

# **Klonen in der biomedizinischen Forschung: Möglichkeiten und Perspektiven, Grenzen und Risiken**

Gutachten im Auftrag  
des Ausschusses für Bildung, Wissenschaft,  
Forschung, Technologie und Technikfolgenabschätzung  
des Deutschen Bundestages  
im Rahmen des TA-Projekts:  
„Klonen von Tieren“

Prof. Dr. Regine Kollek,  
Dr. Stephan Hartung  
Dipl. Biochem. Christina de Wit

Universität Hamburg  
FSP Biotechnik, Gesellschaft und Umwelt  
FG Medizin / Neurobiologie  
Falkenried 94  
D-20251 Hamburg

Tel. 040-4717-6312  
Fax 040-4717-6315  
e-mail: kollek@rrz.uni-hamburg.de

September 1998

**KONTAKT:**

Prof. Dr. Regine Kollek  
Universität Hamburg  
FSP BIOGUM  
Falkenried 94  
D - 20251 Hamburg

Tel: +49 (40) 42803 6309  
Fax: +49 (40) 42803 6315  
e-mail: [kollek@uni-hamburg.de](mailto:kollek@uni-hamburg.de)  
[www.biogum.uni-hamburg.de](http://www.biogum.uni-hamburg.de)

ISBN 978-3-980 68 5924

## INHALT:

<b>ZUSAMMENFASSUNG</b> .....	<b>3</b>
<b>1 EINFÜHRUNG</b> .....	<b>9</b>
<b>2 KLONEN IN DER BIOLOGISCHEN UND MEDIZINISCHEN GRUNDLAGENFORSCHUNG</b> .....	<b>13</b>
2.1 <i>Entwicklung des kerntransferbasierten Klonens</i> .....	13
2.2 <i>Differenzierung, Dedifferenzierung und Embryonalentwicklung</i> .....	16
2.2.1 Molekulare Prozesse bei der Zelldifferenzierung: Sachstand.....	17
2.2.2 Offene Fragen.....	24
2.3 <i>Änderung epigenetischer Vorprägungen des Genoms</i> .....	31
2.4 <i>Aktivierung mobiler genetischer Elemente</i> .....	41
2.5 <i>Ausblick und Forschungsperspektiven</i> .....	45
<b>3 KLONEN IN DER ANGEWANDTEN MEDIZINISCHEN FORSCHUNG</b> .....	<b>48</b>
3.1 <i>Gen-Pharming</i> .....	50
3.2 <i>Xenotransplantation</i> .....	57
3.2.1 Abstoßungsreaktionen.....	60
3.2.2 Organfunktion.....	73
3.2.3 Infektion mit Xenopathogenen.....	74
3.2.4 Fazit und Ausblick.....	77
3.3 <i>Zelltherapie, autologe Transplantation und Gentherapie</i> .....	78
3.3.1 Zelltherapie und autologe Transplantation.....	78
3.3.2 Gentherapie.....	84
3.4 <i>Präklinische Forschung</i> .....	85
3.4.1 Tiermodelle für menschliche Krankheiten.....	87
3.4.2 Genetisch identische Tiere zu Versuchszwecken.....	92
<b>4 BIOLOGISCHE RISIKEN UND TECHNISCHE GRENZEN DES KERNTRANSFERBASIERTE KOLONENS</b> .....	<b>94</b>
<b>5 METHODISCHE UND KONZEPTIONELLE ALTERNATIVEN</b> .....	<b>101</b>
5.1 <i>Methodische Alternativen</i> .....	102
5.2 <i>Konzeptionelle Alternativen</i> .....	104
5.2.1 Biomedizinische Forschung.....	105
5.2.2 Krankheitsmodelle.....	107
<b>6 FAZIT</b> .....	<b>111</b>
<b>ANHANG 1: METHODISCHES VORGEHEN</b> .....	<b>114</b>
<b>ANHANG 2: QUELLEN</b> .....	<b>116</b>



## Zusammenfassung

Die vorliegende Studie hat zum Ziel, das Potential des kerntransferbasierten Klonens für die grundlagenorientierte und angewandte biomedizinische Forschung zu untersuchen, seine nach heutigem Wissen erkennbaren Grenzen und Risiken zu benennen, sowie vorhandene Alternativen zu diskutieren. Sie tut dies in vier Schritten:

(1) Der erste Teil ist der Untersuchung des Beitrags des Klonens für die biologische und medizinische Grundlagenforschung gewidmet. Dabei geht es zum einen darum, welchen Beitrag das Klonen als Methode zur Erweiterung des Wissens über grundlegende biologische Prozesse leisten kann. Zum anderen aber stellt das Klonen ein Phänomen dar, über dessen grundlegende Mechanismen wenig bekannt ist, und das selber der Untersuchung bedarf.

Grundlage für die hier vorgenommene Potentialeinschätzung ist eine Bestandsaufnahme des Wissens zur Differenzierung und Dedifferenzierung von Zellen und zur Embryonalentwicklung. Im Ergebnis zeigt sich, daß noch weitgehend unklar ist, warum das Klonen einerseits überhaupt möglich ist, und warum es andererseits so ineffizient erfolgt. Eine der entscheidenden Fragen dabei ist, wie das „Rücksetzen“ des Genoms einer differenzierten Zelle in einen quasi embryonalen Zustand erfolgt. Anhand bekannter zell- und molekularbiologischer bzw. -genetischer Mechanismen, die bei Differenzierungsprozessen eine Rolle spielen (wie z.B. das selektive Ablesen des Genoms oder seine Organisation in Domänen) werden mögliche Modelle dafür diskutiert.

Eine zentrale Rolle scheinen epigenetische Prozesse zu spielen, die das Klonen zugleich ermöglichen als auch erschweren. Epigenetische Prozesse werden der nach den Gesetzen der klassischen Genetik erfolgenden Vererbung gleichsam aufgelagert. Es handelt sich dabei um prinzipiell reversible Zustände des Erbguts, die seinen Informationsgehalt nicht verändern, wohl aber seine Umsetzung. Bekannte epigenetische Phänomene lassen sich in zwei Gruppen einteilen:

\* Zum einen in solche, die in individuellen Zellen wirksam werden und die dazu führen, daß die Erbinformation selektiv und sequentiell abgelesen wird, was letztlich zu einer Differenzierung und funktionellen Spezialisierung der betreffenden Zelle führt. Die Methylierung, die Organisation von Genen in Domänen und die Chromatinstrukturen sind solche epigenetischen Eigenschaften des Genoms, die nicht unmittelbar durch seine Sequenz bedingt sind, sondern ein Resultat der spezifischen Organisations- und „Verpackungsweise“ des Erbmaterials in den Zellen sowie von vorangegangenen Entwicklungsschritten. Sie beeinflussen das Expressionsverhalten von Genen, nicht aber

deren in der DNA-Sequenz festgelegten Informationsgehalt. Sie sind dem Genom gleichsam als „Zusatzvermerke“ aufgelagert, die der Zelle sagen, wie sie mit dem jeweiligen Sequenzinhalt verfahren soll. Beim kerntransferbasierten Klonen könnten solche Zusatzvermerke im Zuge der vollständigen Reprogrammierung des Donorzellkerns verfälscht werden, mit dem Ergebnis, das wichtige Gene künftig nicht mehr zur Expression gelangen oder am falschen Ort zur falschen Zeit aktiviert werden. Unsere Analyse publizierter experimenteller Untersuchungen zeigt, daß solche epigenetisch bedingten Expressionsveränderungen nach einem Kerntransfer tatsächlich auftreten können, und hierin könnte das eigentliche Problem der Klonprozedur, bzw. die Ursache für ihre geringe Effizienz und die hohe Mortalität der Tiere liegen.

