al., 2002).

Die erste Kombination von therapeutischem Klonen mit Gentherapie beschreibt eine Veröffentlichung von Rideout et al. (2002). Mäuse, die aufgrund eines genetischen Defekts immundefizient waren, wurden als Zellkernspender für SCNT genutzt. Aus den resultierenden Embryonen wurde eine Stammzelllinie etabliert, welche den ererbten Defekt ($Rag2^{-/-}$) trug. In der Zellkultur wurde der genetische Defekt durch homologe Rekombination korrigiert. Die resultierenden, gesunden ES-Zellen wurden *in vitro* zu hämatopoietischen Vorläuferzellen differenziert und schließlich erfolgreich in die Mäuse rücktransplantiert. Diese entwickelten nach drei bis vier Wochen Zellen der Immunabwehr und Antikörper (Rideout, III et al., 2002). Ein ähnliches Verfahren scheint auch für den Menschen möglich, seit erstmals eine erfolgreiche homologe Rekombination in humanen ES-Zellen beschrieben wurde (Zwaka and Thomson, 2003). Die Prozedur wäre eine potenzielle Therapieoption bei Erkrankungen wie z. B. der Sichelzellenanämie (Hochedlinger and Jaenisch, 2003).

5. Veröffentlichungen im Hinblick auf Kerntransfer beim Menschen

Die Etablierung der ersten humanen Stammzelllinie aus geklonten menschlichen Embryonen wurde im Januar 2004 publiziert (Hwang et al., 2004). Das Protokoll ist detailliert beschrieben, insbesondere die vorgenommene Anpassung an die Spezies Mensch:

- » Eine Zeitspanne von zwei Stunden zwischen Fusion und Aktivierung der Eizelle (*reprogramming time*) wirkte sich besonders günstig auf die Entwicklung der Embryonen aus.
- » Die Aktivierung der Kerntransferkomplexe erfolgte chemisch durch Inkubation mit A23187, einem Calcium-Ionophor, und 6-Dimethylaminopurin (6-DMAP).
- » Während der Embryokultur in humaner synthetischer Oviduct-Flüssigkeit, supplementiert mit Aminosäuren (hmSOFaa), wurden humanes Serum Albumin und Fructose zugesetzt. Die Forscher bezeichneten dies als Energiesubstrat.

Kennzahlen zum SCNT beim Menschen nach Hwang et al. (2004)

Gespendete Eizellen	242 (von 16 freiwilligen Spenderinnen)
Geeignete Eizellen	176 in Metaphase der zweiten Reifeteilung
Karyoplasten	aus Kumuluszellen der Spenderinnen (autologer Kerntransfer)
Blastozysten	30 (17% Blastozysten per fusionierte Embryonen)
Isolation der ICM aus	20 Blastozysten
ES-Zelllinie	1 SCNT-hES-1 (> 70 Zellpassagen mit stabilem Karyotyp)

Die Tatsache, dass die Eizellspenderinnen auch als Zellkernspenderinnen fungierten, verhindert den endgültigen Ausschluss der Möglichkeit, dass die Eizellen womöglich nicht durch Kerntransfer, sondern im Zuge einer Parthenogenese aktiviert wurden. Dieser Verdacht wird in der Arbeit von Hwang durch den Nachweis heterozygoter Chromosomen und biparentaler Expression imprintierter Gene entkräftet und ist letztendlich wohl nur als „Schönheitsfehler“ zu betrachten (Müller-Jung, 2004 a).

Die Publikation von Hwang widerlegt Schlüsse, die im Jahr zuvor aus Erkenntnissen von Simerly et al. gezogen worden waren. Aufgrund von Untersuchungen zum Klonen von Primaten hatten die Forscher das Gelingen von SCNT nach herkömmlichen Protokollen bei der nah verwandten Spezies Mensch für unwahrscheinlich erklärt (Simerly et al., 2003; Vogel, 2003b).

Dass weltweit erst zwei Primaten durch Kerntransfer von embryonalen Zellkernen geklont werden konnten (Meng et al., 1997), hatten die Forscher zum Anlass

genommen, die Entwicklung von Primatenembryonen direkt nach erfolgtem Kerntransfer zu untersuchen. An frühen Embryonalstadien wurde gezeigt, dass Embryonen mit unauffälliger Morphologie viele Zellen mit verändertem Chromosomensatz enthielten. Als Ursache dafür entdeckte man, dass die mitotischen Spindeln, Strukturen, die während der Zellteilung die Chromosomen positionieren, verändert waren. Zwei der für Funktion und Morphologie der Spindeln wichtigen Proteine fehlten. Dieses Phänomen erklärte man mit der Lokalisation der Spindelproteine in der unbefruchteten Eizelle von Primaten. Im Gegensatz zu allen anderen Spezies konzentrieren sich diese bei Primaten in der Nähe der Chromosomen, sodass Simerley et al. davon ausgingen, dass die Spindelproteine mit dem Entkernen der Eizelle entfernt würden. Als Folge davon käme es zu einer unregelmäßigen Verteilung des Erbmaterials während der ersten embryonalen Teilungen und schließlich zum Sistieren der embryonalen Entwicklung. Die Forscher gingen davon aus, dass in den Eizellen der nah verwandten Spezies Mensch eine ähnliche Verteilung der Spindelproteine besteht.

Hwang et al. diskutieren diesen Aspekt (2004) in ihrer Publikation. Dass die SCNT-hES-Zellen euploid sind, schließt nicht aus, dass andere aneuploide Kerntransferblastozysten produziert worden waren, die dann aber bei der Weiterentwicklung zu einer Stammzelllinie versagten. Hwang et al. verweisen insbesondere darauf, dass sich Protokolle und Medien bei beiden Publikationen unterscheiden. Es wird angenommen, dass die Vorgehensweise bei Simerly et al. weniger an Rhesusaffen adaptiert war als das Protokoll von Hwang et al. an den Menschen. Gleich nach der Veröffentlichung von Hwang et al. bezeichneten einige Wissenschaftler die Erkenntnisse von Simerly et al. einfach als „Komplikationen (durch) technische Probleme“ (Müller-Jung, 2004a).

Die Ergebnisse von Hwang et al. gehen über die Arbeiten der Firma ACT weit hinaus, die im November 2001 Fotos von menschlichen Kerntransferembryonen im 4- bzw. 6-Zell-Stadium veröffentlicht hatte. Deren embryonale Entwicklung sistierte spätestens im 6-Zell-Stadium (Cibelli et al., 2001).

Abgesehen von diesen ersten Schritten des therapeutischen Klonens beim Menschen ist die Öffentlichkeit immer wieder mit Meldungen zum Thema reproduktives Klonen von Menschen konfrontiert worden. Zum Teil handelt es sich um Wunschgedanken bekannter Personen, die in regelmäßigen Abständen die Geburten von „Klonbabys“ verkünden, seit der amerikanische Reproduktionsmediziner Richard Seed (1997) erklärte, er wolle Menschen klonen. Es gibt aber bereits ernst zu nehmende Veröffentlichungen, wie z.B. über eine vorzeitig beendete Drillingschwangerschaft mit menschlichen Embryonen aus Kerntransfer (Zhang et al., 2003). In diesem Falle wurden allerdings Vorkerne aus befruchteten Zygoten in enukleierte Eizellen transferiert, sodass die entstandenen Embryonen nicht als Klone im eigentlichen Sinne bezeichnet werden können. Nach erfolgreichem Einsetzen von fünf Kerntransferembryonen in eine 30-jährige Patientin wurde ein Fetus am Tag 33

abgetrieben, um die Schwangerschaft auf eine Zwillingschwangerschaft zu reduzieren; ein weiterer Fetus wurde nach einem Membranriss in der 24. Woche entbunden und starb kurz darauf an Atmungsinsuffizienz. Der dritte Fetus wurde wegen Nabelschnurvorfalls in der 29. Woche tot entbunden (Zhang et al., 2003).

Als besonders Besorgnis erregend wird derzeit empfunden, dass es neben Wissenschaftlern, die ihre Studien zum Kerntransfer beim Menschen mit ausführlichem Protokoll publizieren, Forscher gibt, die sich am Rande der Legalität bewegen. In diesem Sinne appelliert Robert Lanza an die internationale Gemeinschaft: „Nun, da das Verfahren öffentlich zugänglich ist, müssen wir weltweit Gesetze beschließen, um den Missbrauch der Technik zum reproduktiven Klonen (von Menschen) zu verhindern“ (Müller-Jung, 2004b).

6. Nutzen und Risiken

6.1 Nutzen und Risiken des reproduktiven Klonens

Reproduktives Klonen bietet die einzigartige Möglichkeit, den Vorgang der epigenetischen Reprogrammierung von Erbmaterial zu erforschen. Betrachtet man das reproduktive Klonen also nicht als sinnvolle Handlung an sich, sondern als funktionierendes Testsystem für derartige Fragestellungen, so eröffnen sich Möglichkeiten für die Grundlagenforschung, die weit über das Bestimmen von Gensequenzen hinausgehen: „Der Mensch ist mehr als die Summe seiner Gene“ (Winnacker, 2001). Welche epigenetischen Strukturen determinieren normalerweise die Aktivierung oder Inaktivierung von Genen? Welche Faktoren in der Eizelle beeinflussen diese Strukturen derart, dass die ursprüngliche Genexpression des Spenderzellkerns vorerst inaktiviert wird (Alberio and Campbell, 2003)? Welche Faktoren in der Eizelle induzieren im Folgenden die Expression embryonaler Gene? Die Beantwortung dieser Fragen führt vordergründig zu Möglichkeiten wie erhöhter Effizienz des Kerntransfers und daraus resultierenden realistischen Perspektiven für das therapeutische Klonen. Darüber hinaus ergeben sich aber auch Möglichkeiten, die so genannte Transdifferenzierung zu verstehen: die Veränderung von Genexpressionsmustern differenzierter Zellen ohne vorherigen Kerntransfer in eine Eizelle, in so genannten „eizellfreien Systemen“.

Bereits bei wenig differenzierten Zellen wie adulten Stammzellen wird die Plastizität der Zellkerne, also ihr Potenzial zur Transdifferenzierung, kontrovers diskutiert (Kocher et al., 2001; Joshi and Enver, 2002; Morshead et al., 2002). Nur vereinzelt behandeln Veröffentlichungen bis dato die Transdifferenzierung adulter Zellen (Miettinen et al., 1994).

Überraschenderweise ist es bereits gelungen, die Genexpression von humanen Lymphozytenkernen durch Injektion in *Xenopus*-Eizellen derart zu beeinflussen, dass das Pluripotenzgen bzw. das embryonale Markergen Oct4 transkribiert wurde (Byrne et al., 2003). Diese Studie ist kein typisches Interspezies-Klonen, da nach dem Kerntransfer keine Zellteilung und damit keine embryonale Entwicklung induziert wurde. Andererseits ist der Transfer in eine Eizelle ein Element des Versuchs, sodass es sich auch nicht direkt um eine Transdifferenzierung im oben definierten Sinne handelt. Der Versuch unterstützt dennoch das Prinzip der Transdifferenzierung insofern, als er zeigt, dass für die Reprogrammierung von Zellkernen die Induktion von Zellteilung nicht notwendig ist.

Abgesehen davon stellt das reproduktive Klonen durch SCNT eine besonders geeignete Methode dar, das Genom von landwirtschaftlichen Nutztieren zu verändern. Daraus ergeben sich folgende interessante Perspektiven:

- I. *Gene farming*
- II. Xenotransplantation
- III. Prionenforschung
- IV. Artenschutz

I. *Gene farming* bedeutet Produktion medizinisch oder verfahrenstechnisch wichtiger Proteine in der Milchdrüse (Schnieke et al., 1997), im Blutserum (Kuroiwa et al., 2002) oder in Eiern (Powell, 2003a) von Nutztieren. Vorstellbar in diesem Zusammenhang ist die Produktion von humanen Blutgerinnungsfaktoren, Fibrinogen, humanem Serumalbumin oder Immunglobulinen. Diese Ideen existieren seit der Möglichkeit, transgene Tiere durch DNA-Mikroinjektion zu generieren (Clark, 1998). Mit SCNT steht erstmals eine Methode zur Verfügung, die Spenderzellen vor dem NT gezielt durch so genanntes *gene targeting* zu verändern (McCreath et al., 2000). Zudem bietet SCNT die Möglichkeit, transchromosomale Tiere zu generieren, indem in den Spenderzellkern vor dem NT ein künstliches Chromosom eingesetzt wird. Künstliche Chromosomen sind große DNA-Sequenzen, die komplexe therapeutische Gene kodieren können. Transchromosomale Nachkommen aus SCNT können gewünschte Proteine im Blut produzieren (Robl et al., 2003). Beim *gene farming* mit Kerntransfertieren ist zu erwarten, dass nur einige wenige Gründer einer gentechnisch veränderten Zuchtlinie geklont sein müssten. Sie könnten ihre Eigenschaften durch konventionelle Züchtung auf ihre Nachkommen übertragen (Behboodi et al., 2004). Der Vorteil einer solchen Prozedur besteht nicht nur darin, den riskanten und wenig effizienten Prozess des SCNT nicht oft wiederholen zu müssen, sondern darin, dass epigenetische Mutationen wie aberrante *imprints* während der Gametogenese im geklonten Tier korrigiert werden. Die Nachkommen wären von solchen Unregelmäßigkeiten dann nicht mehr betroffen (Powell, 2003b).

Bislang ist es jedoch sehr kostenintensiv, therapeutische Proteine auf einem Niveau, das durch Qualitätskontrolle und -sicherung standardisiert ist und somit für eine Arzneimittelprüfung geeignet wäre, zu produzieren (Faber et al., 2003; Powell, 2003a). Die erste Arzneimittelzulassung eines *Gene-farming*-Proteins aus Kerntransfer-Tieren, rekombinantes α 1-Antitrypsin (recAAT) (McCreath et al., 2000), wurde für Mitte 2005 erwartet. Es sollte zur Behandlung von Patienten eingesetzt werden, die an zystischer Fibrose leiden. Im Juni 2003 wurde die Entwicklung von recAAT in der klinischen Phase II bis auf weiteres gestoppt. In einer Pressemitteilung vom 22. März 2004 bestätigte der Vorstand von *PPL Therapeutics*, dass Angebote zum Verkauf der Firma geprüft würden^b. Diese enttäuschende Entwicklung sollte man allerdings nicht ausschließlich mit der Qualität des potenziellen Arzneimittels aus SCNT in Zusammenhang bringen. Den zuständigen Behörden die Nachweise der Unbedenklichkeit dieser neuartigen Wirkstoffe zu erbringen, ist aufwendige Pionierarbeit, die bislang von drei kleinen Unternehmen mit wenig Kapitaldeckung (*PPL*, *GTC*, *Pharming*) geleistet wurde. Auch Missmanagement führte insbesondere bei *PPL* zum Vertrauensverlust bei Aktionären und potenziellen Partnern (Powell, 2003a).

II. Unter Xenotransplantation wird die Übertragung von Organen, Geweben oder Zellen zwischen zwei verschiedenen Spezies verstanden, etwa vom Schwein auf den Menschen. Eine solche Möglichkeit wird wegen der Knappheit von Spenderorganen in Erwägung gezogen, wobei eine Transplantation oft die letzte therapeutische Option bei Organversagen darstellt. Das Schwein stellt aufgrund von Organgröße, Physiologie und guter Verfügbarkeit einen potenziellen Organspender für den Menschen dar. Bei einer solchen Transplantation käme es jedoch zu einer hyperakuten Abstoßungsreaktion (HAR) durch natürliche menschliche Antikörper gegen Disaccharide [α 1,3-Galactose] auf den Schweinezellen (Niemann et al., 2003; Prather et al., 2003). Durch Kerntransfer ist es inzwischen gelungen, Schweine zu klonen, bei denen beide Allele des Enzyms inaktiviert wurden, welches die Synthese der Zucker katalysiert: (α 1,3)-Galactosyl-Transferase (Phelps et al., 2003). Erste Transplantationsversuche sind abzuwarten.

