

Einfluss der DNA-Methylierung in somatischen Zellen auf die Entwicklungsfähigkeit von Embryonen nach Kerntransfer

R. Pöhland, F. Al Rostum, S. Bhojwani, W. Kanitz, H. Torner

Forschungsbereich Fortpflanzungsbiologie, Forschungsinstitut für die Biologie
landwirtschaftlicher Nutztiere, Dummerstorf

Seit der Geburt des ersten aus somatischen Zellkernen klonierten Säugetiers, dem Schaf Dolly, wurden eine Vielzahl weiterer Tiere verschiedener Spezies mittels somatischem Kerntransfer erzeugt. Trotz dieser Erfolge berichten alle Autoren über eine sehr geringe Effizienz der Methodik bezüglich des Anteils geborener Nachkommen. Noch problematischer ist jedoch, dass die Nachkommen Schäden aufzeigen, die unter anderem mit einem sehr starken Large-Offspring-Syndrom, Schäden an Lunge und Leber, Verdauungsproblemen und vorzeitigen Alterserscheinungen einhergehen. Diese Phänomene lassen sich nur zum Teil mit methodischen Problemen des Kerntransfers bzw. suboptimalen Kulturbedingungen erklären. Das Hauptproblem dürfte in der fehlerhaften Reprogrammierung des somatischen Zellkernes nach der Übertragung in das Ooplasma der gereiften Eizelle liegen. Eine Folge der fehlerhaften Reprogrammierung der somatischen Zellkerne sind Fehler in der Expression von Genen, die für die frühe Embryonalentwicklung erforderlich sind. Auch in der späteren fötalen Entwicklungsphase sind solche Unterschiede im Expressionsmuster nachweisbar. Ausgehend von diesen Erkenntnissen sind in den letzten Jahren eine Reihe von Untersuchungen durchgeführt worden, die die bessere Eignung des somatischen Zellkernes für den Kerntransfer im Focus hatten. Anfänglich untersuchte man die Eignung unterschiedlicher Zelltypen sowie den Einfluss von Zellalter, Passagenanzahl und Zellzyklusstadium für den Kerntransfer. So kann man einerseits feststellen, dass z.B. Cumuluszellen und Fibroblasten als Kernspender besonders geeignet erscheinen und embryonale Fibroblasten wiederum bessere Ergebnisse hervorbringen als adulte Zellen, jedoch sind die Aussagen zum Einfluss der Passagenanzahl sowie der Kultursysteme sehr widersprüchlich. Bereits Dean et al. (1998, *Development* 125, 2273-2282) sprachen von Veränderungen im Methylierungszustand der somatischen Zellkerne während der Zellkultur als mögliche Ursache für unterschiedliche Effektivitätsraten beim Kerntransfer. Die DNA-Methylierung als ein Phänomen der epigenetischen Programmierung trat in letzter Zeit immer mehr in den Vordergrund. Dabei wurden sowohl erste Untersuchungen zur Gesamtmethylierung in frühen Zygoten und Embryonen als auch in somatischen Zellen, die als Kernspender dienten, durchgeführt. Die Erkenntnis, dass epigenetische Phänomene ursächlich mit der geringen Effizienz des somatischen Kerntransfers und der hohen Anzahl von Missbildungen verbunden sind, führte in den letzten 2-3 Jahren zu ersten Überlegungen, die epigenetische Programmierung zu beeinflussen. Da es gegenwärtig keine Tools gibt, mit denen man spezifisch einzelne Gene methylieren oder demethylieren kann, bleibt nur die Möglichkeit einer unspezifischen Demethylierung der Gesamt-DNA. Ein solcher Schritt macht jedoch nur in Phasen Sinn, in denen physiologische Demethylierungen mit anschließender genspezifischer Remethylierung im Sinne einer epigenetischen Umprogrammierung stattfinden.

Die Autoren haben unter Verwendung von 12 verschiedenen, definierten Linien boviner Fibroblasten und boviner Cumuluszellen (bis zu 12 Passagen) ca. 6800 Embryonen erzeugt (HMCTM). Die Linien wurden dafür bezüglich ihres Zellzyklus und eventueller Chromosomenschäden charakterisiert. Die Bestimmung der Gesamtmethylierung erfolgte

mittels eines Anti-5-Methyl-Cytosin-Antikörpern und quantitativer konfokaler Laser-scanningmikroskopie an den adhärennten somatischen Zellkulturen und an einzelnen Blastomeren der erzeugten Embryonen. Die DNA-Methylierung der somatischen Zellen wurde in einem Teil der Zellkulturen zeit- und konzentrationsabhängig mittels 5-Aza-2'-deoxycytidin bis auf ca. 10% des Ausgangswertes verringert.

Erste Ergebnisse weisen darauf hin, dass der Grad der DNA-Methylierung in den einzelnen Zelllinien variiert. Generell erfolgte im Verlauf der Passagierung etwa ab Passage 6-8 eine Abnahme der Gesamtmethylierung. Diese war bei den Granulosazelllinien deutlicher ausgeprägt. Demgegenüber reagierten die Fibroblasten sensitiver auf eine Behandlung mit 5-Aza-2'-deoxycytidin. Während höhere Dosen ($>0,4\mu\text{M}$) dieser Substanz zytotoxisch wirkten, konnte im sehr schmalen wirksamen Dosisbereich ($0,2-0,4\mu\text{M}$) nach Absetzen des Wirkstoffes eine spontane Remethylierung nachgewiesen werden. Die durchschnittliche Blastozystenrate nach Kerntransfer lag bei 27%. Sie variierte zwischen den eingesetzten Zelllinien und der Passagennummer jedoch zwischen 8% und 39%. Eine Demethylierung der Kernspender-DNA führte zu einer drastischen Verringerung der Blastozystenrate auf 1-5%. Spontan remethylierte somatische Zellen erbrachten vergleichbare Ergebnisse zu unbehandelten Zellen derselben Linie und Passage.

Die bisherigen Ergebnisse zeigen, dass die Art der verwendeten Zelllinie einen Einfluss auf die Blastozystenrate nach Kerntransfer hat. Auch konnte gezeigt werden, dass der Grad der DNA-Methylierung zwischen den somatischen Zelllinien und Passagenanzahl variiert. Ein Einfluss auf die Blastozystenrate wäre daher möglich. Eine drastisch verringerte Gesamtmethylierung hat jedoch sogar eine negative Wirkung auf die frühe embryonale Entwicklung. Ob die spontane Remethylierung der somatischen Zellen in der Zellkultur zu einem Methylierungsmuster führt, dass der Ausgangssituation entspricht, wird gegenwärtig untersucht. Gleichfalls wird versucht, die spontane Remethylierung zu beeinflussen, um ein modifiziertes Methylierungsmuster zu erzeugen.