Aus den bisherigen Befunden läßt sich weiterhin schließen, daß das kerntransferbasierte Klonen statistischen Einflüssen unterliegt; es gehorcht also keiner direkten Kausalbeziehung in dem Sinne, daß der Transfer eines Zellkerns in eine entkernte Eizelle unweigerlich zur Entstehung eines entwicklungsfähigen Embryos führt. Vielmehr sind das Zurücksetzen der differenzierten Zelle in den Embryonalzustand und ihre Reprogrammierung“ durch das Zytoplasma der Eizelle komplexe Prozesse, deren Einzelschritte voneinander unabhängig abzulaufen scheinen. Um die normale Entwicklung eines Embryos bzw. Lebewesens sicherzustellen, müssen alle fehlerfrei durchgeführt werden. Geschieht das nicht, sterben die Embryonen ab oder der betreffende Organismus entwickelt früher oder später Funktionsstörungen. Die Überlebensrate klonierter Embryonen ist somit das Produkt der einzelnen Erfolgswahrscheinlichkeiten unabhängiger Reaktionen.

\* Ein zweiter Typ epigenetischer Prozesse resultiert in einer unterschiedlichen Vorprägung von Genen in der männlichen und weiblichen Keimbahn. Dieses Phänomen wird „Imprinting“ genannt. Forschungsarbeiten der letzten zwei Jahrzehnte zeigen, daß der Phänotyp eines Organismus nicht nur durch die im Erbgut enthaltenen Informationen und die Umgebungsbedingungen beeinflusst wird, sondern auch von diesen Vorprägungen. Das Zytoplasma der Eizelle spielt dabei eine zentrale Rolle. Beim Klonen kann es das Genom des Spenderkerns mit „falschen“ epigenetischen Vermerken versehen oder vorhandene wichtige streichen. Dies kann die Ablesung des Spendergenoms ungünstig beeinflussen. Das Zytoplasma der empfangenden Eizelle kontrolliert also über epigenetische Mechanismen mit, welchen Phänotyp ein durch Kerntransfer erzeugtes Tier entwickelt. Aufgrund solcher Umprogrammierungen im Genom kann nicht ausgeschlossen werden, daß durch das Klonen mobile genetische Elemente wie z.B. endogene Retroviren oder retrovirale Sequenzen aktiviert werden, auch wenn es dafür bislang keine experimentelle Evidenz gibt. Das kerntransferbasierte Klonen birgt also das Risi-

ko, daß sich epigenetische Modifikationen des Spendergenoms ändern, und diese Änderungen sich unter Umständen sogar auf die möglichen Nachkommen eines geklonten Tieres vererben. Die Bedingungen, unter denen solche Fehler geschehen, bedürfen der näheren Untersuchung.

(2) Im zweiten Teil geht es um die mögliche Bedeutung des Klonens für die angewandte biomedizinische Forschung. Zentrale Fragestellung dieses Teils ist, ob und in welchen Bereichen das Klonen dazu beitragen kann, die Bearbeitung vorhandener wissenschaftlicher oder technischer Probleme in der angewandten biomedizinischen Forschung zu befördern, und ob es selber auch neue Handlungsfelder für die Medizin eröffnet.

Behandelt wird zunächst das sogenannte „Gen-Pharming“. Darunter versteht man die Verwendung transgener Tiere zur Erzeugung therapeutisch nutzbarer (humaner) Proteine in der Milch. Hier liegt auf absehbare Zeit eines der Hauptanwendungsgebiete des kerntransferbasierten Klonens, da es die Erzeugung der entsprechenden transgenen Tiere im Vergleich zu den herkömmlichen Verfahren effektiver und zielgerichteter macht. Auch ist der dafür benötigte Zeitaufwand aufgrund der durch die Zellkultur gegebenen Vorselektionsmöglichkeiten geringer. Bei Verfügbarkeit solcher Tiere kann die Wirkstoffproduktion in großen Mengen und verhältnismäßig preiswert erfolgen. Eine aus wenigen Tieren bestehende Herde kann u.U. ausreichen, um den weltweiten Bedarf eines Wirkstoffs zu befriedigen. Dies kann im Einzelfall zu einer Reduktion der Zahl der dafür benötigten Versuchs- oder Produktionstiere führen. Allerdings entstehen für die Tiere auch Risiken, die durch die Transgenesis, durch die biologische Aktivität des produzierten Proteins und durch das Klonverfahren selber bedingt sind. Gefährdungen für Menschen können durch Veränderungen der Produkte sowie durch die mögliche Aktivierung und Übertragung von Krankheitserregern entstehen, wobei vor allem erstere durch sorgfältige Arzneimittelprüfungen weitgehend ausgeschlossen werden können.

Ein weiterer Bereich, in dem der Einsatz transgener Tiere vorgesehen ist, ist die Xenotransplantation. Um jedoch ein „ideales Organspender-Schwein“ zu konstruieren, müßten bis zu etwa einem Dutzend Gene beim Schwein verändert werden. Mit den herkömmlichen Methoden der Transgenesis ist dies praktisch nicht machbar; die Konstruktion entsprechender Tiere würde viel zu lange dauern. Durch das Klonen ist nun die Möglichkeit gegeben, zunächst Zellen in der Zellkultur mit den gewünschten genetischen Veränderungen zu versehen, bevor aus ihnen mit Hilfe des kerntransferbasierten Klonens ein vielfach transgenes Tier regeneriert werden könnte. Aber auch wenn das ideale Spendertier auf diesem Wege geschaffen werden kann, wären damit noch nicht alle Probleme der Xenotransplantation gelöst. Die chronische Abstoßung bleibt vermut-

lich bestehen. Auch ist nicht gesichert, daß das Xenoorgan seine Funktion im Rezipienten tatsächlich erfüllt. Bestehen bleibt auch das Problem der möglichen Adaptation tierischer Viren an die menschliche Population. Zur Lösung der beiden zuletzt genannten Probleme kann das Klonen kaum etwas beitragen.