III. Als Tiermodell für die Forschung an Transmissiblen Spongiformen Enzephalopathien, wie z.B. BSE oder der neuen Variante der Kreuzfeld-Jakob-Krankheit, standen bis vor kurzem nur prionproteindefiziente Mäuse (PrP^{-/-}) zur Verfügung (Prusiner et al., 1993). Geklonte Schafe (PrP^{-/+}) hatten in einem einzigen veröffentlichten Experiment maximal zwölf Tage überlebt (Denning et al., 2001). So stellt die Geburt mehrerer, wahrscheinlich BSE-resistenter Kälber in Korea einen großen Fortschritt dar (Cyranoski, 2003). Das Team des Tiermediziners Hwang, derselbe, der die erste

^b <http://www.ppl-therapeutics.com/news> (geladen 22.3.2004)

menschliche Stammzelllinie aus geklonten menschlichen Embryonen etablierte (Hwang et al., 2004), hat zwei unterschiedliche Ansätze, BSE-resistente Rinder zu klonen, als weltweites Patent eingereicht. Ein Ansatz beruht auf der Überexpression von mutiertem PrP^C, welches selbst bei Kontakt mit PrP^{Sc} keine Formationsänderung vornehmen sollte (Perrier et al., 2002). Vier geklonte Kälber dieser Art sind bereits geboren. Der alternative Ansatz beinhaltet einen Knock-out des PrP^C (Bueler et al., 1993). Es wird von fortgeschrittenen Trächtigkeiten mit geklonten Kälbern dieser Art berichtet. Es ist abzuwarten, ob Knock-out-Kälber ausgetragen werden, wie sich die geborenen Kälber gesundheitlich entwickeln und ob sie sich bei Belastung mit PrP^{Sc} über das Futter tatsächlich als BSE-resistent erweisen.

IV. Ein weiteres Einsatzgebiet des Kerntransfers ist der Artenschutz. So wurde in China ein Programm initiiert, in dem die Population des Großen Pandas (umfasste 1998 noch 1000 Exemplare weltweit) vergrößert werden soll. Durch Interspezies-Kerntransfer von Pandazellkernen in Eizellen von Schwarzbären wurden die raren Panda-eizellen geschont (Saegusa, 1998). Aus dem Transfer von Zellkernen Nordafrikanischer Falbkatzen (*Felis silvestris lybica*) in Oozyten von Hauskatzen (*Felis silvestris catus*), wurden drei Nachkommen geboren, welche aber innerhalb von 36 Stunden an Atmungsinsuffizienz verendeten (Gómez et al., 2004). Durch Transfer von somatischen Zellen verstorbener Europäischer Mufflons (*Ovis orientalis musimon*) in Eizellen von Hausschafen (*Ovis aries*) kam es 2001 zur Geburt eines Nachkommen, dessen Kern-DNA und Phänotyp dem eines Mufflons entsprachen (Loi et al., 2001). Versuche, die Riesen-Elenantilope (*Taurotragus derbianus*) durch Kerntransfer mit Elen- oder Rindereizellen reproduktiv zu klonen, resultierten nur in embryonaler Entwicklung bis ins Blastozystenstadium (Damiani et al., 2003). Das Klonen von Wild, z. B. von Prachthirschen, wird von US-amerikanischen Forschern vorangetrieben (Long et al., 2003). Hier stehen allerdings, im Gegensatz zum Artenschutz, kommerzielle Motive im Vordergrund.

Reproduktives Klonen ist derzeit durch die insgesamt niedrige Effizienz der Prozedur mit einem hohen Risiko für Aborte, Missbildungen und lebensschwache Nachkommen behaftet. Momentan sind als Spätfolgen von SCNT unter anderem die Beeinträchtigung des Immunsystems (beschrieben für Maus, Rind, Schaf, Ziege), Fettleibigkeit (Maus), Leberschäden (Maus, Rind) und Verkürzung der Lebenszeit (Maus, Schwein) bekannt (Tabelle 2, S. 60 ff.). Sollte die Effizienz des reproduktiven Klonens entschieden verbessert werden, so käme eine Nutzung bei der Zucht landwirtschaftlicher Nutztiere infrage. Generell hat die Tierzucht zum Ziel, wertvolle Tiere möglichst schnell zu vermehren. Besonders die Selektionsintensität auf der weiblichen Seite könnte theoretisch durch den Einsatz der Kerntransfertechnik weiter erhöht werden. Dies bedeutet, dass die Anzahl der Nachkommen eines weiblichen

Zuchttiers, die bei natürlicher Fortpflanzung durch die maximale Anzahl der Trächtigkeiten limitiert ist, durch die Spenden von Zellkernen deutlich erhöht werden könnte. Die erwünschten Merkmale können dabei unterschiedlich sein. Zu traditionellen tierzüchterischen Charakteristika landwirtschaftlicher Nutztiere, wie z. B. hohe Milchleistung oder gute Fleischqualität, sind mittlerweile Eigenschaften hinzugekommen, die auf gentechnischer Veränderung der Tiere beruhen.

Theoretisch sollte die Prüfung von Nachkommen aus Kerntransfer eine hohe Genauigkeit der Zuchtwertschätzung für Fleischleistungs- und Qualitätsmerkmale sowie eine genauere Schätzung von Genotyp-Umwelt-Interaktionen ermöglichen (Wolf, 2000). Ein Beispiel wäre die Zuchtwertschätzung für Qualitätsmerkmale bei Rindfleisch, wie z. B. Zartheit. Kerngenomidentische Rinder aus SCNT könnten probeweise geschlachtet und deren Fleischqualität bewertet werden. Bei positiver Beurteilung könnte der Zellkernspender verstärkt vermehrt werden (Kleiner, 2002). Lebensfähige Nachkommen aus Kerntransfer mit Zellen aus Schlachtkörpern, die bereits 48 Stunden gekühlt waren, sind bereits beschrieben (Adams et al., 2004).

Weitere Ziele für den Einsatz von SCNT in der Tierzucht sind unter anderem die Erhöhung von Krankheitsresistenz, Wachstumsraten oder Futtermittelverwertung durch transgene landwirtschaftliche Nutztiere aus SCNT (Prather et al., 2003). In Neuseeland sind bereits neun transgene Kühe aus Kerntransfer in Laktation, die in ihrer Milch 8-20% mehr ss-Kasein und die doppelte Menge an κ-Kasein produzieren (Brophy et al., 2003). Die Milch ist mit diesem veränderten κ-Kasein/Gesamt-Kasein-Verhältnis besonders gut geeignet für die Herstellung von Käse und Joghurt. Die Hersteller verzichten darauf, die Produkte auf den US-Markt zu bringen, bis die FDA (*Food and Drug Administration*) den gesetzlichen Rahmen für den Verzehr von Lebensmitteln aus Kerntransfertieren geschaffen hat (Lee et al., 2003).

Derzeit sind in den USA bereits geklonte Zuchtrinder auf dem Markt: Im September 2003 erzielte eine preisgekrönte Kuh aus Kerntransfer auf einer Auktion 170 000 Dollar. Konservative Schätzungen liegen bei einem Gewinn von einer Million Dollar pro Jahr, der mit dem Verkauf von Samen eines preisgekrönten geklonten Bullen verdient werden könnte (Powell, 2003b). Wichtig ist im Zusammenhang mit solchen Erwartungen wieder die rechtliche Situation. Die Frage, ob tierische Erzeugnisse, wie z. B. Milch und Fleisch von geklonten Tieren bzw. von Nachkommen geklonter Tiere, zum Verzehr freigegeben werden können, wurde bereits von der FDA in den USA bearbeitet (FDA, 2003). In einer Zusammenfassung des Berichts der Behörde vom November 2003 wurde die Einschätzung geäußert, dass Milch und Fleisch von geklonten Tieren wahrscheinlich so sicher seien wie die Erzeugnisse herkömmlich gezüchteter Tiere. Die Kommission stellte allerdings fest, dass das vorhandene Datenmaterial für eine umfassende Beurteilung eigentlich nicht ausreicht. Insbesondere fehlt es an Daten über die Nachkommen geklonter Tiere, die wahrscheinlich anstelle der teuren Klone in die Nahrungskette gelangen würden (Powell,

2003b). Die gegenwärtig dürftige Datenmenge lässt sich gut am Beispiel einer Veröffentlichung von Walsh et al. (2003) illustrieren: Die vergleichende Studie zur Zusammensetzung der Milch geklonter Kühe und herkömmlich gezüchteter Kühe kommt zu dem Schluss, dass sich die Milch nicht signifikant voneinander unterscheidet (Walsh et al., 2003). Die Autoren erwähnen dabei in ihrer Einleitung, dass ihnen keine vergleichbare Studie bekannt ist.

Gegenwärtig wird der Routineeinsatz von SCNT bei der Zucht landwirtschaftlicher Nutztiere allerdings aufgrund der hohen Kosten und Risiken als unwahrscheinlich eingeschätzt (Cyranoski, 2003). Für die Anwendung in der Tierzucht prophezeien einige Wissenschaftler bereits die Renaissance des Kerntransfers mit embryonalen Spenderzellen (ECNT), welcher bekanntermaßen effizienter ist (Wells et al., 2003b).

6.2 Nutzen und Risiken des therapeutischen Klonens

Die offensichtlich niedrige Effizienz einzelner Schritte des therapeutischen Klonens und die Tatsache, dass bislang nur wenige Tierversuche das komplette Szenario beschreiben, hinterlassen Zweifel an der Praktikabilität der Methode. Besonders nachteilig ist der hohe Bedarf an menschlichen Eizellen bzw. Embryonen. Es stehen jedoch noch keine ausgereiften Alternativen zur Verfügung. Umso klarer sollte der ursprüngliche Grund für das therapeutische Klonen dargestellt werden: Bei der Verwendung von Stammzellen als Zell- und Gewebeersatz muss aus klinischer Sicht zwischen allogenen (heterologen) und autologen Zellen unterschieden werden. Während allogene Zellen eine andere genetische Ausstattung besitzen als der Empfänger des Gewebes, liegt bei autologen Zellen eine genetische Identität vor (BT-Drs. 14/7052). Zu allogenen Transplantaten würden ES-Zellen aus etablierten ES-Zelllinien gehören. Die individuell aus SCNT-Embryonen etablierten ES-Zellen könnten die Grundlagen für autologe Transplantate bilden.

Das aufwendige Verfahren des therapeutischen Klonens verspricht demnach die Überwindung eines schwer wiegenden Problems der Transplantationsmedizin: der Abstoßung von Transplantaten aufgrund von Immunreaktionen (Kind and Colman, 1999; Lanza et al., 1999). Die Tatsache, dass sich Nachkommen aus SCNT in ihrer mitochondrialen DNA von ihrem Zellkernspender unterscheiden, führte zu der Befürchtung, dass von mitochondrialer DNA kodierte Peptide, auch wenn es sich nur um einige wenige handelt, immunogen wirken könnten. In Mäusen kodiert mtDNA *Minor-histocompatibility*-Antigene (miHAs), die nach Präsentation durch nicht klassische MHC-1-Moleküle eine T-Zell-Reaktion stimulieren können (Fischer et al., 1991). Bei dieser Spezies können zytotoxische T-Zellen bereits auf die Substitution eines Nukleotids im mitochondrialen ND1-Gen reagieren (Loveland et al., 1990). Eine Untersuchung bei der Spezies Rind zeigte, dass embryonales Nieren-, Skelett-

und Herzmuskelgewebe, welches aus SCNT stammte und mtDNA des Eizellspenders exprimiert, bei Transplantation in den Zellkernspender nicht zwangsläufig eine Immunreaktion hervorrief (Lanza et al., 2002). Die Autoren räumten jedoch ein, dass dieses Ergebnis nicht für alle beliebigen Kombinationen von Kernspender und Eizellspender gültig sein müsse.

Wissenschaftler aus der Biotechnologiebranche gehen so weit zu behaupten, pro Tag würden 3 000 Amerikaner an Krankheiten sterben, die zukünftig durch Stammzelltherapie geheilt werden könnten (Lanza et al., 2001). Sie beziehen sich dabei auf Erkrankungen, die aktuell:

- »» medikamentös gut therapiert werden können, wie z. B. Diabetes mellitus,
- »» medikamentös nicht gut therapiert werden können, wie z. B. Multiple Sklerose,
- »» nur durch Organtransplantation therapiert werden können.

Derzeit wird auch der Begriff *pharmacogenetics* im Zusammenhang mit dem therapeutischen Klonen verwendet (Wilmut, 2003). Dahinter steht, dass es bei der Einnahme von Arzneimitteln zu individuell unterschiedlicher Pharmakodynamik im Patienten kommt. An Zellen aus Kerntransferembryonen könnten der Metabolismus der benötigten Medikamente vor der Einnahme individuell getestet und auf diese Weise falsche Dosierungen vermieden werden (Wilmut, 2003).

Die Probleme bei Organtransplantationen sind Knappheit der Spenderorgane und Abstoßungsreaktionen bei Immuninkompatibilität. Man benötigt also regenerierbare Organquellen, die außerdem immunologisch mit dem Patienten kompatibel sein sollten. Diese Anforderungen erfüllen autologe ES-Zellen, welche therapeutisch geklont wurden. Die Anforderungen erfüllen auch allogene ES-Zellen, welche in Stammzellbanken zusammengefasst werden, aus denen die unter immunologischen Aspekten passenden Linien angefordert werden könnten (Winnacker, 2003). Die Anforderungen erfüllen ebenfalls autologe oder allogene, adulte und neonatale Stammzellen, sodass der Nutzen des therapeutischen Klonens zwar evident ist, durch andere Methoden aber gleichermaßen erzielt werden kann. Dies relativiert möglicherweise die postulierte Notwendigkeit der Strategie des therapeutischen Klonens.

Ein Risiko bei der Zellersatztherapie mit jeder Art von pluripotenten Stammzellen ist die Bildung von Teratomen oder Teratokarzinomen nach der Transplantation. Dazu kann es kommen, wenn gemischte Zellpopulationen verpflanzt werden, die noch undifferenzierte Stammzellen enthalten. Ebenfalls befürchtet wurde vor der Entwicklung *feeder*-unabhängiger Kulturbedingungen eine Übertragung von tierischen Krankheitserregern auf die humanen ES-Zellen während der Zellkultur.

Ein exklusives Problem von therapeutisch geklonten ES-Zellen ist die Gefahr, dass die transferierten Zellkerne entweder durch die Manipulation bereits Erbgutschädigungen, z.B. durch UV-Strahlung, enthalten oder durch abnorme epigenetische Reprogrammierung während des Klonens verändert sein könnten. Auch dies könnte nach Transplantation der Zellen in einen Patienten eine Krebserkrankung verursachen. Ebenfalls nicht zu vernachlässigen ist die Zeit, die vor dem Beginn der Zellersatztherapie benötigt würde, um die für den Patienten benötigte Zelllinie zu etablieren, zu charakterisieren und zu vermehren.

7. Aussichten

7.1 Kerntransfer beim Menschen

Die Herstellung der ersten menschlichen Blastozysten aus Kerntransfer und die Etablierung der ersten menschlichen Stammzelllinie aus Kerntransferembryonen (Hwang et al., 2004) entspricht dem, was aufgrund von Tierversuchen für SCNT beim Menschen erwartet wurde. Nicht nur der Eizellbedarf, die Blastozystenrate und der Prozentsatz gewonnener ES-Zelllinien aus fusionierten Embryonen liegen in der erwarteten Spanne; auch der Spenderzelltyp (Kumuluszelle) scheint bei allen Spezies besonders effizient zu sein (Tian et al., 2003). Anders als noch 2003 vermutet (Simerly et al., 2003), stellen Primaten also keine Ausnahme für den Vorgang des Kerntransfers dar. So kann man möglicherweise eine Schnittmenge an Daten, die aus Kerntransfer-Experimenten bei zehn Spezies zugänglich ist, auf den Menschen übertragen: Menschliche Kerntransferembryonen zeichnen sich wahrscheinlich durch hohe epigenetische Variabilität aus, was für den Fall einer Nutzung beim reproduktiven Klonen zu sehr hohen Risiken für Mutter und Kind führen würde. Inwiefern Epimutationen das Differenzierungspotenzial der Stammzelllinie SCNT-hES-1 beeinflussen, wird möglicherweise bald beschrieben.

7.2 Reproduktives Klonen von Tieren

Wahrscheinlich steigt die Zahl der Spezies, die durch Kerntransfer vermehrt werden können, in Zukunft noch weiter an. Insbesondere bei den Primaten sind Fragen offen. Durch die mittlerweile zur Verfügung stehende wachsende Population von Tieren aus Kerntransfer, insbesondere von Tieren mittleren oder hohen Alters, werden Studien über Langzeitfolgen des SCNT, über Fleisch-, Milch- und Eierqualität von Tieren aus SCNT und deren Nachzucht möglich. Zur Erhöhung der Effizienz des reproduktiven Klonens wird ein Fokus wissenschaftlicher Arbeit auf der

epigenetischen Reprogrammierung der Spenderzellkerne bzw. auf Epimutationen bei Kerntransferembryonen und lebensfähigen Tieren aus SCNT sowie deren Nachzucht liegen. Insgesamt stellt das reproduktive Klonen von Tieren ein einzigartig komplexes und funktionierendes Testsystem für die Erforschung der epigenetischen Programmierung von Genen dar (Reik et al., 2003). Es ermöglicht Grundlagenforschung, die über das Bestimmen von Gensequenzen hinaus den nächsten logischen Schritt, den der funktionellen Genomanalyse, wagt.