Wozu es aber möglicherweise einen großen Beitrag leisten könnte ist die Züchtung von humanem Ersatzgewebe. Hierzu sind prinzipiell zwei Wege denkbar: a. Mit Hilfe der Kerntransfermethode würde ein früher Embryo erzeugt. Aus diesem könnten in Kultur pluripotente embryonale Stammzellen gewonnen werden. Die Gewinnung solcher Zellen ist beim Menschen allerdings auch aus *in vitro*-gezeugten Embryonen noch nicht gelungen. Außerdem würde ein solches Verfahren die ethisch problematische Erzeugung und Verwertung eines menschlichen Embryos erfordern - es sei denn, es könnten Eizellen von Tieren als Empfänger der Zellkerne verwendet werden. Doch diese Entwicklung steht ganz am Anfang und beinhaltet eigene Probleme. b. Der zweite Weg liegt vermutlich in noch fernerer Zukunft und würde auf die Etablierung eines *in vitro*-Systems zur Dedifferenzierung und Redifferenzierung von somatischen Zellen hinauslaufen. Dadurch könnte das Zurücksetzen der Spezialisierung somatischer Zellen und ihre - mit zuvor isolierten Faktoren induzierte - Differenzierung *in vitro* erreicht werden, ohne daß ein Kerntransfer in eine Eizelle erfolgen oder ein Embryo erzeugt werden muß.

Untersucht wird auch, welche neuen Perspektiven das Klonen für die Gentherapie öffnet. Hier richtet sich die Hoffnung auf die Züchtung transgener pluripotenter Zellen, die als Vektoren für die Übertragung therapeutischer Gene dienen könnten. Die Entwicklung solcher Zellen ist jedoch auch mit Hilfe der Kerntransfermethode mit erheblichen Schwierigkeiten konfrontiert. Durch das Klonen eröffnet sich weiterhin die Möglichkeit, mitochondrial bedingte Krankheiten dadurch zu behandeln, daß der Zellkern eines betroffenen Embryos in die entkernte Eizelle einer gesunden Spenderin übertragen wird. Obwohl dieses Verfahren relativ einfach ist und weder das Klonen eines erwachsenen Menschen noch die Vervielfältigung von Embryonen beinhaltet, besteht sein Problem darin, daß es sich dabei um eine Keimbahnmanipulation handelt.

Ein letzter Bereich, in dem das Klonen in der anwendungsorientierten biomedizinischen Forschung möglicherweise nutzbringend eingesetzt werden könnte, ist die Herstellung von transgenen Tieren als Tiermodelle für menschliche Krankheiten. Erstmalig ließen sich auf diesem Wege auch Krankheitsmodelle in transgenen Großtieren schaffen, die je nach zu untersuchender Krankheit im Hinblick auf anatomische, physiologische oder genetische Charakteristika bisherigen Mausmodellen überlegen sein können. Inwieweit solche Modelle sich tatsächlich realisieren lassen, hängt nicht nur von verbesserten Kenntnissen über die Genetik von Großtieren ab, sondern vor allem auch von

den für den Umgang mit Großtieren notwendigen praktischen Gegebenheiten. Grundsätzlich muß jedoch bei der Konzeption von Tiermodellen sorgfältig geprüft werden, ob das Krankheitsmodell, das unter den bei dem betreffenden Tier gegebenen biologischen Voraussetzungen nach genetischen Eingriffen und Klonierung erzeugt werden kann, tatsächlich mit der beim Menschen vorfindbaren Krankheit vergleichbar ist.

Der Herstellung genetisch identischer Tiere mittels des Klonens zur vergleichenden Untersuchung von Arzneimitteln kommt vermutlich keine Bedeutung zu.

(3) Im dritten Teil der Untersuchung geht es spezifischer um die biologischen Risiken und technischen Grenzen des kerntransferbasierten Klonens. Die Erzeugung von Tieren mithilfe eines technischen Verfahrens, das in radikaler Weise die natürlichen Prozesse der Reproduktion und frühen Embryonalentwicklung manipuliert, provoziert weitreichende Fragen nach seinen Unsicherheiten, Risiken und Grenzen. Die Tatsache, daß die meisten der durch dieses Verfahren erzeugten Embryonen sich nicht weiterentwickeln, zeugt davon, daß das kerntransferbasierte Klonen ein höchst riskantes Verfahren ist.

Die Grundlagen für die Erörterung der hier zu behandelnden Fragen wurden im ersten Hauptteil bereits gelegt. Folgende Risiken für die klonierten Organismen wurden identifiziert: a. Veränderung von Imprinting- und Methylierungsmustern, wodurch die Expression wichtiger Proteine verändert werden kann; b. Verwendung von Zellen mit unbekanntem (somatischen) Mutationen, die das Entwicklungspotential eines Klonembryos beeinträchtigen können; c. Übertragung der Veränderungen auf nachfolgende Generationen; d. Bildung von neuen infektiösen Agentien durch Aktivierung endogener viraler Sequenzen. Zumindest aus der Perspektive dessen, was wir heute über die Komplexität der Prozesse während des Klonens wissen, werden auch seine Risiken von unabhängigen wirkenden Faktoren bestimmt, die schwer vorherzusehen und zu kontrollieren sind.

(4) Technikfolgenabschätzung bleibt in ihrer analytischen Tiefe beschränkt, wenn nicht auch die Alternativen zu der betrachteten Technik untersucht werden. Erst ein Vergleich verschiedener verfügbarer Optionen zur Bearbeitung einer Frage oder eines Problems ermöglicht ihre Bewertung.

Aus diesem Grunde wurde zunächst untersucht, welche Alternativen zum Klonen auf der methodischen Ebene existieren. Hier zeigt sich, daß es eine Querschnittstechnik ist, die in unterschiedlichen Bereichen zur Erzeugung von zellulären Studienobjekten, transgenen Tieren, embryonalem bzw. pluripotentem Gewebe, und nicht zuletzt auch zur Herstellung menschlicher Embryonen eingesetzt werden kann. Es erscheint uns deshalb nicht möglich, eine einzige methodische Alternative zu benennen, sondern die ver-

schiedenen Einsatzfelder des Verfahrens müssen separat untersucht werden. Vor allem im Hinblick auf die Erzeugung humanen Ersatzgewebes könnte die Entwicklung eines *in vitro*-Systems zur Zelldifferenzierung und Dedifferenzierung eine wissenschaftlich technische Option mit großen Potentialen zu sein, die das Entstehen und die Verwertung von menschlichen Embryonen bei der Erzeugung von Ersatzgewebe vermeiden helfen könnte. Entsprechende Forschungsaktivitäten sind aus unserer Sicht förderungswürdig.

Zum zweiten wurden konzeptionelle Alternativen im Bereich der entwicklungsbiologischen Grundlagenforschung und im Hinblick auf die Entwicklung von Tiermodellen für menschliche Krankheiten diskutiert. Es zeigt sich, daß dem dominierenden genetischen Paradigma in beiden Bereichen konkurrierende Konzepte gegenüber gestellt werden können, die von Wissenschaftlern selber artikuliert werden, und die alternative Interpretationen der Bedeutung von Genen bei Entwicklungs- und Krankheitsprozessen zur Folge haben. Ob und wie weitgehend diese Konzepte zu einer Veränderung des Methodenspektrums in der biomedizinischen Forschung oder gar dazu führen würden, daß das Klonen zwar als Methode zur Herstellung von Klonen, nicht aber als Methode zur Gewinnung relevanter biologischer oder medizinischer Erkenntnis angesehen wird, muß offen bleiben, denn der Forschungsprozeß wird zumindest ebenso sehr von methodischen, wie von konzeptionellen Innovationen vorangetrieben.