7.3 Mögliche Relativierung der postulierten Notwendigkeit des therapeutischen Klonens

Das therapeutische Klonen beim Menschen wird wahrscheinlich aufgrund der niedrigen Gesamteffizienz zugunsten von folgenden Konzepten in den Hintergrund treten:

- » Therapie mit allogenen, embryonalen Stammzellen und Zusammenfassung der Linien in Stammzellbanken, die immunologisch große Teile der Bevölkerung abdecken (Winnacker, 2003)
- » Therapie mit differenzierten autologen, adulten Stammzellen (Joshi and Enver, 2002)
- » Therapie mit transdifferenzierten autologen, adulten Stammzellen bzw. autologen, somatischen Zellen.

Der Beweis, dass humane embryonale Stammzellen, ähnlich wie murine embryonale Stammzellen, *in vitro* zu Oozyten (Hubner et al., 2003) heranreifen können, steht noch aus. Die Bewertung des therapeutischen Klonens könnte sich mit der Erschließung dieser alternativen Quelle für menschliche Eizellen verändern. Darüber hinaus würde das Potenzial humaner Stammzellen, *in vitro* zu weiblichen wie männlichen Keimzellen zu differenzieren, den moralischen Status von Stammzellen neu definieren.

Klonen durch Zellkerntransfer Stand der Forschung

Literaturlauswertung im Auftrag
des Nationalen Ethikrates

Tabellen

Effizienz des reproduktiven Klonens mittels Kerntransfer von somatischen Zellkernen bei verschiedenen Säugetierspezies (modifiziert nach Shi et al., 2003)

Spezies	Spenderzelle	Morulae oder Blastozysten per fusionierte oder injizierte Eizelle	Nachkommen per transferierte Embryonen	Referenz
Rind	Kumulus Zellen	18/47 (38%)	5/6 (83%)	Kato et al., 1998 ¹
	Ovidukt Zellen	20/94 (21%)	3/4 (75%)	Kato et al., 1998
	Granulosa Zellen	383/552 (69%)	10/100 (10%)	Wells et al., 1999
	Euterepithel Zellen	36/140 (26%)	1/4 (25%)	Zakhartchenko et al., 1999
		48/149 (32%)	2/45 (4%)	Kishi et al., 2000
	Fetale Fibroblasten	24/92 (26%)	7/8 (87%)	Urakawa et al., 2001 ¹
	Hautzellen vom Ohr Kalb	n.b. (n.b.)	1/6 (17%)	Renard et al., 1999 ²
	Hautzellen vom Ohr Kuh	49/82 (60%)	1/16 (6%)	Zakhartchenko et al., 1999
		80/197 (41%)	2/43 (5%)	Kishi et al., 2000
	Adulte Fibroblasten	131/440 (30%)	6/54 (11%)	Kubota et al., 2000 ³
	Adulte, fetale und neonatale Zellen	980/2529 (39%)	24/172 (14%)	Kato et al., 2000 ⁴
	Primordiale Keimzellen	n.b.	17/394 ⁵ (4%)	Forsberg et al., 2002
	Adulte, mesenchymale Stammzellen aus Knochenmark	67/274 (24%)	1/13 (8%)	Kato et al., 2004
	Transgene fetale Fibroblasten	33/276 (12%) 87/1896 (5%) 205/1041 (20%)	4/28 (14%) 6/79 (8%) n.b. (n.b.)	Cibelli et al., 1998 Lanza et al., 2000 Kuroiwa et al., 2002
		n.b. 89/198 (45%)	24/126 (19%) 4/20 (20%) ⁶	Brophy et al., 2003 Chen et al., 2002
Transgene, reklonierte fetale Fibroblasten	82/482 (17%)	6/61 (10%)	Kuroiwa et al., 2002	
Transgene fetale Fibroblasten (Go)	324/508 (64%)	15/102 (15%)	Wells et al., 2003	
Transgene fetale Fibroblasten (G1)	42/128 (33%)	9/24 (38%)	Wells et al., 2003	
Effizienz		5 – 69%	4 – 87%	
Schaf	Euterepithel Zellen	29/227 (13%)	1/29 (3%)	Wilmut et al., 1997
	Transgene fetale Fibroblasten	42/201 (21%) 80/417 (19%)	3/40 (8%) 14/80 (18%)	Schnieke et al., 1997 McCreath et al., 2000
		141/845 (17%)	7/120 (6%)	Denning et al., 2001
Effizienz		13 – 21%	3-18%	
Ziege	Granulosa Zellen	n.b. (n.b.)	2/54 (4%)	Keefer et al., 2002
	Fetale Fibroblasten	n.b. (n.b.) n.b. (n.b.)	2/20 (10%) 7/91 (8%)	Behboodi et al., 2001 Keefer et al., 2002
	Transgene fetale Fibroblasten	89 ⁷ /125 (71%)	3/67 (5%)	Baguisi et al., 1999

¹ Aktuell die höchste Effizienz des Klonens; Empfängeroozyten wurden Japanischen Fleischrindern entnommen;

² Kernspendertier stammte selbst aus Kerntransfer mit embryonalen Zellen;

³ Kernspenderbulle war 17 Jahre alt;

⁴ Adulte Zellen: Kumulus, Ovidukt, Uterus, Haut, Ohr, Herz, Leber, Niere; Zellen von Neugeborenen: Haut, Ohr, Herz, Muskel, Uterus, Leber, Niere, Lunge, Euter, Hoden, Nebenhoden; Fetale Zellen: Haut, Niere, Darm, Muskel, Zunge;

⁵ doppelte Anzahl der Embryotransfers, da generell zwei Embryonen pro Empfängertier eingesetzt wurden;

Effizienz des reproduktiven Klonens mittels Kerntransfer von somatischen Zellkernen bei verschiedenen Säugetierspezies (modifiziert nach Shi et al., 2003)

Spezies	Spenderzelle	Morulae oder Blastozysten per fusionierte oder injizierte Eizelle	Nachkommen per transferierte Embryonen	Referenz	
Ziege	Fibroblasten	n.b. (n.b.)	1/27 (4%)	Keefer et al., 2001	
		225 ⁷ /396 (57%)	5/184 (3%)	Reggio et al., 2001	
Effizienz		52/125 (42%) 42 – 71%	5/38 (13%) 3 – 13%	Zou et al., 2002	
Schwein	Granulosa Zellen	n.b. (n.b.)	5/72 (7%)	Polejaeva et al., 2000	
		58 ⁷ /210 (28%)	1/110 (1%)	Onishi et al., 2000	
	Fetale Fibroblasten	25/108 (23%)	2/773 (0,26%)	Boquest et al., 2002	
		(1-5%)	1/46 (2%)	De Sousa et al., 2002	
	Transgene fetale Fibroblasten	41/279 (15%)	4/150 (3%)	Hoelker et al., 2004	
		53/557 (10%)	4/458 (0,9%)	Park et al., 2001	
	KO fetale Fibroblasten ⁸	n.b. (n.b.)	7/338 (2%)	Lai et al., 2002	
		n.b. (n.b.)	6/2513 (0,2%)	Dai et al., 2002	
	Doppelt KO fetale Fibroblasten	n.b. (n.b.)	5/n.b. (n.b.)	Phelps et al., 2003	
Effizienz		41/112 (37%) 1 – 37%	4/685 (0,6%) 0,6 – 7%	Lee et al., 2003	
Maus	Kumulus Zellen	1385/2468 (56%)	16/1385 (1%)	Wakayama et al., 1998	
	Fetale Ovar Zellen	108/191 (57%)	4/108 (4%)	Wakayama & Yanagimachi, 2001	
	Fetale Hoden Zellen	114/212 (54%)	2/112 (2%)	Wakayama & Yanagimachi, 2001	
	Unreife Sertoli Zellen	210/646 (33%)	7/215 (3%)	Ogura et al., 2000a	
	Fetale Fibroblasten	278/932 (30%)	5/272 (2%)	Ono et al., 2001	
	Schwanzspitzen-Fibroblasten	341/633 (54%)	3/x (0,5%)	Wakayama & Yanagimachi, 1999	
	Transgene Schwanzspitzen-Fibroblasten	281/832 (34%)	8/301 (3%)	Ogura et al., 2000b	
	Fetals Hirnzellen aus gesamter Hirnrinde	32/91 (35%)	5/32 (16%)	Yamazaki et al., 2001	
	Effizienz		30 – 59%	0,5 – 16%	
	Kaninchen	Kumulus Zellen	371 ⁷ /612 (61%)	6/371 (2%)	Chesne et al., 2002
Follikel Zellen		100 ⁷ /176 (57%)	1/87 (1%)	Challah-Jacques et al., 2003	
Effizienz		57 – 61%	1 – 2%		
Katze	Kumulus Zellen	n.b. (n.b.)	1/87 (1%)	Shin et al., 2002	
Muli	Fetale Fibroblasten	113/120 ¹⁰ (94%)	1 ¹¹ /113 (1%)	Woods et al., 2003	
Pferd	Hautzellen	22/841 (3%)	1/17 (6%)	Galli et al., 2003	
Ratte	Fetale Fibroblasten	n.b. (n.b.)	3/129 (2%)	Zhou et al., 2003	

⁶ Die Blastozysten wurden am Tag 6 biopsiert (Entnahme von ¼ des Embryos), um die Expression des Transgenes zu testen; exprimierende Embryonen, die am Tag 7 wieder ein Blastocoel gebildet hatten, wurden in Empfängertiere eingesetzt;

⁷ 2-bis-4-Zell-Embryonen;

⁸ Knock-out (KO) bedeutet das Ausschalten eines Allels eines funktionellen Gens;

⁹ Intrazytoplasmatische Ganz-Zell-Mikroinjektion;

¹⁰ Anzahl der transferierten Embryonen, keine Angaben zum embryonalen Stadium;

¹¹ Zwei weitere Trächtigkeiten (Tag 255 & 310) standen zur Drucklegung noch aus

Tabelle 1, Teil 1

Tabelle 1, Teil 2

Gesundheitsprofil von Nachkommen aus SCNT

Tabelle II, Teil 1

Spezies	Lebensfähige Tiere / lebend geborene Tiere (%)	Komplikationen bis 7 Tage nach der Geburt	Spätere Erkrankungen, die mit SCNT in Zusammenhang gebracht werden	Fruchtbare Tiere aus SCNT	Zeitraum der Beobachtung	Referenz
Rind	4/8 (50%)	1x Schweregeburt; 1x Pneumonie; 2x Ersticken durch Aspiration von Fruchtwasser	–	–	2-4 Monate	¹
	10/10 (100%)	–	–	–	4 Wochen	²
	1/2 (50%)	1x leicht erhöhtes Geburtsgewicht; Arthrogrypose in Verbindung mit einer Verkürzung der Röhrenknochen, Gliedmaßenrotation distal, Deformierung von Maxilla und Mandibula, Induration der Leber;	–	1 von 1 gesamten Färsen	6 Jahre	³
	3/4 (75%)	1x Verbluten durch Hämorrhagie der A. umbilicalis;	–	–	–	⁴
	7/7 (100%)	–	–	–	–	⁵
	1/1 (100%)	1x Dilatation der rechten Herzkammer, nach Therapie Rückbildung innerhalb einer Woche;	1x Tod mit 7 Wochen durch Anämie, Hypoplasie von Thymus und Lymphknoten;	–	–	7 Wochen

¹ Kato et al., 1998² Wells et al., 1999³ Zakharochenko et al., 1999⁴ Kishi et al., 2000⁵ Urakawa et al., 2001⁶ Renard et al., 1999

Gesundheitsprofil von Nachkommen aus SCNT

Tabelle II, Teil 2

Spezies	Lebensfähige Tiere / lebend geborene Tiere (%)	Komplikationen bis 7 Tage nach der Geburt	Spätere Erkrankungen, die mit SCNT in Zusammenhang gebracht werden	Fruchtbare Tiere aus SCNT	Zeitraum der Beobachtung	Referenz
Rind	4/6 (66%)	1x Schweregeburt; 1x virale Infektion; 2x Schweregeburt;	–	–	10-12 Monate	⁷
	14/24 (58%)	5x erhöhtes Geburtsgewicht; 6x Missbildungen an Nieren, Nacken oder den Gliedmaßen; 1x Eventration durch Fissura abdominalis; 1x Missbildung des Schädels; (Infektion mit Akabane-Virus)	1x Tod durch Septikämie (E. Coli)	–	2-12 Monate	⁸
	94/109 (88%)	3x multiples Organversagen; 2x vorzeitige Ablösung der Plazenta; 1x Atemnot durch Unreife der Lunge und Aspiration von Mekonium; 3x Verbluten durch Hämorrhagie der A. und V. umbilicalis; 3x Pneumonie;	1x chronischer Diarrhoe; 1x chronische Obstruktion; 1x angeborener Herzfehler; 1x Hydrozephalus; 1x Orthopädische Probleme; 1x Clostridieninfektion; 2x abosomale Ulcera; 1x Aufgasung; 1x Pyelonephritis, möglicherweise durch aufsteigende Infektion des Nabels;	22 von 22 gesamten Färsen	5-29 Monate	⁹
3/4 (75%)	1x Pulmonale Hypertension mit Rechtssherz dilatation, Ductus arteriosus persistens, Aneurysma der A. pulmonalis, A. umbilicalis und V. umbilicalis;	–	–	–	–	¹⁰

⁷ Kubota et al., 2000⁸ Kato et al., 2000⁹ Pace et al., 2002¹⁰ Cibelli et al., 1998

Gesundheitsprofil von Nachkommen aus SCNT

Tabelle I, Teil 3

Spezies	Lebensfähige Tiere / lebend geborene Tiere (%)	Komplikationen bis 7 Tage nach der Geburt	Spätere Erkrankungen, die mit SCNT in Zusammenhang gebracht werden	Fruchtbare Tiere aus SCNT	Zeitraum der Beobachtung	Referenz
Rind	6/6 (100%)	Insgesamt erhöhtes Geburtsgewicht sowie vereinzelt Bluthochdruck im Lungenkreislauf und Atemnot;	In den ersten 2 Monaten vereinzelt Polyurie und Polydipsie; Mit 4 Monaten Fieber nach Impfung;	–	12 Monate	¹¹
	4/6 (66%)	–	–	–	–	¹²
	11/11 (100%)	1x erhöhtes Geburtsgewicht	–	–	20-26 Monate	¹³
	10/11 (90%)	Insgesamt Ursachen für Mortalität: Schweregeburten, Frakturen der Wirbelsäule, Innere Hämorrhagien, Atemnot, Nabelinfektionen, akute Enteritiden und chronische Lungeninfektionen;	–	–	–	¹⁴
	33/55 (60%)	–	–	–	–	¹⁵
Schaf	1/1 (100%)	Arthrogrypose	–	–	–	¹⁶
	107/167 (64%)	Vergrößerung von Umbilicus, Nabelgefäßen Nabelinfektionen	–	–	1-25 Monate	¹⁷
	3/4 (75%) darunter das Schaf „Dolly“	1x Schwäche	–	1 von 1 angepaarten Schafen	6 Jahre	^{18,19}

¹¹ Lanza et al., 2000
¹² Kuroiwa et al., 2002
¹³ Brophy et al., 2003
¹⁴ Chen et al., 2002
¹⁵ Wells et al., 2003
¹⁶ Kato et al., 2004
¹⁷ deLegge et al., 2004
¹⁸ Wilmut et al., 1997
¹⁹ Rhind et al., 2004

Gesundheitsprofil von Nachkommen aus SCNT

Tabelle II, Teil 4

Spezies	Lebensfähige Tiere / lebend geborene Tiere (%)	Komplikationen bis 7 Tage nach der Geburt	Spätere Erkrankungen, die mit SCNT in Zusammenhang gebracht werden	Fruchtbare Tiere aus SCNT	Zeitraum der Beobachtung	Referenz
Schaf	6/7 (85%)	2x Schweregeburten; 1x Ersticken durch Aspiration von Mekonium;	1x angeborener Herzfehler;	–	–	²⁰
	6/14 (42%)	Insgesamt Ursachen für Mortalität: Missbildungen von Niere (Dilatation des Nierenbeckens), Leber und Hirn;	–	–	6 Monate	²¹
	7/48 (15%) 1/3 (33%)	– Bei 2 lebend geborenen & 5 tot geborenen Feten: 1x erhöhtes Geburtsgewicht 4x Eventration 3x Überbiss; Kontraktur der Beugesehnen oder Torsion des Tarsalgelenkes 7x Nierenmissbildungen wie Hydronephrose mit Dilatation des Nierenbeckens oder mikroskopische und makroskopische Nierenzysten oder Desorganisation des Nierenmarks 4x Lungenmissbildungen wie Fibrosierung von Lungengefäßen 3x Lebermissbildungen wie Fehlen von Gallengängen mit Billrubinstasis	4x erhöhte ACTH-Spiegel 1x erhöhtes Geburtsgewicht mit Missbildungen an Niere, Lunge, Herz und Leber mit Todesfolge am Tag 14 post partum	–	4 Wochen 2 Wochen	²² ^{23,24}