## 1 Einführung

Klone im Sinne von genetisch identischen Molekülen oder Zellen sind aus der modernen biologischen und medizinischen Forschung nicht mehr wegzudenken. Für Gentechniker, Molekular- und Zellbiologen sind sie Werkzeug und Studienobjekt zugleich. Ohne Klonierungstechniken läßt sich weder die Basensequenz eines Gens bestimmen noch ein menschliches Protein wie etwa Insulin in Bakterien herstellen, jedenfalls nicht mit den bislang üblichen Methoden. Klonierungstechniken gaben den biomedizinischen Wissenschaften in den letzten Jahren enormen Anschub.

Das Wort „Klon“ stammt aus dem Griechischen und bedeutet Sproß oder Zweig. In der Biologie versteht man unter einem Klon ein Individuum, das mit einem anderen im Idealfall genetisch identisch, also erbgleich, ist, oder eine Gruppe solcher genetisch identischer Individuen. Der Begriff ist mithin doppeldeutig – er bezeichnet einzelne Individuen wie auch eine Gruppe. Individuen in diesem Sinne können sein: DNA-Moleküle (molekulare Klone), einzelne Zellen (zelluläre Klone, zum Beispiel Einzeller wie Bakterien oder Kulturen von Zellen eines vielzelligen Organismus) oder vielzellige Organismen (beispielsweise aus Ablegern gezogene Pflanzen oder eineiige Zwillinge). Klone sind das Ergebnis ungeschlechtlicher Vermehrungsvorgänge, etwa einer Zellteilung oder der Aufspaltung eines frühen Embryos in zwei sich nebeneinander weiterentwickelnde Embryonen, wie es bei der Entstehung von eineiigen Zwillingen geschieht.<sup>1</sup>

Bisher waren für die biomedizinische Forschung vornehmlich molekulare und zelluläre Klone von Belang. Solche Klone erlauben die Analyse von DNA-Molekülen und die Untersuchung physiologischer und pathologischer Vorgänge auf Zellebene (etwa die Entartung einer normalen Zelle zur Krebszelle). Nur in der Masse erbgleicher Zellen oder DNA-Moleküle lassen sich Dinge erkennen, die auf der Ebene einer einzelnen Zelle oder eines einzelnen Nukleinsäuremoleküls kaum erfaßbar sind.<sup>2</sup>

Organismische Klone hingegen waren bislang von untergeordneter Bedeutung, nicht zuletzt deswegen, weil sie gerade bei Säugern recht schwierig zu erzeugen sind. Letzte-

---

<sup>1</sup> Ein weiterer ungeschlechtlicher Vermehrungsvorgang ist die Parthenogenese („Jungfernzeugung“), wie sie etwa bei bestimmten Insekten (beispielsweise Blattläusen) und manchen Reptilien vorkommt. Doch nicht zwangsläufig sind parthenogenetisch entstandene Nachkommen Klone ihrer Mutter. Wenn ihrer Entstehung eine Meiose vorausging, ist das Genom der Mutter halbiert und umsortiert, so daß die Sprößlinge nicht alle Allele der Mutter erben, mit ihr also nicht genetisch identisch sind.

<sup>2</sup> Mit der PCR-Methode (Polymerase-Kettenreaktion) lassen sich unter optimalen Bedingungen auch einzelne Zellen oder DNA-Moleküle untersuchen. Freilich ist die PCR strenggenommen ebenfalls ein Klonierungsvorgang: ein DNA-Molekülabschnitt wird identisch vervielfältigt. Nur geschieht dies hier rein enzymatisch; man kommt dabei, anders als bei den „klassischen“ Klonierungstechniken, ohne lebende Systeme aus.

res gilt trotz der klonierten Schafe Dolly und Polly und anderer geklonter Säuger nach wie vor. Gleichwohl zeigt Cumulina, die erste aus adulten Zellen geklonte Maus, daß die Technik zum Klonen von Säugetieren fortschreitet.

Zur Erzeugung organischer Klone bei Säugern gibt es prinzipiell zwei Wege.

- Zum einen das Embryosplitting, also die Durchtrennung eines frühen Embryos, in Nachahmung der natürlichen Entstehung eineiiger Zwillinge, die erstmals 1892 von Hans Driesch an frühen Seeigelembryonen durchgeführt wurde.
- Zum anderen ein Verfahren, das in der Natur ohne Beispiel ist: die Überführung eines diploiden Zellkerns in das Zytoplasma einer entkernten Eizelle. Der eingebrachte fremde Zellkern kann die Entwicklung der Eizelle zum Embryo steuern, mitunter auch bis zum ausgewachsenen Tier. Dieses besitzt dann die genetische Ausstattung des Organismus, aus dem der Zellkern stammt, und hat mit der ursprünglichen Eizelle – wenn man vom mitochondrialen Genom<sup>3</sup> absieht – genetisch nichts gemein. Es ist gleichsam ein verspäteter eineiiger Zwilling des Kernspenders.

Zumeist wird dabei von Zellkerntransplantation oder Zellkerntransfer gesprochen, obwohl bei der bislang bei Säugern gängigen Methode nicht allein der Zellkern transferiert wird. Vielmehr wird mittels elektrischer Impulse die gesamte zu klonende Zelle mit einer entkernten (genauer: ihrer Metaphaseplatte beraubten) reifen Eizelle verschmolzen; es gelangen also auch die Zytoplasmakomponenten der Spenderzelle in das Fusionsprodukt hinein. Auf diese Weise ist das Klonschaf Dolly erzeugt worden (Wilmut et al. 1997). Grundsätzlich ist die Methode bereits seit Mitte der achtziger Jahre verfügbar (Willadsen 1986). Schon vor Dolly sind Schafe, Rinder und andere Säuger nach dem gleichen Prinzip entstanden, allerdings nicht aus Zellen erwachsener Tiere.

Mit einer abgewandelten Methode (nicht durch Zellfusion, sondern durch Injektion weitgehend zytoplasmareiner Zellkerne in entkernte Eizellen) ist es Ryozi Yanagimachi von der Universität von Hawaii und seiner internationalen Arbeitsgruppe inzwischen auch gelungen, Mäuse aus adulten Zellkernen zu klonen, unter anderen besagte Cumulina (Wakayama et al. 1998). Das ist ein Ergebnis, das in seiner Bedeutung dem von Dolly kaum nachsteht, und ihn aus zwei Gründen vielleicht noch übertrifft: Zum einen galten gerade Mäuse nach bisheriger wissenschaftlicher Erfahrung als besonders schwer zu klonen; Fachleute hielten es für kaum möglich, von einer ausgewachsenen Maus

---

<sup>3</sup> Mitochondrien sind durch Membranen abgegrenzte Strukturen (Organellen) im Zytoplasma, die die Energieversorgung der Zelle sicherstellen und ein eigenes kleines Genom besitzen. Die meisten ihrer Funktionen werden jedoch vom Genom des Zellkerns gesteuert. Gleichwohl ist das mitochondriale Genom nicht unwichtig: Schädigungen darin können zu Krankheitsbildern führen. Bei der Kerntransfer-technik durch Zellfusion gelangen die Mitochondrien der Spenderzelle zwar ebenfalls in die entkernte Eizelle, diese steuert jedoch den weitaus größeren Anteil der Organellen zum entstehenden Embryo bei.

einen Klon herzustellen, jedenfalls nicht in praktikabler Weise<sup>4</sup>. Cumulina zeigt jedoch, daß die technischen Grenzen, die zunächst aufgrund speziesspezifischer Eigenarten gegeben waren, überwindbar sein können und daß vermutlich jedes Säugetier geklont werden kann, inklusive des Menschen.

Zum anderen ist Cumulina für die Grundlagenforschung insofern besonders bedeutsam, als sich an Mäusen weit bequemer, billiger und schneller Forschung betreiben läßt als an Schafen oder Rindern. Auch (und nicht zuletzt aus diesem Grund) ist das bisher angesammelte Grundlagenwissen, auf dem aufgebaut werden kann, bei Mäusen erheblich umfangreicher als bei jedem anderen Säuger. Das Klonen von Mäusen aus adulten Zellen eröffnet daher neue Wege, Klonierungstechniken zu verbessern, Risiken für die betroffenen Tiere zu untersuchen und grundlegende Fragen der Embryonalentwicklung sowie des beim Klonen notwendigen Rücksetzungs der Spezialisierung oder Differenzierung von Zellen zu erforschen.

Hintergrund bei der Erzeugung von Dolly war freilich nicht das Interesse an Grundlagenfragen, sondern die Produktion therapeutisch einsetzbarer Proteine mit Hilfe von transgenem Milchvieh. Transgene Tiere tragen ein oder mehrere künstlich eingebrachte Gene in ihrem Genom, die sie auch an die Nachkommen vererben können. Die Kerntransfertechnik hat zwar mit der Produktion transgener Tiere zunächst nichts zu tun; anders wird es jedoch, wenn zur Herstellung von Klonen Zellkerne von Zellen verwendet werden, die zuvor in Kultur genetisch manipuliert wurden. Wie sich gezeigt hat, ist dies möglich: Das Schaf Polly wurde aus einer solchen Zelle geklont und trägt das menschliche Gen für den Blutgerinnungsfaktor IX (Schnieke et al. 1997).

Möglicherweise lassen sich mit einem erweiterten Verfahren auch gezielt Gene von Großtieren ausschalten beziehungsweise neue Gene an bestimmte Stellen ihres Chromosomensatzes einführen. Diese Verfahren werden „Gen-Knockout“ und „Gen-Targeting“ genannt. Bei Mäusen wurden sie bereits erfolgreich angewandt („Knockout-Mäuse“). Das bei der Maus eingesetzte Verfahren konnte jedoch bislang nicht auf andere Säuger übertragen werden. Mit Hilfe des kerntransferbasierten Klonens rücken Gen-Targeting und Gen-Knockout nun auch bei Nutztieren in den Bereich der Machbarkeit. Dadurch ließen sich etwa Untersuchungsmodelle für menschliche Krankheiten schaffen, die in der Maus nur schlecht simuliert werden können, oder Schweine erzeugen, deren Organe nach Transplantation in den Menschen besser verträglich sind.

Noch ist unklar, wie realistisch diese Hoffnungen und Perspektiven sind. Unklar ist auch, mit welchen in der Biologie von Tieren begründeten Grenzen das Klonen kon-

---

<sup>4</sup> Siehe Interview mit Davor Solter in der *ZEIT* (Albrecht et al. 1998). Und Alan Colman, einer der von uns befragten Experten, meinte zu Cumulina: „I was quite surprised.“

frontiert sein wird, und welche Risiken es für die Tiere mit sich bringt. Die molekularen Vorgänge bei der Reprogrammierung differenzierter Zellkerne nach dem Transfer in Eizellen sind noch weitgehend ungeklärt, und die geringe Effizienz des Klonens ist ein Hinweis darauf, daß bei diesem Prozeß viele Fehler passieren können.

Diese Untersuchung hat zum Ziel,

1. den derzeitigen Stand der Kenntnis über die Grundlagen des Klonierens sowie die dabei relevanten biologischen Fragen darzustellen;
2. die Möglichkeiten und Grenzen des Klonens in der biomedizinischen Grundlagenforschung zu explorieren, wobei der Schwerpunkt auf den Fragen der Differenzierung und Dedifferenzierung von Zellen sowie der Embryonalentwicklung liegt;
3. die Möglichkeiten und Grenzen des Klonens in der angewandten medizinischen Forschung auszuloten, und zwar in den Bereichen des Gen-Pharmings, der Xenotransplantation, der Zelltherapie, der autologen Transplantation und der Gentherapie, sowie der präklinischen Forschung;
4. die bereits heute erkennbaren und aufgrund indirekter Hinweise möglichen biologischen Risiken des kerntransferbasierten Klonens für die betroffenen Tiere und Dritte zu untersuchen, sowie
5. der Frage nachzugehen, ob und wenn ja in welchem Bereich und auf welcher Ebene Alternativen zum Klonen vorhanden oder vorstellbar sind, die zumindest einen partiellen Verzicht auf dieses gesellschaftlich umstrittenen Verfahrens möglich erscheinen lassen.

Aufgabe dieser Untersuchung ist es nicht, die ethischen Aspekte des kerntransferbasierten Klonens und seiner Anwendungsmöglichkeiten zu untersuchen. Allerdings behalten sich die AutorInnen vor, auf Befunde oder Entwicklungen hinzuweisen, die in Hinblick auf eine nicht nur die biologischen oder medizinischen Fragestellungen betreffende Bewertung relevant sind.

## 2 Klonen in der biologischen und medizinischen Grundlagenforschung

### 2.1 Entwicklung des kerntransferbasierten Klonens

Bereits in den 30er Jahren hatte der deutsche Embryologe und Nobelpreisträger Hans Spemann die Idee, Kerne aus Zellen verschiedener Differenzierungsstadien in entkernte Eizellen einzubringen und deren Entwicklung zu beobachten. Ein solch „phantastisches“ Experiment, wie er selbst es nannte, sollte geeignet sein, das Entwicklungspotential differenzierter Zellkerne zu analysieren und nachzuprüfen, ob sie noch die komplette genetische Information besitzen. Dies war damals noch keineswegs klar. Freilich sah er kaum die technische Möglichkeit, ein derartiges Experiment durchzuführen<sup>5</sup>. Doch 1952 wurde Spemanns Gedanke von Robert Briggs und Thomas King am Leopoldfrosch *Rana pipiens* verwirklicht: Sie führten Zellkerne aus frühen Froschembryonen (im Blastulastadium) in Froscheier ein. Ihre Experimente führten immerhin zur Entwicklung von Kaulquappen (Briggs & King 1952). John Gurdon (1962, 1986) konnte schließlich beim Krallenfrosch *Xenopus laevis* mittels der Kerntransferprozedur auch adulte Frösche entstehen lassen. Dies geschah jedoch nur, wenn er Kerne aus Zellen von Embryonen bis hin zu frühen Kaulquappen verwendete. Kerne aus adulten Fröschen indes konnten die Entwicklung einer entkernten Eizelle nur bis zum Stadium der Kaulquappe steuern. Wie diese Experimente nahelegten, scheint das Potential eines Zellkerns die Entwicklung eines Lebewesens bis zum adulten Stadium zu steuern, und damit die Effizienz des kerntransferbasierten Klonens mit steigendem Differenzierungsgrad der Spenderzelle abzunehmen.