²⁰ Schmieke et al., 1997
²¹ McCreath et al., 2000
²² Edwards et al., 2002
²³ Denning et al., 2001
²⁴ Rhind et al., 2003

Gesundheitsprofil von Nachkommen aus SCNT

Tabelle I, Teil 5

Spezies	Lebensfähige Tiere / lebend geborene Tiere (%)	Komplikationen bis 7 Tage nach der Geburt	Spätere Erkrankungen, die mit SCNT in Zusammenhang gebracht werden	Fruchtbare Tiere aus SCNT	Zeitraum der Beobachtung	Referenz
Ziege	7/9 (77%)	-	-	-	1 Jahr	²⁵
	3/3 (100%)	-	-	-	3 Jahre	²⁶
	5/6 (83%)	1x Pneumonie	2x Pneumonie	-	1 Jahr	²⁷
	5/5 (100%)	-	-	-	1 Jahr	²⁸
	5/5 (100%)	3x verringertes Geburtsgewicht (bei Drillingsen) 5x verringertes Geburtsgewicht	-	-	-	²⁹
Schwein	5/5 (100%)	-	-	-	9 Monate	³⁰
	1/1 (100%)	1x Ersticken durch Aspiration von Erbrochenem	2x Dilatative Cardiomyopathie mit Todesfolge bei einem Schwein am Tag 17	-	7 Wochen	³¹
	1/2 (50%)	4x Kontraktur der Beugesehne 1x verschlossener Gehörgang 2x Unreife der Frucht	-	-	6 Monate	³²
	4/7 (57%)	1x Gaumenspalte mit Tod durch <i>respiratory distress syndrome</i> kurz nach der Geburt 1x erhöhtes Geburtsgewicht 2x Dilatative Cardiomyopathie	-	-	>3 Wochen	³³

²⁵ Keefer et al., 2002
²⁶ Baguisi et al., 1999
²⁷ Keefer et al., 2001
²⁸ Reggio et al., 2001
²⁹ Zou et al., 2002
³⁰ Poljejaeva et al., 2000
³¹ Onishi et al., 2000
³² Boquest et al., 2002
³³ Lai et al., 2002

Gesundheitsprofil von Nachkommen aus SCNT

Tabelle II, Teil 6

Spezies	Lebensfähige Tiere / lebend geborene Tiere (%)	Komplikationen bis 7 Tage nach der Geburt	Spätere Erkrankungen, die mit SCNT in Zusammenhang gebracht werden	Fruchtbare Tiere aus SCNT	Zeitraum der Beobachtung	Referenz
Schwein	3/4 (100%)	1x Missbildung der Wirbelsäule mit Infektion	<i>Adult clone sudden death syndrome</i> 3x plötzlicher Tod durch akutes Herzversagen mit 5 bis 6 Monaten	-	6 Monate	³⁴
	37/37 (100%)	12x verringertes Geburtsgewicht 6x Kontraktur der Beugesehnen außerdem verkürzte Kiefer und Leydigzellhypoplasie bei Ebern	23x Plötzliches Verenden innerhalb der ersten 8 Lebenswochen durch 7x Cerebromeningitis (Neutrophile Entzündung der Temporallappen mit Veränderungen der Blut-Hirn-Schranke) 3x Blutstau in Lunge und Leber	-	>2 Monate	³⁵
	1/1 (100%)	-	-	-	-	³⁶
	5/5 (100%)	1x leichte Kontraktur der Beugesehne 2x Tod durch Atemnot	2x Rechtsherzdilatation und Verdickung des Herzseptums	-	-	³⁷
	4/7 (57%)	1x verringertes Geburtsgewicht 1x Missbildungen an Zunge und Niere	-	-	-	³⁸

³⁴ Pearson, 2003
³⁵ Park et al., 2004 (Hauptaugenmerk der Untersuchungen liegt auf männlichen Nachkommen)
³⁶ De Sousa et al., 2002
³⁷ Park et al., 2001
³⁸ Lai et al., 2002
³⁹ Dai et al., 2002
⁴⁰ Phelps et al., 2003

Gesundheitsprofil von Nachkommen aus SCNT

Tabelle II, Teil 7

Spezies	Lebensfähige Tiere / lebend geborene Tiere (%)	Komplikationen bis 7 Tage nach der Geburt	Spätere Erkrankungen, die mit SCNT in Zusammenhang gebracht werden	Fruchtbare Tiere aus SCNT	Zeitraum der Beobachtung	Referenz
Schwein	8/10 (80%)	1x Septikämie; 1x Kontraktur der Beugesehne; 1x Polydactylie; 1x verringertes Geburtsgewicht, Schwäche durch angeborenen Herzfehler; 1x verringertes Geburtsgewicht	1x angeborener Herzfehler; 1x chronische bakterielle Infektion, 1x chronische Diarrhoe; 1x orthopädisches Problem;	–	>5 Monate	⁴¹
	2/3 (66%)	–	–	2 trächtig im letzten Drittel der Trächtigkeit	>12 Monate	⁴²
Maus	23/31 (74%)	–	–	11 von 23 angepaarten Mäuse	>1 Jahr	⁴³
	79/80 (99%)	–	–	Alle angepaarten Mäuse	>3 Monate	⁴⁴
	16/16 (100%)	1x Hernia umbilicalis	–	7 von 12 angepaarten Mäusen	>3 Monate	⁴⁵
	23/27 (85%)	1x Nicht gesäugt worden	–	23 von 23 angepaarten Mäusen	>3 Monate	⁴⁶

⁴¹ Carter et al., 2002⁴² Hoelker et al., 2004⁴³ Wakayama et al., 1998⁴⁴ Wakayama und Yanagimachi, 2001⁴⁵ Ogura et al., 2000a⁴⁶ Ono et al., 2001

Gesundheitsprofil von Nachkommen aus SCNT

Tabelle II, Teil 8

Spezies	Lebensfähige Tiere / lebend geborene Tiere (%)	Komplikationen bis 7 Tage nach der Geburt	Spätere Erkrankungen, die mit SCNT in Zusammenhang gebracht werden	Fruchtbare Tiere aus SCNT	Zeitraum der Beobachtung	Referenz
Maus	1/3 (33%)	2x Tod durch Atemnot	–	–	>3 Monate	⁴⁷
	8/8 (100%)	–	–	2 von 2 angepaarten Mäusen	>3 Monate	⁴⁸
Maus	–	–	Fettleibigkeit ab 8-10 Wochen, gleichzeitig erhöhte Insulin- und Leptinpiegel; veränderter Stoffwechsel ist nicht auf nächste Generation übertragbar;	Alle angepaarten Mäuse	12-14 Monate	⁴⁹
	147/157 (93%)	2x Hernia umbilicalis; 6x Atemnot; 1x retardierte Entwicklung; 1x Anämie;	Pneumonie; Leberschäden; Fettleibigkeit in Abhängigkeit von genetischem Hintergrund (Agouti-Gen); Verkürzung der 50% Überlebenszeit normalgewichtiger Mäuse von 1028 auf 550 Tage	Alle angepaarten Mäuse	3 Jahre	⁵⁰
	5/5 (100%)	–	–	5 von 5 angepaarten Mäusen	>3 Monate	⁵¹

⁴⁷ Wakayama und Yanagimachi, 1999⁴⁸ Ogura et al., 2000b⁴⁹ Tamashiro et al., 2002⁵⁰ Ogura et al., 2002⁵¹ Yamazaki et al., 2001

Gesundheitsprofil von Nachkommen aus SCNT

Spezies	Lebensfähige Tiere / lebend geborene Tiere (%)	Komplikationen bis 7 Tage nach der Geburt	Spätere Erkrankungen, die mit SCNT in Zusammenhang gebracht werden	Fruchtbare Tiere aus SCNT	Zeitraum der Beobachtung	Referenz
Kaninchen	4/6 (66%)	1x Nicht gesäugt worden	-	4 von 4 angepaarten Kaninchen	1 Jahr	⁵²
Katze	1/1 (100%)	-	-	1 von 1	>5 Monate	⁵³
Muli	1/1 (100%)	-	-	-	-	⁵⁴
Pferd	3/3 (100%)	-	-	-	4 Monate	⁵⁵
Ratte	3/3 (100%)	1x Tod eines normalgewichtigen Jungen innerhalb einiger Stunden	-	4 von 4 angepaarten Ratten	6 Monate >4 Monate	^{56, 57} ⁵⁸

-: nicht beschrieben;
 Lebensfähig: Tiere, die die ersten 7 Lebenstage überleben;
 Fruchtbare: Tiere, die mindestens eine Trächtigkeit erfolgreich abgeschlossen haben;
 A.: Arteria;
 V.: Vena

Tabelle II, Teil 9

⁵² Chesne et al., 2002
⁵³ Challah-Jacques et al., 2003
⁵⁴ Shin et al., 2002
⁵⁵ Woods et al., 2003
⁵⁶ Galli et al., 2003
⁵⁷ www.uidaho.edu/cloning/news/Clone_health.htm; October 2003
⁵⁸ Zhou et al., 2003

Auswahl von Faktoren, welche die Effizienz von SCNT beeinflussen

Faktor	Optionen	Spezies	S.	Referenz
Dauer der <i>In-vitro</i> -Kultur von Spenderzellen vor NT	< 10 Passagen 10-15 Passagen > 15 Passagen Immortalisierte Linie	Rind	IV	(Miyoshi et al., 2003); (Shi et al., 2003a)
Zellzyklusstadium der Spenderzelle bei NT	Abhängig vom Zelltyp der Spenderzelle	Rind	IV	(Wells et al., 2003a)
Stimulus zum Stopp des Zellzyklus der Spenderzelle	Medium mit niedrigem Serumanteil oder Roscovitine-Zusatz	Rind	IV	(Gibbons et al., 2002)
Vorauswahl der Spenderzellen	Molekularbiologische Methoden (Southern Blot, FISH)	Rind, Ziege	IV	(Destremes et al., 2003)
Vorauswahl der Spenderzellen	Morphologische Auswertung	Rind	II	(Cho et al., 2003)
Aktivierung der Eizelle	Physikalischer oder chemischer Stimulus	Rind	I	(Bormann et al., 2003)
Aktivierung der Eizelle	Unterschiedliche chemische Stimuli	Rind	II	(Rho et al., 2003)
Entkernen der Eizelle	UV-Licht und Färbung oder polarisiertes Licht	Ziege	III	(Gavin et al., 2003)
Entkernen der Eizelle	Vor oder nach der Fusion mit dem Spenderzellkern	Schaf	II	(Peura et al., 2003)
Behandlung der injizierten Eizelle vor der Fusion	Zusatz von Lektin (agglutinationsfördernd)	Rind	II	(Du et al., 2003)
Fusion und Aktivierung	Unterschiedliches Timing	Rind	III	(Akagi et al., 2003)
Behandlung der Embryonen in Kultur	Zusatz von Apoptoseinhibitoren	n.b.	II	(Hwang et al., 2003)
Behandlung der Embryonen in Kultur	Einhüllen in Natrium-Alginat	Schwein	IV	(Iwamoto et al., 2003)
Embryotransfer	Kotransfer mit Blastozysten aus Parthenogenese	Rind	IV	(Kobayashi et al., 2003)
Behandlung frühreifer, lebensschwacher Nachkommen aus SCNT	Hormonbehandlung des Empfängertieres oder des Neugeborenen	Rind	IV	(Schmidt et al., 2003)

S.: Stadium;
 Stadium I: Untersuchungen an parthenogenetisch aktivierten Embryonen;
 Stadium II: SCNT bis zur Embryonenkultur in Morula oder Blastozystenstadium;
 Stadium III: SCNT inklusive Embryotransfer in Empfängertiere;
 Stadium IV: SCNT bis zur Geburt von Nachkommen;
 n.b.: nicht beschrieben

Tabelle III

Abkürzungsverzeichnis

5-aza-dC	<i>5-aza-2'-deoxycytidine</i>
6-DMAP	6-Dimethylaminopurin
Abs.	Absatz
ACTH	Adenocorticotropes Hormon
Art.	Artikel
bp	Basenpaare
BSE	Bovine Spongiforme Enzephalopathie
BT-Drs.	Bundestagsdrucksache
CpG	<i>cytosine-guanin dinucleotide</i>
CSF	<i>cytostatic factor</i>
CT	Chromatin-Transfer
DE	differenzierte embryonale Zellen
DMR	<i>differentially methylated regions</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>deoxyribonucleic acid</i>)
Dnmt	DNA-Methyltransferasen
EB	<i>embryoid bodies</i>
ECNT	<i>embryonic cell nuclear transfer</i>
ES-Zellen	embryonale Stammzellen
ESchG	Embryonenschutzgesetz
ESCNT	<i>embryonic stem cell nuclear transfer</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FISH	Fluoreszenz- <i>in-situ</i> -Hybridisierung
GG	Grundgesetz
H1, H2A, H2B,	
H3, H4	Histonproteine 1, 2A, 2B, 3 und 4
HAR	Hyperakute Abstoßungsreaktion
hES	humane embryonale Stammzellen
hmSOFaa	<i>human serum oviductal fluid with amino acids</i>
ICM	<i>inner cell mass</i>
IVF	<i>In-vitro</i> -Fertilisation
LOS	<i>large offspring syndrome</i>
MHC	<i>major histocompatibility complex</i>
miHA	<i>minor histocompatibility antigene</i>
MPF	M-Phase-Förderfaktor
mt DNA	mitochondriale DNA
NEBD	<i>nuclear envelope breakdown</i>
NT	Nukleus-Transfer (<i>nuclear transfer</i>)
PCC	<i>premature chromatin condensation</i>
PrP ^{sc} bzw. ^{sc}	<i>proteinase resistant protein (cellular bzw. scrapie)</i>
SCNT	<i>somatic cell nuclear transfer</i>
T4	Thyroxin
TBS	<i>TATA-binding-Protein</i>
TierSchG	Tierschutzgesetz
TSA	Trichostatin A
TSE	Transmissible Spongiforme Enzephalopathie
Xa	Aktives X-Chromosom
Xi	Inaktives X-Chromosom
Xist	<i>X inactive specific transcript</i>
ZP	<i>Zona pellucida</i>

Glossar

A^{IAP}	Allel mit <i>intracisternal A particles</i> , retroviralen Elementen, die im Agouti-Gen von Mäusen auftreten können
Allele	Ausprägungen eines Gens, die auf homologen Chromosomen am gleichen Genort lokalisiert sind
Chimären	Organismus, der sich aus einem Mosaik von mindestens zwei genetisch unterschiedlichen Zelltypen zusammensetzt
Chorea Huntington	„Veitstanz“, Extrapyramidales Syndrom mit Hyperkinesen und allgemeiner Hypotonie der Muskulatur
Euploidie	Bezeichnung für einen artspezifischen, vollständigen Chromosomensatz
Feeder-Zellen	Ammenzellen
GABA	Gammaaminobuttersäure (-acid), wichtigster inhibitorischer Neurotransmitter im ZNS
Gen	Spezifikationen
<i>Grb10</i>	GeneID: 14783, alias Meg1, Maus, <i>growth factor receptor bound protein 10</i>
<i>Gtl2</i>	GeneID: 17263, alias Meg3, Maus
<i>Mest</i>	GeneID: 17294, alias Peg1, Maus
<i>Nnat</i>	GeneID: 18111, alias Peg5, Maus, <i>neuronatin</i>
<i>Dlk1</i>	GeneID: 13386, alias Peg9, Maus, <i>delta-like homolog</i>
<i>Slc22a1</i>	GeneID: 18400, alias Slc22a18, Maus, <i>solute carrier family 22</i>
<i>Uzafi-rs1</i>	GeneID: 22183, alias SP2, Maus, <i>U2 small nuclear ribonucleoprotein auxiliary factor 1 related sequence 1</i>
<i>Sgce</i>	GeneID: 20392, Maus, <i>sarcoglycan epsilon</i>
<i>Cdkn1c (p57)</i>	GeneID: 12577, alias P57 ^{kip2} , Maus, <i>cyclin-dependent kinase inhibitor 1C</i>
<i>Oct4</i>	GeneID: 18999, alias Pou5f1, Maus, <i>Pou domain, class 5, transcription factor 1</i>
<i>H19</i>	GeneID: 14955, Maus
<i>Igf2</i>	GeneID: 16002, Maus, <i>insulin-like growth factor 2</i>
<i>Igf2r</i>	GeneID: 16004, Maus, <i>insulin-like growth factor 2 receptor/</i> GeneID: 281849, Rind, <i>insulin-like growth factor 2 receptor</i>
Go/G1 Phase	Postmitotische Ruhephasen des Zellzyklus: diploide Interphase (Vorliegen einzelner Chromatiden) mit kontinuierlicher Erhöhung der RNA und Proteinsynthese; Eine G1-Phase ohne nachfolgende S-Phase wird als Go-Phase bezeichnet
Hämatopoietisch	Involviert in die Blutbildung
Homöostase	Konstanz bzw. Aufrechterhaltung des inneren Körpermilieus
In vitro	Im (Reagenz-) Glas d.h. außerhalb des Organismus
In vivo	In einem lebendigen Organismus
Karyotyp	Anzahl und Form der im Zellkern vorhandenen Chromosomen
Keimbahnzellen	Alle Zellen, die in einer Zelllinie von der befruchteten Eizelle bis hin zu den Ei- und Samenzellen des aus ihr hervorgegangenen Lebewesens führen
Kryokonservierung	Bei -196°C erfolgende Kälte- oder Tiefgefrierkonservierung