Bei Säugern gelang das kerntransferbasierte Klonen erst in den achtziger Jahren, und vor Dolly nur mit Kernen embryonaler Zellen. Den Anfang machten, wie es zunächst schien, Karl Illmensee von der Universität Genf und Peter Hoppe vom Jackson-Laboratorium in Bar Harbor (US-Bundesstaat Maine): 1981 behaupteten sie, ihnen sei es gelungen, drei Mäuse aus relativ weit entwickelten embryonalen Zellkernen zu klonen (Illmensee & Hoppe 1981). Doch konnten weder sie noch sonst jemand dieses Experiment erfolgreich wiederholen, so daß ihre Veröffentlichung bald als Betrug galt (Kolata 1997a S. 156 ff., Albrecht 1998). James McGrath und Davor Solter (1984a), seinerzeit am Wistar-Institut in Philadelphia (Pennsylvania), kamen sogar zu dem Ergebnis, daß es biologisch unmöglich sei, Mäuse selbst aus Kernen von frühen embryonalen Zellen (Blastomeren) zu klonen. Damals nahm man allgemein an, dies gelte für

---

<sup>5</sup> Spemann 1936, zitiert nach Kolata 1997a, S. 82f

alle Säuger. Gleichwohl erwies sich das Klonen von Säugern – auf Basis und unter Weiterentwicklung der von McGrath und Solter (1983) entwickelten Kerntransfertechnik – schließlich doch als durchführbar.

Zunächst allerdings nur mit embryonalen Zellen bzw. Zellkernen. Als erster hatte Steen Willadsen am AFRC-Institut für Tierphysiologie in Cambridge (UK) bei Schafen Erfolg: Er fusionierte Blastomeren aus Embryonen des 8-Zell-Stadiums mit entkernten Oozyten und gewann aus diesem Experiment offensichtlich gesunde Lämmer (Willadsen 1986). Kurz darauf zog die Arbeitsgruppe um Randall Prather und Neil First von der Universität Wisconsin in Madison mit Rindern nach: Ihr gelang es, mittels der Kerntransfertechnik Kälber aus Blastomeren des 8- bis 16-Zell-Stadiums zu klonen (Prather et al. 1987). Stephen Stice und James Robl von der Universität Massachusetts in Amherst dokumentierten im anschließenden Jahr das Klonen von Kaninchen aus Blastomerenkernen des 8-Zell-Stadiums (Stice & Robl 1988). Ebenso gelang das Klonen von Schweinen aus Blastomerenkernen des 4- bis 8-Zell-Stadiums (Prather et al. 1989, Robl & Stice 1989), von Mäusen aus solchen des 2-, 4- und 8-Zell-Stadiums (Tsunoda et al. 1987, Kono et al. 1992, Cheong et al. 1993), von Ziegen aus 32-Zell-Blastomeren (Zhang et al. 1991, Zhang & Li 1998) und schließlich auch von Primaten: Die Gruppe um Don Wolf vom Oregon Regional Primate Research Center in Beaverton klonete im letzten Jahr Rhesusaffen aus Blastomerenkernen des 4- bis 8-Zell-Stadiums (Meng et al. 1997).

Doch nicht nur die Zahl der erfolgreich durch Kerntransfer geklonten Säugerarten stieg, auch bei der Verwendung von Spenderzellkernen aus weiter differenzierten Zellen wurden Fortschritte gemacht. Bei den obigen Beispielen stammen die Spenderkerne noch aus frühen Blastomeren, also aus Zellen, die bei den ersten Furchungsteilungen einer befruchteten Eizelle entstehen. Solche Blastomeren sind in der Regel ohnehin totipotent: Wenn sich etwa die Blastomeren eines 4-Zell-Säugerembryos voneinander lösen, kann sich theoretisch aus jeder von ihnen noch ein vollständiges Tier entwickeln<sup>6</sup>. Man könnte also zur Gewinnung von Klonen aus einem 4-Zell-Embryo, oft auch noch aus einem 8-Zell-Embryo, diesen einfach durchtrennen und wäre auf die Kerntransfertechnik gar nicht angewiesen. Anders wird es, wenn der Embryo sich weiterentwickelt und an Zellzahl zunimmt: Irgendwann verlieren seine Zellen ihre ursprüngliche Totipotenz – das heißt, eine solche Zelle ist dann alleine und aus sich heraus nicht mehr imstande, sich zu einem ganzen Tier zu entwickeln. Derartige Zellen haben begonnen, sich zu differenzieren, also bestimmte Entwicklungsbahnen einzuschlagen: Ihnen ist nunmehr vorherbestimmt, ob ihre Tochterzellen sich an der Plazenta und an

---

<sup>6</sup> Ausführlichere Darstellungen und Diskussionen zur Totipotenz von Blastomeren finden sich bei Beier 1996, Kollek und Held 1997, und Kollek 1998b.

der Fruchtblase beteiligen oder am eigentlichen Fetus. Und Zellen wiederum, die am eigentlichen Fetus partizipieren werden, schlagen alsbald Entwicklungswege ein, die ihre Nachkömmlinge etwa zu Haut- oder Nervenzellen, zu Muskel- oder Knochenzellen oder zu Zellen des Verdauungstrakts werden lassen. Doch wie sich zeigte, bewahren die Kerne von Zellen fortgeschrittener Embryonen offenbar ihr Potential zur Totipotenz und können, in eine Eizelle eingebracht, diese Totipotenz wiedergewinnen:

So erwiesen sich bei Kaninchen Kerne aus 32- bis 64-Zell-Embryonen (Yang et al. 1992) und bei Rindern Kerne aus 48- bis 64-Zell-Embryonen (Bondioli et al. 1990) noch als fähig, die Entwicklung einer Eizelle zumindest bis zur Geburt zu steuern. Gleiches zeigte sich für Kerne aus der inneren Zellmasse (IZM) von Blastozysten<sup>7</sup> aus Schafen (Smith & Wilmut 1989) und Rindern (Sims & First 1994, Keefer et al. 1994, Collas & Barnes 1994). Ferner gelang es, embryonale Zellen von Rindern und Schafen in Kultur zu vermehren und solche kultivierten Zellen erfolgreich zum kerntransferbasierten Klonen einzusetzen (Sims & First 1994, Campbell et al. 1996a, Wells et al. 1997). Damit zeichnete sich bereits die Möglichkeit ab, Zellen vor dem Kerntransfer in Kultur genetisch zu manipulieren (siehe Abschnitt 3).