Melanozyten	Zur Melanin- d.h. Pigmentbildung befähigte Zellen in der Basalschicht der Epidermis
Morbidität	Krankheitshäufigkeit: Verhältnis der Anzahl der Krankheitsfälle zur Gesamtpopulation
Mortalität	Sterblichkeitsrate: Verhältnis der Anzahl der Sterbefälle zur Gesamtpopulation
Multipaar	Tiere mit zwei oder mehr Nachkommen pro Trächtigkeit
Neonatal	Neugeboren
Phänotyp	Erscheinungsbild: Summe aller an einem Einzelwesen vorhandenen äußeren Merkmale und funktionellen Eigenschaften
Pluripotent	Fähigkeit, viele Zelltypen zu bilden
Pränatal	Vor der Geburt
S-Phase	Phase des Zellzyklus, in der die DNA verdoppelt wird
Satelliten DNA	ist gekennzeichnet durch die Anordnung vieler, relativ kleiner Sequenzmotive in Form von Tandem-Repetitionen, d.h. hintereinander liegenden Einheiten
Seneszenz	von <i>Senium</i> , lat. für Altersschwäche, beschreibt die Zellalterung. Normale Zellen haben <i>in vitro</i> ein endliches Schicksal. Die Lebensdauer von Fibroblasten <i>in vitro</i> beträgt z. B. 50 – 70 Mitosen. Die Zellalterung geht mit Veränderungen im Metabolismus der Zelle einher. Es kommt zu verlängerter Zellzyklusdauer und verminderter RNA- und Proteinsynthese.
Somatisch	Körperlich
Striatum	Kurzform für das <i>Corpus striatum</i> , Teil der basalen Stammganglien des Gehirns, bestehend aus <i>Putamen</i> , <i>Nucleus lentiformis</i> und <i>Nucleus caudatus</i>
Tarsalgelenk	Sprunggelenk
Totipotent	Fähigkeit, alle Zelltypen zu bilden
Transgen	Stabile Integration fremder DNA
Transient	Vorübergehend, kurz dauernd

Bibliographie

- Adam, D.** (2002). Clone pioneer calls for health tests. *Nature* 415: 103.
- Adams, A. M.;** Pratt, S. L.; Gibbons, J. R.; Arat, S.; Respass, D. S.; Stice, S. L. (2004). Production of a cloned calf using kidney cells obtained from a 48-hour cooled carcass. *Reproduction, Fertility and Development* 16 (No. 1 & 2): 133.
- Akagi, S.;** Adachi N.; Matsukawa, K.; Takahashi, S. (2003). Effect of timing of oocyte-cell fusion on developmental potential of bovine nuclear transfer embryos from cumulus cells. *Theriogenology* 59: 232.
- Alberio, R.;** Campbell, K. H. S. (2003). Inhibition of transcription in bovine fetal fibroblasts exposed to *Xenopus Laevis* egg extracts. *Theriogenology* 59: 318.
- Alexander, B.;** Perrault, S.; Peura, T.; Betts, D. H.; King, W. A. (2004). Assessment of telomere length in nuclear transfer derived sheep clones, their offspring, and control animals. *Reproduction, Fertility and Development* 16 (No. 1 & 2): 134.
- Arat, S.;** Rzucidlo, S. J.; Gibbons, J.; Miyoshi, K.; Stice, S. L. (2001). Production of transgenic bovine embryos by transfer of transfected granulosa cells into enucleated oocytes. *Molecular Reproduction and Development* 60: 20 – 26.
- Arat, S.;** Rzucidlo, S. J.; Stice, S. L. (2003). Gene expression and in vitro development of inter-species nuclear transfer embryos. *Molecular Reproduction and Development* 66: 334 – 342.
- Archer, G. S.;** Friend, T. H.; Piedrahita, J.; Nevill, C. H.; Walker, S. (2003). Behavioral variation among cloned pigs. *Applied Animal Behaviour Science* 81: 321 – 331.
- Azambuja, R.;** Fugger, E. F.; Schulman, J. D. (1996). Human egg activation, cryopreservation, and fertilization using a haploid pronucleus. *Human Reproduction* 11: 1990 – 1991.
- Baguisi, A.;** Behboodi, E.; Melican, D. T.; Pollock, J. S.; Destrepes, M. M.; Cammuso, C.; Williams, J. L.; Nims, S. D.; Porter, C. A.; Midura, P.; Palacios, M. J.; Ayres, S. L.; Denniston, R. S.; Hayes, M. L.; Ziomek, C. A.; Meade, H. M.; Godke, R. A.; Gavin, W. G.; Overstrom, E. W.; Echelard, Y. (1999). Production of goats by somatic cell nuclear transfer. *Nature Biotechnology* 17: 456 – 461.
- Barberi, T.;** Klivenyi, P.; Calingasan, N. Y.; Lee, H.; Kawamata, H.; Loonam, K.; Perrier, A. L.; Bruses, J.; Rubio, M. E.; Topf, N.; Tabar, V.; Harrison, N. L.; Beal, M. F.; Moore, M. A.; Studer, L. (2003). Neural subtype specification of fertilization and nuclear transfer embryonic stem cells and application in parkinsonian mice. *Nature Biotechnology* 21: 1200 – 1207.
- Behboodi, E.;** Ayres, S. L.; Memili, E.; O'Coin, M.; Chen, L. H.; Meade, H. M.; Echelard Y. (2004). Health and reproductive profiles of nuclear transfer goats producing the MSP1-42 malaria antigen. *Reproduction, Fertility and Development* 16 (No. 1 & 2): 137.
- Betts, D.;** Bordignon, V.; Hill, J.; Winger, Q.; Westhusin, W.; Smith, L.; King, W. (2001). Reprogramming of telomerase activity and rebuilding of telomere length in cloned cattle. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98: 1077 – 1082.
- Bjorklund, L. M.;** Sanchez-Pernaute, R.; Chung, S.; Andersson, T.; Chen, I. Y.; McNaught, K. S.; Brownell, A. L.; Jenkins, B. G.; Wahlestedt, C.; Kim, K. S.; Isacson, O. (2002). Embryonic stem cells develop into functional dopaminergic neurons after transplantation in a Parkinson rat model. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99: 2344 – 2349.
- Boiani, M.;** Eckart, S.; Scholer, H. R.; McLaughlin, K. J. (2002). Oct4 distribution and level in mouse clones: consequences for pluripotency. *Genes Development* 16: 1209 – 1219.
- Bormann, C. L.;** Enright, B. P.; Yang, X. (2003). Increased parthenogenetic development of bovine oocytes activated with a combined phosphorylation and protein synthesis inhibitor. *Theriogenology* 59: 471.
- Bortvin, A.;** Eggan, K.; Skaletsky, H.; Akutsu, H.; Berry, D. L.; Yanagimachi, R.; Page, D. C.; Jaenisch, R. (2003). Incomplete reactivation of Oct4-related genes in mouse embryos cloned from somatic nuclei. *Development* 130: 1673 – 1680.
- Bourc'his, D.;** Le Bourhis, D.; Patin, D.; Niveleau, A.; Comizzoli, P.; Renard, J.-P.; Viegas-Pequignot, E. (2001). Delayed and incomplete reprogramming of chromosome methylation patterns in bovine cloned embryos. *Current Biology* 11: 1542 – 1546.

- Brophy, B.;** Smolenski, G.; Wheeler, T.; Wells, D.; L'Huillier, P.; Laible, G. (2003). Cloned transgenic cattle produce milk with higher levels of beta-casein and kappa-casein. *Nature Biotechnology* 21: 157 – 162.
- Bueler, H.;** Aguzzi, A.; Sailer, A.; Greiner, R. A.; Autenried, P.; Aguet, M.; Weissmann, C. (1993). Mice devoid of PrP are resistant to scrapie. *Cell* 73: 1339 – 1347.
- Byrne, J. A.;** Simonsson, S.; Western, P. S.; Gurdon, J. B. (2003). Nuclei of adult mammalian somatic cells are directly reprogrammed to oct-4 stem cell gene expression by amphibian oocytes. *Current Biology* 13: 1206 – 1213.
- Campbell, K.** (1999 a). Nuclear equivalence, nuclear transfer, and the cell cycle. *Cloning* 1: 3 – 15.
- Campbell, K.** (1999 b). Nuclear transfer in farm animal species. *Seminars in Cell & Development Biology* 10: 245 – 252.
- Campbell, K.;** Loi, P.; Cappai, P.; Wilmut, I. (1994). Improved development to blastocyst of ovine nuclear transfer embryos reconstructed during the presumptive s-phase of enucleated activated oocytes. *Biology of Reproduction* 50: 1385 – 1393.
- Carter, D. B.;** Lai, L.; Park, K. W.; Samuel, M.; Lattimer, J. C.; Jordan, K. R.; Estes, D. M.; Besch-Williford, C.; Prather, R. S. (2002). Phenotyping of transgenic cloned piglets. *Cloning Stem Cells* 4 (No. 2): 131 – 145.
- Cezar, G. G.;** Bartolomei, M. S.; Forsberg, E. J.; First, N. L.; Bishop, M. D.; Eilertsen, K. J. (2003). Genome-wide epigenetic alterations in cloned bovine fetuses. *Biology of Reproduction* 68: 1009 – 1014.
- Challah-Jacques, M.;** Chesne, P.; Renard, J.-P. (2003). Production of cloned rabbits by somatic cell nuclear transfer. *Cloning & Stem Cells* 5 (No. 4): 295 – 299.
- Chan, A. W.;** Dominko, T.; Luetjens, C. M.; Neuber, E.; Martinovich, C.; Hewitson, L.; Simerly, C. R.; Schatten, G. P. (2000). Clonal propagation of primate offspring by embryo splitting. *Science* 287: 317 – 319.
- Chavatte-Palmer, P.;** Heyman, Y.; Richard, C.; Monget, P.; LeBourhis, D.; Kann, G.; Chilliard, Y.; Vignon, X.; Renard, J.-P. (2002). Clinical, hormonal, and hematologic characteristics of bovine calves derived from nuclei from somatic cells. *Biology of Reproduction* 66: 1596 – 1603.
- Chen, S. H.;** Vaught, T. D.; Monahan, J. A.; Boone, J.; Emslie, E.; Jobst, P. M.; Lamborn, A. E.; Schnieke, A.; Robertson, L.; Colman, A.; Dai, Y.; Polejaeva, I. A.; Ayares, D. L. (2002). Efficient production of transgenic cloned calves using preimplantation screening. *Biology of Reproduction* 67: 1488 – 1492.
- Chen, Y.;** He, Z. X.; Liu, A.; Wang, K.; Mao, W. W.; Chu, J. X.; Lu, Y.; Fang, Z. F.; Shi, Y. T.; Yang, Q. Z.; Chen, D. Y.; Wang, M. K.; Li, J. S.; Huang, S. L.; Kong, X. Y.; Shi, Y. Z.; Wang, Z. Q.; Xia, J. H.; Long, Z. G.; Xue, Z. G.; Ding, W. X.; Sheng, H. Z. (2003). Embryonic stem cells generated by nuclear transfer of human somatic nuclei into rabbit oocytes. *Cell Research* 13 (No. 4): 251 – 264.
- Chesne, P.;** Adenot, P. G.; Viglietta, C.; Baratte, M.; Boulanger, L.; Renard, J.-P. (2002). Cloned rabbits produced by nuclear transfer from adult somatic cells. *Nature Biotechnology* 20: 366 – 369.
- Cho, J. K.;** Bhuiyan, M. M. U.; Park, E. S.; Jang, G.; Chang, K. H.; Park, H. J.; Kang, S. K.; Lim, J. M.; Lee, B. C.; Hwang, W. S. (2003). Production of bovine transgenic cloned embryos using prourokinase-transfected somatic cells: effect of type and size of donor cells. *Theriogenology* 59: 242.
- Chung, Y. G.;** Ratnam, S.; Chaillet, J. R.; Latham, K. E. (2003). Abnormal regulation of DNA methyltransferase expression in cloned mouse embryos. *Biology of Reproduction* 69: 146 – 153.
- Cibelli, J. B.;** Grant, K. A.; Chapman, K. B.; Cunniff, K.; Worst, T.; Green, H. L.; Walker, S. J.; Gutin, P. H.; Vilner, L.; Tabar, V.; Dominko, T.; Kane, J.; Wettstein, P. J.; Lanza, P. R.; Studer, L.; Vrana, K. E.; West, M. D. (2002). Parthenogenetic stem cells in nonhuman primates. *Science* 295: 819.
- Cibelli, J. B.;** Kiessling, A. A.; Cunniff, K.; Richards, C.; Lanza, R.; West, M. (2001). Somatic cell nuclear transfer in humans: pronuclear and early embryonic development. *The Journal of Regenerative Medicine* 2: 25 – 31.
- Cibelli, J. B.;** Stice, S. L.; Golueke, P. J.; Kane, J. J.; Jerry, J.; Blackwell, C.; Ponce de Leon, F. A.; Robl, J. M. (1998). Cloned transgenic calves produced from nonquiescent fetal fibroblasts. *Science* 280: 1256 – 1258.
- Clark, A. J.** (1998). The mammary gland as a bioreactor: expression, processing, and production of recombinant proteins. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia* 3: 337 – 350.
- Colman, A.;** Kind, A. (2000). Therapeutic cloning: concepts and practicalities. *Trends in Biotechnology* 18: 192 – 196.
- Cyranoski, D.** (2003). Koreans rustle up madness-resistant cows. *Nature* 426: 743.
- Damiani, P.;** Wirtu, G.; Miller, F.; Cole, A.; Pope, C.; Godke, R. A.; Dressler, B. L. (2003). Development of giant eland antelope (*Taurotragus Derbianus*) embryos following nuclear transfer with common eland (*Taurotragus Oryx*) and bovine (*Bos Taurus*) oocytes. *Theriogenology* 59: 390.
- De Sousa, P. A.;** King, T.; Harkness, L.; Young, L. E.; Walker, S. K.; Wilmut, I. (2001). Evaluation of gestational deficiencies in cloned sheep fetuses and placentae. *Biology of Reproduction* 65: 23 – 30.
- Dean, W.;** Santos, F.; Stojkovic, M.; Zakhartchenko, V.; Walter, J.; Wolf, E.; Reik, W. (2001). Conservation of methylation reprogramming in mammalian development: aberrant reprogramming in cloned embryos. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98: 13734 – 13738.
- DeLegge, K.;** Maserati, M.; Kieser, N.; Delanski, D.; Henderson, B.; Dobbie, T.; Middour, J.; Balladares, J.; Page, R. (2004). Effect of genotype and cell line on the efficiency of live calf production by somatic cell nuclear transfer. *Reproduction, Fertility and Development* 16 (No. 1 & 2): 139 – 140.
- Denning, C.;** Burl, S.; Ainslie, A.; Bracken, J.; Dinnyes, A.; Fletcher, J.; King, T.; Ritchie, M.; Ritchie, W. A.; Rollo, M.; de Sousa, P.; Travers, A.; Wilmut, I.; Clark, A. J. (2001). Deletion of the alpha(1,3)galactosyl transferase (GGTA1) gene and the prion protein (PrP) gene in sheep. *Nature Biotechnology* 19: 559 – 562.
- Dennis, C.** (2003). Chinese fusion method promises fresh route to human stem cells. *Nature* 424: 711.
- Destrepes, M. M.;** Rapiejko, K. T.; Williams, J. L.; Chen, L. H.; Hayden, E.; Liem, H.; Picarella Stein, M.; Shen, M. F.; Meade, H. M.; Echelard, Y. (2003). Screening transgenic primary cell lines prior to use for somatic cell nuclear transfer. *Theriogenology* 59: 245.
- Dominko, T.;** Mitalipova, M.; Haley, B.; Beyhan, Z.; Memili, E.; McKusick, B.; First, N. L. (1999). Bovine oocyte cytoplasm supports development of embryos produced by nuclear transfer of somatic cell nuclei from various mammalian species. *Biology of Reproduction* 60: 1496 – 1502.
- Du, F.;** Sung, L.; Seon, B.; Xu, J.; Riesen, J. (2003). Lectin-cell agglutination agent improves the efficiency of bovine somatic cloning. *Theriogenology* 59: 247.
- Edwards, J. L.;** Schrick, F. N.; McCracken, M. D.; van Amstel, S. R.; Hopkins, F. M.; Welborn, W. G.; Davies, C. J. (2003). Cloning adult farm animals: a review of the possibilities and problems associated with somatic cell nuclear transfer. *American Journal of Reproductive Immunology* 50: 113 – 123.
- Edwards, L.;** Peura, T.; Hartwich, K.; Rudiger, S.; McMillen, I. C.; Walker, S. (2002). Postnatal growth and circulating ACTH and cortisol concentrations during the first month of life in cloned lambs. *Endocrinology* 143: 3699 – 3702.
- Eggan, K.;** Akutsu, H.; Hochedlinger, K.; Rideout, W. M., 3rd; Yanagimachi, R.; Jaenisch, R. (2000). X-Chromosome inactivation in cloned mouse embryos. *Science* 290: 1578 – 1581.
- Eggan, K.;** Akutsu, H.; Loring, J.; Jackson-Grusby, L.; Klemm, M.; Rideout, W. M., 3rd; Yanagimachi, R.; Jaenisch, R. (2001). Hybrid vigor, fetal overgrowth, and viability of mice derived by nuclear cloning and tetraploid embryo complementation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98: 6209 – 6214.
- Enright, B. P.;** Jeong, B. S.; Yang, X.; Tian, X. C. (2003 a). Epigenetic characteristics of bovine donor cells for nuclear transfer: levels of histone acetylation. *Biology of Reproduction* 69: 1525 – 1530.
- Enright, B. P.;** Kubota, C.; Yang, X.; Tian, X. C. (2003 b). Epigenetic characteristics and development of embryos cloned from donor cells treated by trichostatin A or 5-aza-2'-deoxycytidine. *Biology of Reproduction* 69: 896-901.
- Escriba, M. J.;** Valbuena, D.; Remohi, J.; Pellicer, A.; Simon, C. (2002). New techniques on embryo manipulation. *Journal of Reproductive Immunology* 55: 149 – 161.
- Evans, M. J.;** Gurer, C.; Loike, J. D.; Wilmut, I.; Schnieke, A. E.; Schon, E. A. (1999). Mitochondrial DNA genotypes in nuclear transfer-derived cloned sheep. *Nature Genetics* 23: 90 – 93.
- Evans, M. J.;** Kaufman, M. H. (1981). Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* 292: 154 – 156.
- Evers, M.** (2003). Klonen für die Katz. *Der Spiegel* 13: 190 – 192.
- Faber, D. C.;** Molina, J. A.; Ohlrichs, C. L.; Vander Zwaag, D. F.; Ferre, L. B. (2003). Commercialization of animal biotechnology. *Theriogenology* 59: 125 – 138.

- FDA** (2003). Animal cloning: A risk assessment draft executive summary. www.fda.gov/cvm/index/cloning/CLRAES.doc: 1 – 11.
- Fischer, L. K.;** Hermel, E.; Loveland, B. E.; Wang, C. R. (1991). Maternally transmitted antigen of mice: a model transplantation antigen. *Annual Review of Immunology* 9: 351 – 372.
- Forsberg, E. J.;** Strelchenko, N. S.; Augenstein, M. L.; Betthausen, J. M.; Childs, L. A.; Eilertsen, K. J.; Enos, J. M.; Forsythe, T. M.; Golueke, P. J.; Koppang, R. W.; Lange, G.; Lesmeister, T. L.; Mallon, K. S.; Mell, G. D.; Misica, P. M.; Pace, M. M.; Pfister-Genskow, M.; Voelker, G. R.; Watt, S. R.; Bishop, M. D. (2002). Production of cloned cattle from in vitro systems. *Biology of Reproduction* 67: 327 – 333.
- Galli, C.;** Lagutina, I.; Crotti, G.; Colleani, S.; Turini, P.; Ponderato, N.; Duchi, R.; Lazzari, G. (2003). Pregnancy: a cloned horse born to its dam twin. *Nature* 424: 635.
- Gavin, W.;** Butler, R.; Hawkins, N.; Chen, L. H.; Hayden, E.; Picarella, M.; Melican, D. (2003). Comparison of enucleation methods for the production of transgenic dairy goats by somatic cell nuclear transfer. *Theriogenology* 59: 254.
- Geijsen, N.;** Horoschak, M.; Kim, K.; Gribnau, J.; Eggan, K.; Daley, G. Q. (2004). Derivation of embryonic germ cells and male gametes from embryonic stem cells. *Nature* 427: 148 – 154.
- Gibbons, J.;** Arat, S.; Rzcuidlo, J.; Miyoshi, K.; Waltenburg, R.; Respass, D.; Venable, A.; Stice, S. (2002). Enhanced survivability of cloned calves derived from roscovitine-treated adult somatic cells. *Biology of Reproduction* 66: 895 – 900.
- Giles, J.;** Knight, J. (2003). Dolly's death leaves researchers woolly on clone ageing issue. *Nature* 421: 776.
- Gomez, M. C.;** Pope, C. E.; Giraldo, A. M.; Lyons, L.; Harris, R. F.; King, A.; Cole, A.; Godke, R. A.; Dresser, B. L. (2004). Birth of african wild cat cloned kittens. *Reproduction, Fertility and Development* 16 (No. 1 & 2): 141.
- Hamilton, H. M.;** Kleemann, D. O.; Maddocks, S.; Rudiger, S. R.; Walker, S. K.; Peura, T. T. (2003). In vitro development of cross-species nuclear transfer embryos constructed with ovine, bovine and porcine donor cells and ovine cytoplasts. *Theriogenology* 59: 255.
- Harley, C. B.;** Futcher, A. B.; Greider, C. W. (1990). Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. *Nature* 345: 458 – 460.
- Heyman, Y.;** Chavatte-Palmer, P.; LeBourhis, D.; Camous, S.; Vignon, X.; Renard, J.-P. (2002). Frequency and occurrence of late-gestation losses from cattle cloned embryos. *Biology of Reproduction* 66: 6 – 13.
- Hiendleder, S.;** Bebbere, D.; Hoeflich, A.; Bauersachs, S.; Reichenbach, H.-D.; Wenigerkind, H.; Stojkovic, M.; Elminger, M.; Ledda, S.; Wolf, E. (2004 a). Overgrowth of in vitro produced bovine fetuses is associated with perturbations in the IGF-system but is not caused by imprinting failure in the IGF locus. *Wiener Tierärztliche Monatsschrift* 91 (Supplement 2): 29.
- Hiendleder, S.;** Mund, C.; Reichenbach, H.-D.; Wenigerkind, H.; Brem, G.; Zakhartchenko, V.; Lyko, F.; Wolf, E. (2004 b). Global tissue-specific changes in methylation of DNA at cytosine residues are associated with an overgrowth phenotype of bovine fetuses derived by in vitro techniques. *Wiener Tierärztliche Monatsschrift* 91 (Supplement 2): 29 – 30.
- Hiendleder, S.;** Mund, C.; Reichenbach, H.-D.; Wenigerkind, H.; Brem, G.; Zakhartchenko, V.; Lyko, F.; Wolf, E. (2004 c). Tissue-specific elevated genomic cytosine methylation levels are associated with an overgrowth phenotype of bovine fetuses derived by in vitro techniques. *Biology of Reproduction*, DOI:10.1095/biolreprod.103.026062 – paper in press.
- Hiendleder, S.;** Prella, K.; Brüggerhoff, K.; Reichenbach, H.-D.; Wenigerkind, H.; Bebbere, D.; Stojkovic, M.; Müller, S.; Brem, G.; Zakhartchenko, V. (2004 d). Nuclear-cytoplasmic interactions affect in utero development capacity, phenotype, and cellular metabolism of bovine nuclear transfer fetuses. *Biology of Reproduction* 70 (No. 4): 1196 – 1205.
- Hiendleder, S.;** Schmutz, S. M.; Erhardt, G.; Green, R. D.; Plante, Y. (1999). Transmitochondrial differences and varying levels of heteroplasmy in nuclear transfer cloned cattle. *Molecular Reproduction and Development* 54: 24 – 31.
- Hill, J. R.;** Burghardt, R. C.; Jones, K.; Long, C. R.; Looney, C. R.; Shin, T.; Spencer, T. E.; Thompson, J. A.; Winger, Q. A.; Westhusin, M. E. (2000). Evidence for placental abnormality as the major cause of mortality in first-trimester somatic cell cloned bovine fetuses. *Biology of Reproduction* 63: 1787 – 1794.
- Hill, J. R.;** Roussel, A. J.; Cibelli, C. B.; Edwards, J. F.; Hooper, N. L.; Miller, M. W.; Thompson, J. A.; Looney, C. R.; Westhusin, M. E.; Robl, J. M.; Stice, S. L. (1999). Clinical and pathologic features of cloned transgenic calves and fetuses (13 case studies). *Theriogenology* 51: 1451 – 1465.
- Hill, J. R.;** Schlafer, D. H.; Fisher, P. J.; Davies, C. J. (2002). Abnormal expression of trophoblast major histocompatibility complex class I antigens in cloned bovine pregnancies is associated with a pronounced endometrial lymphocytic response. *Biology of Reproduction* 67: 55 – 63.
- Hochedlinger, K.;** Jaenisch, R. (2003). Nuclear transplantation, embryonic stem cells, and the potential for cell therapy. *The New England Journal of Medicine* 349: 275 – 286.
- Hogan, B.;** Beddington, R.; Constantini, F.; Lacy, E. (1994). Manipulating the mouse embryo – a laboratory manual: 265 – 272.
- Holden, C.** (2002). Primate Parthenotes yield stem cells. *Science* 295: 779 – 780.
- Hubner, K.;** Fuhrmann, G.; Christenson, L. K.; Kehler, J.; Reinbold, R.; De La, F. R.; Wood, J.; Strauss, J. F., 3rd; Boiani, M.; Scholer, H. R. (2003). Derivation of oocytes from mouse embryonic stem cells. *Science* 300: 1251 – 1256.
- Humpherys, D.;** Eggan, K.; Akutsu, H.; Friedman, A.; Hochedlinger, K.; Yanagimachi, R.; Lander, E. S.; Golub, T. R.; Jaenisch, R. (2002). Abnormal gene expression in cloned mice derived from embryonic stem cell and cumulus cell nuclei. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99: 12889 – 12894.
- Humpherys, D.;** Eggan, K.; Akutsu, H.; Hochedlinger, K.; Rideout, W. M., 3rd; Biniszkiwicz, D.; Yanagimachi, R.; Jaenisch, R. (2001). Epigenetic instability in ES cells and cloned mice. *Science* 293: 95 – 97.
- Hwang, W. S.;** Park, E. S.; Jang, G.; Kang, S. K.; Lee, B. C.; Lim, J. M. (2003). Improved development after treatment of donor somatic cells and clone embryos with hemoglobin and/or beta-mercaptoethanol. *Theriogenology* 59: 342.
- Hwang, W. S.;** Ryu, Y. J.; Park, J. H.; Park, E. S.; Lee, E. G.; Koo, J. M.; Jeon, H. Y.; Lee, B. C.; Kang, S. K.; Kim, S. J.; Ahn, C.; Hwang, J. H.; Park, K. Y.; Cibelli, J. B.; Moon, S. Y. (2004). Evidence of a pluripotent human embryonic stem cell line derived from a cloned blastocyst. *Science* 303: 1669 – 1674.
- Inoue, K.;** Kohda, T.; Lee, J.; Ogonuki, N.; Mochida, K.; Noguchi, Y.; Tanemura, K.; Kaneko-Ishino, T.; Ishino, F.; Ogura, A. (2002). Faithful expression of imprinted genes in cloned mice. *Science* 295: 297.
- Itskovitz-Eldor, J.;** Schuldiner, M.; Karsenti, D.; Eden, A.; Yanuka, O.; Amit, M.; Soreq, H.; Benvenisty, N. (2000). Differentiation of human embryonic stem cells into embryoid bodies compromising the three embryonic germ layers. *Molecular Medicine* 6: 88 – 95.
- Iwamoto, M.;** Kikuchi, K.; Akita, T.; Takeda, K.; Hanada, H.; Hashimoto, M.; Suzuki, S.; Fuchimoto, D.; Nagai, T.; Onishi, A. (2003). Live cloned pigs generated from nuclear transferred embryos encapsulated with sodium alginate. *Theriogenology* 59: 261.
- Jaenisch, R.;** Bird, A. (2003). Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals. *Nature Genetics* 33 (Supplement): 245 – 254.
- Jones, K. L.;** Hill, J.; Shin, T. Y.; Lui, L.; Westhusin, M. (2001). DNA hypomethylation of karyoplasts for bovine nuclear transplantation. *Molecular Reproduction and Development* 60: 208 – 213.
- Joshi, C. V.;** Enver, T. (2002). Plasticity revisited. *Current Opinion in Cell Biology* 14 (No. 6): 749 – 755.
- Joyner, A. L.** (1993). Production of chimeras and genetically defined offspring from targeted ES cells. In: *Gene targeting – a practical approach*: 107 – 146.
- Kang, Y. K.;** Koo, D. B.; Park, J. S.; Choi, Y. H.; Chung, A. S.; Lee, K. K.; Han, Y. M. (2001). Aberrant methylation of donor genome in cloned bovine embryos. *Nature Genetics* 28: 173 – 177.
- Kang, Y. K.;** Park, J. S.; Koo, D. B.; Choi, H. Y.; Kim, S. U.; Lee, K. K.; Han, Y. M. (2002). Limited demethylation leaves mosaic-type methylation states in cloned bovine pre-implantation embryos. *The EMBO Journal* 21: 1092 – 1100.
- Kato, Y.;** Imabayashi, H.; Mori, T.; Tani, T.; Taniguchi, M.; Higashi, M.; Matsumoto, M.; Umezawa, A.; Tsunoda, Y. (2004). Nuclear transfer of adult bone marrow mesenchymal stem cells: developmental totipotency of tissue-specific stem cells from an adult mammal. *Biology of Reproduction* 70: 415 – 418.
- Keefer, C. L.;** Baldassarre, H.; Keyston, R.; Wang, B.; Bhatia, B.; Bilodeau, A. S.; Zhou, J. F.; Leduc, M.; Downey, B. R.; Lazaris, A.; Karatzas, C. N. (2001). Generation of dwarf goat (*Capra hircus*) clones following nuclear transfer with transfected and nontransfected fetal fibroblasts and in vitro-matured oocytes. *Biology of Reproduction* 64: 849 – 856.