Und schließlich demonstrierten Ian Wilmut und seine Mitarbeiter vom Roslin-Institut bei Edinburgh und von der Firma PPL Therapeutics, daß nicht nur Kerne aus frühen embryonalen, sondern auch aus fetalen und sogar adulten Zellen nach Transfer in Eizellen ihre ursprüngliche Totipotenz wiedergewinnen können (Wilmut et al. 1997): Sie kloneten Schafe aus Fibroblasten (Bindegewebszellen), die aus Feten<sup>8</sup> stammten, sowie aus Euterzellen eines bereits erwachsenen Schafes – letzteres Experiment ließ Dolly entstehen. Damit hatte Wilmut ein Dogma umgestoßen: Zuvor galt die Lehrmeinung, daß das Genom einer ausdifferenzierten Zelle nicht mehr in den undifferenzierten Embryonalzustand rückversetzt werden kann.

Da Dolly das einzige Tier war, das sich aus 277 Transferversuchen mit adulten Euterzellen erzeugen ließ, wurden freilich rasch Zweifel laut, ob die Spenderzelle wirklich ausdifferenziert war. Wilmut selbst räumte ein, Dolly könne aus einer relativ undiffe-

---

<sup>7</sup> Die Blastozyste ist das zweite Stadium der Embryonalentwicklung bei Säugern nach der anfänglichen himbeerähnlichen Morula (Maulbeerkeim): Die aus den ersten Furchungsteilungen entstandene Morula kompaktiert sich, bildet in ihrem Innern ein flüssigkeitsgefüllte Höhle (Blastocoel) und wird dadurch zur Blastozyste. Die inneren Zellen der vormaligen Morula sammeln sich an einem Randbereich des Blastocoels und bilden dort die innere Zellmasse (IZM), auch Embryonalknoten genannt. Aus der IZM entwickelt sich der eigentliche Fetus und schließlich das Neugeborene (Tier oder Mensch), während die äußeren Zellen der Blastozyste den Trophoblasten (oder das Trophektoderm) bilden, aus dem Teile der Fruchtblase und der Plazenta hervorgehen. Damit wird eine erste Aufspaltung unterschiedlich differenzierter Zellen im Embryo augenfällig.

<sup>8</sup> Als Fetus wird eine Leibesfrucht bezeichnet, deren Organe bereits angelegt sind; vorher nennt man die Frucht Embryo. In einem Fetus haben also bereits weitreichende Differenzierungsvorgänge stattgefunden.

renzierten Stammzelle des Eutergewebe entstanden sein. Andere mutmaßten sogar, sie sei fetalen Ursprungs, da das Schaf, das die Euterzellen lieferte, zum Zeitpunkt der Gewebentnahme trächtig war. Fetale Zellen können in den mütterlichen Organismus übertreten und dort vagabundieren, so daß auch im Eutergewebe von Dollys genetischer „Mutter“ (oder besser: älterer Zwillingschwester) fetale Zellen vorhanden gewesen sein könnten. Eine solche könnte mithin auch Dollys Ursprungszellkern geliefert haben. Zudem sei ein einziger Erfolg unter mehreren hundert Versuchen kein Beweis, sondern eher als Anekdote zu werten (Sgaramella et al. 1998; Kommentare: Butler 1998a, Pennisi 1998a). Gleichwohl sind viele Fachleute der Überzeugung, daß an Dollys adultem Ursprung wenig Zweifel bestehen, so etwa der schon erwähnte Pionier der Kerntransfertechnik Davor Solter (heute am Max-Planck-Institut für Immunbiologie in Freiburg) in einem Interview in der ZEIT (Albrecht et al. 1998). In gleicher Weise äußerten sich James Robl, dem als erstem das Klonen von Kaninchen gelungen war, sowie David Wells vom Ruakura-Forschungszentrum in Hamilton, Neuseeland, und Jean-Paul Renard vom INRA-Forschungszentrum in Jouy-en-Josas bei Paris, die beide daran arbeiten, das Dolly-Experiment an Rindern zu wiederholen (Butler 1998a). Inzwischen ist Dollys DNA genauer untersucht worden, und aus den Ergebnissen folgt, daß sie mit an Sicherheit grenzender Wahrscheinlichkeit das ist, was von ihr behauptet wird: der Klon eines erwachsenen Säugetiers (Ashworth et al. 1998, Signer et al. 1998, Solter 1998). Zudem gibt es aus Frankreich und Japan Meldungen über aus adulten Zellkernen geklonte Kälber<sup>9</sup>. Wie schon eingangs bereits erwähnt, ist nunmehr auch das Klonen von Mäusen aus adulten Zellkernen gelungen (Wakayama et al. 1998), was zuvor als zwar nicht ausgeschlossen, aber impraktikabel galt. Gerade angesichts dieses letzteren Ergebnisses scheint es nunmehr möglich, jedweden Säuger einschließlich des Menschen mittels der Kerntransfertechnik aus adulten Zellen zu klonen.

## 2.2 Differenzierung, Dedifferenzierung und Embryonalentwicklung

Zu den biologischen Grundvorgängen, zu deren Verständnis die Methode des kerntransferbasierten Klonens beitragen kann, zählen zwangsläufig solche, die mit dem Klonen selbst zu tun haben, es ermöglichen oder ihm entgegenstehen. Die betreffenden Prozesse sind für die Entwicklung von Säugetieren von feudamentaler Bedeutung, denn letztlich handelt es sich teilweise um genau diejenigen, die auch aus einer normalen Zygote einen vielzelligen Organismus entstehen lassen: Prozesse der Differenzierung, der frühen Embryonalentwicklung, der gesteuerten Aktivierung und Inaktivierung von Genen.

---

<sup>9</sup> Butler 1998b, Saegusa 1998a, *Nature* 394 S. 114, *New Scientist* vom 21.3., 18.4., 11.7. und 25.7.1998.

Nur daß beim Klonen aus differenzierten Zellen zusätzlich ein umgekehrter Vorgang vonstatten geht: Das Genom des Donorzellkerns muß seine Spezialisierung verlieren – die empfangende Eizelle muß es „dedifferenzieren“ oder „reprogrammieren“, ihm die Fähigkeit zurückverleihen, künftig alle Programme auszuführen, die bei der Entwicklung des geklonten Tieres gebraucht werden.

Hinzu kommt, daß die Technik des Kerntransfer-Klonens selbst eine Vielzahl neuer Fragen aufgeworfen hat, die sich möglicherweise nur mit Hilfe ebendieser Technik beantworten lassen. Damit erweist sich das Klonen als eine wissenschaftlich-methodische Innovation, mit der alte Fragen der Zelldifferenzierung und -dedifferenzierung erstmals der Bearbeitung auf zellulärem Niveau zugänglich werden, die gleichzeitig aber auch eine Fülle von neuen Fragen aufwirft. Das schließt nicht generell aus, daß es keine anderen Methoden gibt, um die genannten Prozesse zu untersuchen (vgl. Abschnitt 5); dennoch zeichnet sich ab, daß das gelungene Klonen aus differenzierten Zellen bzw. Zellkernen eine Art von Initialfunktion für die Untersuchung von Differenzierungsprozessen auf molekularer Ebene hat, deren Potentiale und Grenzen im folgenden dargestellt und diskutiert werden sollen. Dies setzt allerdings die grundsätzliche Akzeptanz einer solchen Forschung voraus, deren Erörterung nicht Aufgabe dieser Studie ist.