- Kennedy, D.** (2003). Stem cells: still here, still waiting. *Science* 300: 865.
- Kind, A.;** Colman, A. (1999). Therapeutic cloning: needs and prospects. *Seminars in Cell & Development Biology* 10: 279 – 286.
- Kitiyant, Y.;** Saikhun, J.; Chaisalee, B.; White, K. L.; Pavasuthipaisit, K. (2001). Somatic cell cloning in Buffalo (*Bubalus bubalis*): effects of interspecies cytoplasmic recipients and activation procedures. *Cloning Stem Cells* 3: 97 – 104.
- Kleiner, K.** (2002). Raising the dead: Calf cloned using cells from a side of beef. *New Scientist*: <http://www.newscientist.com/hottopics/cloning/cloning.jsp?id=234>.
- Kobayashi, S.;** Kaneyama, K.; Saito, N. (2003). Effect of co-transfer of blastocysts derived from parthenogenesis with reconstructed embryos from bovine somatic cells. *Theriogenology* 59: 376.
- Kocher, A. A.;** Schuster, M. D.; Szabolcs, M. J.; Takuma, S.; Burkhoff, D.; Wang, J.; Homma, S.; Edwards, N. M.; Itescu, S. (2001). Neovascularization of ischemic myocardium by human bone-marrow-derived angioblasts prevents cardiomyocyte apoptosis, reduces remodeling and improves cardiac function. *Nature Medicine* 7: 430 – 436.
- Kuroiwa, Y.;** Kasinathan, P.; Choi, Y. J.; Naeem, R.; Tomizuka, K.; Sullivan, E. J.; Knott, J. G.; Duteau, A.; Goldsby, R. A.; Osborne, B. A.; Ishida, I.; Robl, J. M. (2002). Cloned transchromosomal calves producing human immunoglobulin. *Nature Biotechnology* 20: 889 – 894.
- Kwon, O. Y.;** Kono, T. (1996). Production of identical sextuplet mice by transferring metaphase nuclei from four-cell embryos. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93: 13010 – 13013.
- Labosky, P. A.;** Barlow, D. P.; Hogan, B. L. (1994). Mouse embryonic germ (EG) cell lines: transmission through the germline and differences in the methylation imprint of insulin-like growth factor 2 receptor (*Igf2r*) gene compared with embryonic stem (ES) cell lines. *Development* 120: 3197 – 3204.
- Lai, L.;** Kolber-Simonds, D.; Park, K. W.; Cheong, H. T.; Greenstein, J. L.; Im, G. S.; Samuel, M.; Bonk, A.; Rieke, A.; Day, B. N.; Murphy, C. N.; Carter, D. B.; Hawley, R. J.; Prather, R. S. (2002). Production of alpha-1,3-galactosyl-transferase knockout pigs by nuclear transfer cloning. *Science* 295: 1089 – 1092.
- Lamberson, W. R.** (1994). Production of genetically identical swine: uses for families with reduced phenotypic variation. *Theriogenology* 41: 453 – 460.
- Lanza, R. P.;** Chung, H. Y.; Yoo, J. J.; Wettstein, P. J.; Blackwell, C.; Borson, N.; Hofmeister, E.; Schuch, G.; Soker, S.; Moraes, C. T.; West, M. D.; Atala, A. (2002). Generation of histocompatible tissues using nuclear transplantation. *Nature Biotechnology* 20: 689 – 696.
- Lanza, R. P.;** Cibelli, J. B.; Diaz, F.; Moraes, C. T.; Farin, P. W.; Farin, C. E.; Hammer, C. J.; West, M. D.; Damiani, P. (2000 a). Cloning of an endangered species (*Bos gaurus*) using interspecies nuclear transfer. *Cloning* 2: 79 – 90.
- Lanza, R. P.;** Cibelli, J. B.; Blackwell, C.; Cristofalo, V. J.; Francis, M. K.; Baerlocher, G. M.; Mak, J.; Schertzer, M.; Chavez, E. A.; Sawyer, N.; Lansdorp, P. M.; West, M. D. (2000 b). Extension of cell life-span and telomere length in animals cloned from senescent somatic cells. *Science* 288: 665 – 669.
- Lanza, R. P.;** Cibelli, J. B.; West, M. D. (1999). Human therapeutic cloning. *Nature Medicine* 5: 975 – 977.
- Lanza, R. P.;** Cibelli, J. B.; West, M. D.; Dorff, E.; Tauer, C.; Green, R. W. (2001). The ethical reasons for stem cell research. *Science* 292: 1299.
- Lazzari, G.;** Wrenzycki, C.; Herrmann, D.; Duchi, R.; Kruip, T.; Niemann, H.; Galli, C. (2002). Cellular and molecular deviations in bovine in vitro-produced embryos are related to the large offspring syndrome. *Biology of Reproduction* 67: 767 – 775.
- Lee, J. W.;** Wu, S. C.; Tian, X. C.; Barber, M.; Hoagland, T.; Riesen, J.; Lee, K. H.; Tu, C. F.; Cheng, W. T.; Yang, X. (2003). Production of cloned pigs by whole-cell intracytoplasmic microinjection. *Biology of Reproduction* 69: 995 – 1001.
- Lee, R. S. F.;** Peterson, J.; Wells, D. N. (2004). Greater phenotypic variability in cloned cattle fetuses from one cell line than contemporary half-sibs generated by artificial insemination or in vitro embryo production. *Reproduction, Fertility and Development* 16 (No.1 & 2): 148.
- Lloyd, R. E.;** Alberio, R.; Bowles, E. J.; Campbell, K. H. S.; St. John, J. C. (2004). The development and characterization of mitochondrial DNA (mt-DNA)-depleted *Capra hircus* fetal fibroblasts: candidate donors for somatic cell nuclear transfer (SCNT). *Reproduction, Fertility and Development* 16 (No. 1 & 2): 149.
- Loi, P.;** Ptak, G.; Barboni, B.; Fulka, J., Jr.; Cappai, P.; Clinton, M. (2001). Genetic rescue of an endangered mammal by cross-species nuclear transfer using post-mortem somatic cells. *Nature Biotechnology* 19: 962 – 964.
- Long, C. R.;** Walker, S. C.; Tang, R. T.; Westhusin, W. (2003). New commercial opportunities for advanced reproductive technologies in horses, wildlife, and companion animals. *Theriogenology* 59: 139 – 129.
- Loveland, B.;** Wang, C. R.; Yonekawa, H.; Hermel, E.; Lindahl, K. F. (1990). Maternally transmitted histocompatibility antigen of mice: a hydrophobic peptide of a mitochondrially encoded protein. *Cell* 60: 971 – 980.
- Mann, M. R.;** Chung, Y. G.; Nolen, L. D.; Verona, R. I.; Latham, K. E.; Bartolomei, M. S. (2003). Disruption of imprinted gene methylation and expression in cloned preimplantation stage mouse embryos. *Biology of Reproduction* 69: 902 – 914.
- Martin, G. R.** (1981). Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 78: 7634 – 7638.
- McCreath, K. J.;** Howcroft, J.; Campbell, K. H.; Colman, A.; Schnieke, A. E.; Kind, A. J. (2000). Production of gene-targeted sheep by nuclear transfer from cultured somatic cells. *Nature* 405: 1066 – 1069.
- McGrath, J.;** Solter, D. (1983). Nuclear transplantation in mouse embryos. *The Journal of Experimental Zoology* 228: 355 – 362.
- Meng, L.;** Ely, J. J.; Stouffer, R. L.; Wolf, D. P. (1997). Rhesus monkeys produced by nuclear transfer. *Biology of Reproduction* 57: 454 – 459.
- Miettinen, P. J.;** Ebner, R.; Lopez, A. R.; Derynck, R. (1994). TGF-beta induced transdifferentiation of mammary epithelial cells to mesenchymal cells: involvement of type I receptors. *The Journal of Cell Biology* 127: 2021 – 2036.
- Miyashita, N.;** Shiga, K.; Yonai, M.; Kaneyama, K.; Kobayashi, S.; Kojima, T.; Goto, Y.; Kishi, M.; Aso, H.; Suzuki, T.; Sakaguchi, M.; Nagai, T. (2002). Remarkable differences in telomere lengths among cloned cattle derived from different cell types. *Biology of Reproduction* 66: 1649 – 1655.
- Miyoshi, K.;** Rzcuidlo, S. J.; Pratt, S. L.; Stice, S. L. (2003). Improvements in cloning efficiencies may be possible by increasing uniformity in recipient oocytes and donor cells. *Biology of Reproduction* 68: 1079 – 1086.
- Mombaerts, P.** (2003). Therapeutic cloning in the mouse. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100 (Supplement 1): 11924 – 11925.
- Morshead, C. M.;** Benveniste, P.; Iscove, N. N.; van der Kooy, D. (2002). Hematopoietic competence is a rare property of neural stem cells that may depend on genetic and epigenetic alterations. *Nature Medicine* 8: 268 – 273.
- Müller-Jung, J.** (2004 a). Ein beinahe optimales Ergebnis – Gespräch mit Rudolf Jaenisch. *Frankfurter Allgemeine Zeitung* vom 13. Februar 2004 (Feuilleton).
- Müller-Jung, J.** (2004 b). Urknall in der „Klontherapie“. *Frankfurter Allgemeine Zeitung* vom 13. Februar 2004 (Feuilleton).
- Munsie, M. J.;** Michalska, A. E.; O'Brien, C. M.; Trounson, A. O.; Pera, M. F.; Mountford, P. S. (2000). Isolation of pluripotent embryonic stem cells from reprogrammed adult mouse somatic cell nuclei. *Current Biology* 10: 989 – 992.
- Nguyen, V. T.;** Wakayama, S.; Kishigami, S.; Wakayama, T. (2004). Spindle morphogenesis and the morphology of chromosome in mouse nuclear transfer: an abnormal start in cloning of mice. *Reproduction, Fertility and Development* 16 (No. 1 & 2): 153.
- Niemann, H.;** Rath, D.; Wrenzycki, C. (2003). Advances in biotechnology: new tools in future pig production for agriculture and biomedicine. *Reproduction in Domestic Animals* 38: 82 – 89.
- Ogonuki, N.;** Inoue, K.; Yamamoto, Y.; Noguchi, Y.; Tanemura, K.; Suzuki, O.; Nakayama, H.; Doi, K.; Ohtomo, Y.; Satoh, M.; Nishida, A.; Ogura, A. (2002). Early death of mice cloned from somatic cells. *Nature Genetics* 30: 253 – 254.
- Ogura, A.;** Inoue, K.; Ogonuki, N.; Lee, J.; Kohda, T.; Ishino, F. (2002). Phenotypic effects of somatic cell cloning in the mouse. *Cloning Stem Cells* 4: 397 – 405.
- Ogura, A.;** Inoue, K.; Ogonuki, N.; Noguchi, A.; Takano, K.; Nagano, R.; Suzuki, O.; Lee, J.; Ishino, F.; Matsuda, J. (2000 a). Production of male cloned mice from fresh, cultured, and cryopreserved immature Sertoli cells. *Biology of Reproduction* 62: 1579 – 1584.

- Ogura, A.;** Inoue, K.; Takano, K.; Wakayama, T.; Yanagimachi, R. (2000 b). Birth of mice after nuclear transfer by electrofusion using tail tip cells. *Molecular Reproduction and Development* 57: 55 – 59.
- Ohgane, J.;** Wakayama, T.; Kogo, Y.; Senda, S.; Hattori, N.; Tanaka, S.; Yanagimachi, R.; Shiota, K. (2001). DNA methylation variation in cloned mice. *Genesis* 30: 45 – 50.
- Park, H. S.;** Lee, M. Y.; Park, J. K.; Jin, J. J.; Lee, J. S.; Sohn, S. H.; Jung, J. Y. (2003). Interspecies nuclear transfer using caprine somatic cells and bovine or porcine cytoplasts. *Theriogenology* 59: 278.
- Park, M. R.;** Cho, S. K.; Park, J. Y.; Kim, K. M.; Choi, Y. J.; Kwon, D. N.; Hwang, K. C.; Tae, U. H.; Son, W. J.; Paik, S. S. (2004). Rare and unrecognized cerebromeningitis and hepatopneumonic congestion are major causes of sudden death in cloned male piglets. *Reproduction, Fertility and Development* 16 (No. 1 & 2): 154.
- Pearson, H.** (2003). Adult clones in sudden death shock. *Nature Science Update* vom 27. August 2003.
- Perrier, V.;** Kaneko, K.; Safar, J.; Vergara, J.; Tremblay, P.; DeArmond, S. J.; Cohen, F. E.; Prusiner, S. B.; Wallace, A. C. (2002). Dominant-negative inhibition of prion replication in transgenic mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99: 13079 – 13084.
- Peura, T. T.;** Rudiger, R.; Vajta, G.; Walker, S. K. (2003). Increased in vitro development rates of sheep somatic cell nuclear transfer embryos produced by „reverse order“ zona-free method. *Theriogenology* 59: 280.
- Phelps, C. J.;** Koike, C.; Vaught, T. D.; Boone, J.; Wells, K. D.; Chen, S. H.; Ball, S.; Specht, S. M.; Polejaeva, I. A.; Monahan, J. A.; Jobst, P. M.; Sharma, S. B.; Lamborn, A. E.; Garst, A. S.; Moore, M.; Demetris, A. J.; Rudert, W. A.; Bottino, R.; Bertera, S.; Trucco, M.; Starzl, T. E.; Dai, Y.; Ayares, D. L. (2003). Production of alpha 1,3-galactosyl-transferase-deficient pigs. *Science* 299: 411 – 414.
- Polejaeva, I. A.;** Chen, S. H.; Vaught, T. D.; Page, R. L.; Mullins, J.; Ball, S.; Dai, Y.; Boone, J.; Walker, S.; Ayares, D. L.; Colman, A.; Campbell, K. H. (2000). Cloned pigs produced by nuclear transfer from adult somatic cells. *Nature* 407: 86 – 90.
- Powell, K.** (2003 a). Barnyard biotech-lame duck or golden goose. *Nature Biotechnology* 21 (No. 9): 965 – 967.
- Powell, K.** (2003 b). Regulators equivocate on safety of clones. *Nature Biotechnology* 21 (No. 12): 1415 – 1416.
- Prather, R. S.;** Barnes, F. L.; Sims, M. M.; Robl, J. M.; Eyestone, W. H.; First, N. L. (1987). Nuclear transplantation in the bovine embryo: assessment of donor nuclei and recipient oocyte. *Biology of Reproduction* 37: 859 – 866.
- Prather, R. S.;** Hawley, R. J.; Carter, D. B.; Lai, L.; Greenstein, J. L. (2003). Transgenic swine for biomedicine and agriculture. *Theriogenology* 59: 115 – 123.
- Prather, R. S.;** Sims, M. M.; First, N. L. (1989). Nuclear transplantation in early pig embryos. *Biology of Reproduction* 41: 414 – 418.
- Prelle, K.;** Zink, N.; Wolf, E. (2002). Pluripotent stem cells – model of embryonic development, tool for gene targeting, and basis of cell therapy. *Anatomia, Histologia, Embryologia* 31: 169 – 186.
- Prusiner, S. B.;** Groth, D.; Serban, A.; Koehler, R.; Foster, D.; Torchia, M.; Burton, D.; Yang, S. L.; DeArmond, S. J. (1993). Ablation of the prion protein (PrP) gene in mice prevents scrapie and facilitates production of anti-PrP antibodies. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90: 10608 – 10612.
- Psyrembel.** *Klinisches Wörterbuch.* 257. Auflage 2000.
- Reik, W.;** Dean, W. (2003). Gene expression: Silent clones speak up. *Nature* 423: 390 – 391.
- Reik, W.;** Santos, F.; Dean, W. (2003). Mammalian epigenomics: reprogramming the genome for development and therapy. *Theriogenology* 59: 21 – 32.
- Renard, J.-P.** (1998). Cloning in animal biology and research. In: Shenfield, F. (ed.). *Societal, Medical and Ethical Implications of Animal Cloning.* European Commission Press. Brussels.
- Renard, J.-P.;** Chastant, S.; Chesne, P.; Richard, C.; Marchal, J.; Cordonnier, N.; Chavatte, P.; Vignon, X. (1999). Lymphoid hypoplasia and somatic cloning. *The Lancet* 353: 1489 – 1491.
- Reubinoff, B. E.;** Itsykson, P.; Turetsky, T.; Pera, M. F.; Reinhartz, E.; Itzik, A.; Ben Hur, T. (2001). Neural progenitors from human embryonic stem cells. *Nature Biotechnology* 19: 1134 – 1140.
- Rhind, S.;** Cui, W.; King, W.; Ritchie, W.; Wylie, D.; Wilmut, I. (2004). Dolly: a final report. *Reproduction, Fertility and Development* 16 (No. 1 & 2): 156.
- Rhind, S. M.;** King, T. J.; Harkness, L. M.; Bellamy, C.; Wallace, W.; DeSousa, P.; Wilmut, I. (2003 a). Cloned lambs – lessons from pathology. *Nature Biotechnology* 21: 744 – 745.
- Rhind, S. M.;** Taylor, J. E.; De Sousa, P. A.; King, T. J.; McGarry, M.; Wilmut, I. (2003 b). Human cloning: can it be made safe? *Nature Reviews.* *Genetics* 4: 855 – 864.
- Rho, G. J.;** Alexander, B.; Semple, E.; Betts, D. H.; King, W. A. (2003). Evaluation of bovine blastocysts cloned using different activation protocols. *Theriogenology* 59: 282.
- Rideout, W. M., 3rd;** Hochedlinger, K.; Kyba, M.; Daley, G. Q.; Jaenisch, R. (2002). Correction of a genetic defect by nuclear transplantation and combined cell and gene therapy. *Cell* 109: 17 – 27.
- Robl, J.;** Cibelli, J.; Stice, S. L. (1998). Embryonic or stem-like cell lines produced by cross species nuclear transplantation. *International Patent Application Number* WO 98/07841.
- Robl, J. M.;** Kasinathan, P.; Sullivan, E.; Kuroiwa, Y.; Tomizuka, K.; Ishida, I. (2003). Artificial chromosome vectors and expression of complex proteins in transgenic animals. *Theriogenology* 59: 107 – 113.
- Roh, S.;** Guo, J.; Malakooti, N.; Morrison, J. R.; Trounson, A. O.; Du, Z. T. (2003). Birth of rats by nuclear transplantation using 2-cell stage embryo as donor nucleus and recipient cytoplasm. *Theriogenology* 59: 283.
- Saegusa, A.** (1998). Mother bears could help save giant panda. *Nature* 394: 409.
- Santos, F.;** Zakhartchenko, V.; Stojkovic, M.; Peters, A.; Jenuwein, T.; Wolf, E.; Reik, W.; Dean, W. (2003). Epigenetic marking correlates with developmental potential in cloned bovine preimplantation embryos. *Current Biology* 13: 1116 – 1121.
- Schmidt, M.;** Sangild, P. T.; Greve, T. (2003). Improving the viability of weak premature calves with ACTH. *Theriogenology* 59: 331.
- Schnieke, A. E.;** Kind, A. J.; Ritchie, W. A.; Mycock, K.; Scott, A. R.; Ritchie, M.; Wilmut, I.; Colman, A.; Campbell, K. H. (1997). Human factor IX transgenic sheep produced by transfer of nuclei from transfected fetal fibroblasts. *Science* 278: 2130 – 2133.
- Schnorr, B.** (1989). *Embryologie der Haustiere.* Ein Kurzlehrbuch: 37 – 52.
- Schuldiner, M.;** Yanuka, O.; Itskovitz-Eldor, J.; Melton, D. A.; Benvenisty, N. (2000). Effects of eight growth factors on the differentiation of cells derived from human embryonic stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97: 11307 – 11312.
- Sedivy, J. M.** (2003). Reproductive cloning conserves cellular senescence. *Nature Cell Biology* 5: 495 – 496.
- Shablott, M. J.;** Axelman, J.; Wang, S.; Bugg, E. M.; Littlefield, J. W.; Donovan, P. J.; Blumenthal, P. D.; Huggins, G. R.; Gearhart, J. D. (1998). Derivation of pluripotent stem cells from cultured human primordial germ cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95: 13726 – 13731.
- Shi, W.;** Hoefflich, A.; Flaswinkel, H.; Stokovic, M.; Wolf, E.; Zakhartchenko, V. (2003 a). Induction of a Senescent-Like Phenotype Does Not Confer the Ability of Bovine Immortal Cells to Support the Development of Nuclear Transfer Embryos. *Biology of Reproduction* 69: 301-309.
- Shi, W.;** Zakhartchenko, V.; Wolf, E. (2003 b). Epigenetic reprogramming in mammalian nuclear transfer. *Differentiation* 71: 91 – 113.
- Shiels, P. G.;** Kind, A. J.; Campbell, K. H.; Waddington, D.; Wilmut, I.; Colman, A.; Schnieke, A. E. (1999). Analysis of telomere lengths in cloned sheep. *Nature* 399: 316-317.
- Shin, T.;** Kraemer, D.; Pryor, J.; Liu, L.; Rugila, J.; Howe, L.; Buck, S.; Murphy, K.; Lyons, L.; Westhusin, M. (2002). A cat cloned by nuclear transplantation. *Nature* 415: 859.
- Simerly, C.;** Dominko, T.; Navara, C.; Payne, C.; Capuano, S.; Gosman, G.; Chong, K. Y.; Takahashi, D.; Chace, C.; Compton, D.; Hewitson, L.; Schatten, G. (2003). Molecular correlates of primate nuclear transfer failures. *Science* 300: 297.
- Spemann, H.** (1938). *Embryonic development and induction.*
- Steinborn, R.;** Schinogel, P.; Zakhartchenko, V.; Achmann, R.; Scherthaner, W.; Stojkovic, M.; Wolf, E.; Muller, M.; Brem, G. (2000). Mitochondrial DNA heteroplasmy in cloned cattle produced by fetal and adult cell cloning. *Nature Genetics* 25: 255 – 257.

- Stice, S. L.;** Robl, J. M. (1988). Nuclear reprogramming in nuclear transplant rabbit embryos: Biology of Reproduction 39: 657 – 664.
- Suemizu, H.;** Aiba, K.; Yoshikawa, T.; Sharov, A. A.; Shimosawa, N.; Tamaoki, N.; Ko, M. S. (2003). Expression profiling of placentomegaly associated with nuclear transplantation of mouse ES cells. *Developmental Biology* 253: 36 – 53.
- Sullivan, E. J.;** Kasinathan, S.; Kasinathan, P.; Robl, J. M.; Collas, P. (2004). Cloned calves from chromatin remodeled in vitro. *Biology of Reproduction* 70: 146 – 153.
- Surani, M. A.;** (2004). Stem cells: how to make eggs and sperm. *Nature* 427: 106 – 107.
- Surani, M. A.;** Barton, S. C.; Norris, M. L. (1984). Development of reconstituted mouse eggs suggests imprinting of the genome during gametogenesis. *Nature* 308: 548 – 550.
- Takeda, K.;** Akagi, S.; Kaneyama, K.; Kojima, T.; Takahashi, S.; Imai, H.; Yamanaka, M.; Onishi, A.; Hanada, H. (2003). Proliferation of donor mitochondrial DNA in nuclear transfer calves (*Bos taurus*) derived from cumulus cells. *Molecular Reproduction and Development* 64: 429 – 437.
- Tamashiro, K. L.;** Wakayama, T.; Akutsu, H.; Yamazaki, Y.; Lachey, J. L.; Wortman, M. D.; Seeley, R. J.; D'Alessio, D. A.; Woods, S. C.; Yanagimachi, R.; Sakai, R. R. (2002). Cloned mice have an obese phenotype not transmitted to their offspring. *Nature Medicine* 8: 262 – 267.
- Taupitz, J.** (2002). Therapeutic and reproductive cloning from a legal point of view. *Zeitschrift für ärztliche Fortbildung und Qualitätssicherung: in Zusammenarbeit mit der Kaiserin-Friedrich-Stiftung für das ärztliche Fortbildungswesen* 96: 449 – 455.
- Thomson, J. A.;** Itskovitz-Eldor, J.; Shapiro, S. S.; Waknitz, M. A.; Swiergiel, J. J.; Marshall, V. S.; Jones, J. M. (1998). Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 282: 1145 – 1147.
- Tian, X. C.;** Kubota, C.; Enright, B.; Yang, X. (2003). Cloning animals by somatic cell nuclear transfer – biological factors. *Reproductive Biology and Endocrinology* 1: 98.
- Tian, X. C.;** Xu, J.; Yang, X. (2000). Normal telomere lengths found in cloned cattle. *Nature Genetics* 26: 272 – 273.
- Toyooka, Y.;** Tsunekawa, N.; Akasu, R.; Noce, T. (2003). Embryonic stem cells can form germ cells in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100: 11457 – 11462.
- Tsunoda, Y.;** Yasui, T.; Shioda, Y.; Nakamura, K.; Uchida, T.; Sugie, T. (1987). Full-term development of mouse blastomere nuclei transplanted into enucleated two-cell embryos. *The Journal of Experimental Zoology* 242: 147 – 151.
- Vogel, G.** (2003 a). Embryonic stem cells. Scientists make sperm in a dish. *Science* 302: 1875.
- Vogel, G.** (2003 b). Nuclear Transfer: Misguided chromosomes foil primate cloning. *Science* 300: 225 – 227.
- Wakayama, S.;** Cibelli, J. B.; Wakayama, T. (2003). Effect of timing of the removal of oocyte chromosomes before or after injection of somatic nucleus on development of NT embryos. *Cloning Stem Cells* 5: 181 – 189.
- Wakayama, T.;** Perry, A. C.; Zuccotti, M.; Johnson, R. K.; Yanagimachi, R. (1998). Full-term development of mice from enucleated oocytes injected with cumulus cell nuclei. *Nature* 394: 369 – 374.
- Wakayama, T.;** Rodriguez, I.; Perry, A. C.; Yanagimachi, R.; Mombaerts, P. (1999). Mice cloned from embryonic stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96: 14984 – 14989.
- Wakayama, T.;** Shinkai, Y.; Tamashiro, K. L.; Niida, H.; Blanchard, H. C.; Blanchard, R. J.; Ogura, A.; Tanemura, K.; Tachibana, M.; Perry, A. C.; Colgan, D. F.; Mombaerts, P.; Yanagimachi, R. (2000). Cloning of mice to six generations. *Nature* 407: 318 – 319.
- Wakayama, T.;** Tabar, V.; Rodriguez, I.; Perry, A. C.; Studer, L.; Mombaerts, P. (2001). Differentiation of embryonic stem cell lines generated from adult somatic cells by nuclear transfer. *Science* 292: 740 – 743.
- Wakayama, T.;** Yanagimachi, R. (1999). Cloning of male mice from adult tail-tip cells. *Nature Genetics* 22: 127 – 128.
- Walker, S. K.;** Hartwich, K. M.; Seamark, R. F. (1996). The production of unusually large offspring following embryo manipulation: concepts and challenges. *Theriogenology* 45: 111 – 120.
- Walsh, M. K.;** Lucey, J. A.; Govindasamy-Lucey, S.; Pace, M. M.; Bishop, M. D. (2003). Comparison of milk produced by cows cloned by nuclear transfer with milk from non-cloned cows. *Cloning Stem Cells* 5: 213 – 219.
- Wells, D. N.;** Laible, G.; Tucker, F. C.; Miller, A. L.; Oliver, J. E.; Xiang, T.; Forsyth, J. T.; Berg, M. C.; Cockrem, K.; L'Huillier, P. J.; Tervit, H. R.; Oback, B. (2003 a). Coordination between donor cell type and cell cycle stage improves nuclear cloning efficiency in cattle. *Theriogenology* 59: 45 – 59.
- Wells, D. N.;** Oback, B.; Laible, G. (2003 b). Cloning livestock: a return to embryonic cells. *Trends in Biotechnology* 21: 428 – 432.
- Willadsen, S. M.** (1986). Nuclear transplantation in sheep embryos. *Nature* 320: 63 – 65.
- Wilmot, I.** (2002). Are there any normal cloned mammals? *Nature Medicine* 8: 215 – 216.
- Wilmot, I.** (2003). Human cells from cloned embryos in research and therapy. *Cloning and Stem Cells* 5 (No.3): 163 – 164.
- Wilmot, I.;** Beaujean, N.; De Sousa, P. A.; Dinnyes, A.; King, T. J.; Paterson, L. A.; Wells, D. N.; Young, L. E. (2002). Somatic cell nuclear transfer. *Nature* 419: 583 – 586.
- Wilmot, I.;** Schnieke, A. E.; McWhir, J.; Kind, A. J.; Campbell, K. H. (1997). Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature* 385: 810 – 813.
- Wilson, J. M.;** Williams, J. D.; Bondioli, K. R.; Looney, C. R.; Westhusin, M. E.; McCalla, D. F. (1995). Comparison of birth weight and growth characteristics of bovine calves produced by nuclear transfer (cloning), embryo transfer and natural mating. *Animal Reproduction Science* 38: 73 – 83.
- Winnacker, E.-L.** (2001). Der Mensch ist mehr als die Summe seiner Gene. *Frankfurter Allgemeine Zeitung* 29: 15.
- Winnacker, E.-L.** (2003). Heilversuche mit Stammzellen in wenigen Jahren denkbar. *Süddeutsche Zeitung* 82: 20.
- Wobus, A. M.;** Rohwedel, J.; Strübing, C.; Shan, J.; Adler, K.; Maltsev, V.; Hescheler, J. (1997). In vitro differentiation of embryonic stem cells. *Methods in Developmental Toxicology and Biology*: 1 – 17.
- Wolf, E.** (2000). Kerntransfer und Reprogrammierung - Anwendungen in Biotechnologie und Tierzucht. *Nova Acta Leopoldina NF* 318: 19 – 33.
- Wolf, E.;** Zakhartchenko, V.; Brem, G. (1998). Nuclear transfer in mammals: recent developments and future perspectives. *Journal of Biotechnology* 65: 99 – 110.
- Woods, G. L.;** White, K. L.; Vanderwall, D. K.; Li, G. P.; Aston, K. I.; Bunch, T. D.; Meerdo, L. N.; Pate, B. J. (2003). A mule cloned from fetal cells by nuclear transfer. *Science* 301: 1063.
- Wrenzycki, C.;** Herrmann, D.; Lucas-Hahn, A.; Niemann, H. (2004). Expression of DNA methyltransferases (Dnmt 1, 3a, 3b) and x-inactive specific transcripts (Xist) during preimplantation development of cloned bovine embryos. *Wiener Tierärztliche Monatsschrift* 91 (Supplement 2): 74.
- Wrenzycki, C.;** Lucas-Hahn, A.; Herrmann, D.; Lemme, E.; Korsawe, K.; Niemann, H. (2002). In vitro production and nuclear transfer affect dosage compensation of the X-linked gene transcripts G6PD, PGK, and Xist in preimplantation bovine embryos. *Biology of Reproduction* 66: 127 – 134.
- Xu, C.;** Inokuma, M. S.; Denham, J.; Golds, K.; Kundu, P.; Gold, J. D.; Carpenter, M. K. (2001). Feeder-free growth of undifferentiated human embryonic stem cells. *Nature Biotechnology* 19: 971 – 974.
- Xue, F.;** Tian, X. C.; Du, F.; Kubota, C.; Taneja, M.; Dinnyes, A.; Dai, Y.; Levine, H.; Pereira, L. V.; Yang, X. (2002). Aberrant patterns of X chromosome inactivation in bovine clones. *Nature Genetics* 31: 216 – 220.
- Xue, J.;** Yang, X. (2003). Will cloned animals suffer premature aging – The story at the end of clones' chromosomes. *Reproductive Biology and Endocrinology* 1: 1 – 5.
- Yamazaki, Y.;** Makino, H.; Hamaguchi-Hamada, K.; Hamada, S.; Sugino, H.; Kawase, E.; Miyata, T.; Ogawa, M.; Yanagimachi, R.; Yagi, T. (2001). Assessment of the developmental totipotency of neural cells in the cerebral cortex of mouse embryo by nuclear transfer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98 (No.24), 14022 – 14026.
- Yang, B. C.;** Im, G. S.; Kim, D. H.; Lee, S. K.; Park, H. S.; Seong, H. H.; Jung, J. K.; Chang, W. K.; Kim, K. N. (2004). Relationship between survival rate and birth weight in cloned Korean native calves. *Reproduction, Fertility and Development* 16 (No. 1 & 2): 161.
- Yong, Z.;** Yuqiang, L. (1998). Nuclear-cytoplasmic interaction and development of goat embryos reconstructed by nuclear transplantation: production of goats by serially cloning embryos. *Biology of Reproduction* 58: 266 – 269.

Young, L. E.; Fernandes, K.; McEvoy, T. G.; Butterwith, S. C.; Gutierrez, C. G.; Carolan, C.; Broadbent, P. J.; Robinson, J. J.; Wilmut, I.; Sinclair, K. D. (2001). Epigenetic change in IGF2R is associated with fetal overgrowth after sheep embryo culture. *Nature Genetics* 27: 153 – 154.

Young, L. E.; Sinclair, K. D.; Wilmut, I. (1998). Large offspring syndrome in cattle and sheep. *Reviews of Reproduction* 3: 155 – 163.

Zawada, W. M.; Cibelli, J. B.; Choi, P. K.; Clarkson, E. D.; Golueke, P. J.; Witta, S. E.; Bell, K. P.; Kane, J.; Ponce de Leon, F. A.; Jerry, D. J.; Robl, J. M.; Freed, C. R.; Stice, S. L. (1998). Somatic cell cloned transgenic bovine neurons for transplantation in parkinsonian rats. *Nature Medicine* 4: 569 – 574.

Zerhouni, E. (2003). Embryonic stem cells. *Stem cell programs. Science* 300: 911 – 912.

Zhang, J.; Zhuang, G.; Zeng, Y.; Acosta, C.; Shu, Y.; Grifo, J. (2003). Pregnancy derived from human nuclear transfer. *Fertility and Sterility* 80 (Supplement 3): 56.

Zhang, S. C.; Wernig, M.; Duncan, I. D.; Brustle, O.; Thomson, J. A. (2001). In vitro differentiation of transplantable neural precursors from human embryonic stem cells. *Nature Biotechnology* 19: 1129 – 1133.

Zhou, Q.; Baqir, S.; Brochard, V.; Smith, L.; Renard, J-P. (2002). Donor nuclei are not well reprogrammed by nuclear transfer procedure. *Biology of Reproduction* 66: 237 – 238.

Zhou, Q.; Renard, J.-P.; Le Friec, G.; Brochard, V.; Beaujean, N.; Cherifi, Y.; Fraichard, A.; Cozzi, J. (2003). Generation of fertile cloned rats by regulating oocyte activation. *Science* 302: 1179.

Zwaka, T. P.; Thomson, J. A. (2003). Homologous recombination in human embryonic stem cells. *Nature Biotechnology* 21: 319 – 321.