### **2.2.1 Molekulare Prozesse bei der Zelldifferenzierung: Sachstand**

Die Diskussion, ob Dolly „echt“ sei oder, wie in der *ZEIT* formuliert, eine „Ente“ (Albrecht 1998), ob es also möglich ist, ganze Säugetiere aus ausdifferenzierten adulten Zellkernen zu klonen, dürfte spätestens mit der Klonmaus Cumulina ihr Ende gefunden haben. Der Streit hatte ohnehin eher akademischen Charakter. Denn grundsätzlich war die alte Lehrmeinung, Zellen verlören im Verlauf der Differenzierung unwiederbringlich ihre Totipotenz, schon dadurch unterminiert, daß aus fetalen Zellen mittels Kerntransfer Tiere geklont werden können, was nie jemand angezweifelt hat.

Fetale Zellen sind zwar nicht terminal differenziert, also noch nicht am Endpunkt ihrer Entwicklung angelangt, doch haben sie bereits wesentliche Differenzierungsschritte durchlaufen – sie sind, anders als frühe embryonale Blastomeren, nicht mehr totipotent. Um so mehr gilt dies für ausdifferenzierte adulte Zellen. Kerne aus beiderlei Zellen können also durch Transfer in Eizellen ihren totipotenten Embryonalzustand zurückgewinnen. Dies zeigt, daß Differenzierungsvorgänge nicht unumkehrbar sind. Ob man allerdings Techniken entwickeln können wird, um jedweden terminal differenzierten Zellkern eines jeden Säugers wieder in den entwicklungs offenen Anfangszustand zurückzubringen, sei dahingestellt und ist nicht vorauszusehen, wohl auch eher zu bezweifeln. Denn offensichtlich gibt es tierartsspezifische Unterschiede bei der Effizienz des

kernttransferbasierten Klonens (siehe unten), und offensichtlich ist es leichter, ein Tier aus einer embryonalen Zelle zu klonen als aus einer fetalen, und fetale Zellen wiederum scheinen dazu besser geeignet als adulte, zumindest nach der bisherigen Erkenntnislage. Zudem zeigen verschiedene adulte Zelltypen unterschiedliche Effizienzen als Kernspender fürs Klonen (Wakayama et al. 1998). Beim kernttransferbasierten Klonen herrscht noch, überspitzt gesagt, das Prinzip des Ausprobierens – wenn's klappt, ist's gut, warum es klappt (oder auch nicht), wird später untersucht.

Daher ist noch weitestgehend unklar, welche Auswirkungen die Klonprozedur auf die Entwicklung des dadurch entstandenen Embryos haben kann. Ebenso ist das vorhandene Wissen um mögliche Gefahren und Folgen des Verfahrens für ein geklontes Tier und dessen eventuelle Nachkommen sehr dürftig. Unbekannt ist, durch welche molekularen Mechanismen differenzierte Zellkerne nach ihrem Transfer in Eizellen in den undifferenzierten Embryonalzustand rückprogrammiert werden. Informationen darüber lassen sich bislang nur indirekt aus dem, was über Differenzierungsvorgänge bekannt ist, und aus Beobachtungen, wie sich ein eingebrachter Zellkern in der aufnehmenden Eizelle verhält, erschließen. Welche molekularen Entgleisungen dabei auftreten können, ist gänzlich unklar. Daß offensichtlich Fehler passieren, wird allein schon an der Tatsache deutlich, daß Hunderten von Kerntransfers nur wenige Geburten von Klontieren gegenüberstehen (Wilmut et al. 1997, Wakayama et al. 1998), daß Mißbildungen auftreten und selbst kurz vor und kurz nach der Geburt die geklonten Tiere noch absterben können (Campbell et al. 1996b, Schnieke et al. 1997; Ian Wilmut, persönliche Mitteilung) (vgl. auch Abschnitt 4).

Differenzierung ist ein Vorgang, durch den Zellen innerhalb einer Entwicklungslinie allmählich ihre Gestalt verändern. Als Ergebnis entstehen schließlich terminal differenzierte Zellen, die im ausgewachsenen Körper bestimmte Funktionen erfüllen – Nervenzellen, Hautzellen, Leberzellen, Darmzellen, Muskelzellen und viele andere Zelltypen mehr. Was etwa eine Nervenzelle zu dem macht, was sie ist, sind u.a. die Gene, die sie abliest: Heutiger Theorie zufolge exprimiert sie im wesentlichen nur das Sortiment von Genen, deren Produkte sie für ihre Funktionen benötigt, den Rest des Genoms ignoriert sie. Entsprechendes gilt für alle anderen Zelltypen. Grundsätzlich besitzen alle Zellen eines Organismus dasselbe Genom, also – von spontanen Mutationen abgesehen – dieselbe DNA-Sequenz in ihrem Chromosomensatz<sup>10</sup>. Spemann wußte das seinerzeit noch nicht. Das von ihm vorgeschlagene „phantastische Experiment“ des Kerntransfers in entkernte Eizellen ist nun inzwischen mehrfach durchgeführt und zeigt, daß der Infor-

---

<sup>10</sup> Ausnahmen bei Säugern sind: reife Keimzellen, bei denen der Chromosomensatz halbiert ist, reife Lymphozyten, die ihre Gene für Antikörper beziehungsweise T-Zell-Rezeptoren umgebaut haben, und Erythrozyten und Thrombozyten, die ihren Kern verlieren und somit gar kein Genom mehr besitzen.

mationsgehalt des Genoms im Zuge der Differenzierung (bis auf die erwähnten Ausnahmen) offenbar grundsätzlich erhalten bleibt.

Einer der springenden Punkte ist also, wie eine gegebene Zelle den Informationsgehalt ihres Genoms verwertet – auf welche Weise sie selektiv abliest. Nach dem, was wir heute wissen, spielen dabei verschiedene Mechanismen mit, die ineinandergreifen und sich gegenseitig beeinflussen. Dazu gehören im wesentlichen (Lewin 1998a, S. 681-710):

- Wechselwirkungen zwischen transkriptionsregulierenden Proteinen (Transkriptionsfaktoren)<sup>11</sup> und Kontrollabschnitten auf der DNA (Enhancern und Promotoren),
- chemische Modifikationen der DNA (Methylierung), die deren eigentlichen Informationsgehalt unberührt lassen, nicht aber dessen Umsetzung, und
- die Verpackungsweise der DNA im Chromatin<sup>12</sup> und damit die Erreichbarkeit eines gegebenen Gens für den zellulären Transkriptionsapparat.

Eine differenzierte Zelle produziert ein bestimmtes Sortiment von allgemeinen und gewebespezifischen Transkriptionsfaktoren, mit deren Hilfe sie diejenigen Gene abliest, die sie für ihre Funktionen und für ihr Überleben braucht. Diese Gene liegen in der Regel in einer aufgelockerten Chromatinstruktur vor und sind zumeist nicht oder nur gering methyliert. Andere, nicht benötigte Gene hingegen sind häufig hypermethyliert und befinden sich in einer stärker kondensierten Chromatinstruktur – sie sind gleichsam in Schubladen verschlossen und für den Ablese- oder Transkriptionsapparat nicht mehr zugänglich. Allerdings gibt es Ausnahmen: Mitunter kann ein Transkriptionsfaktor auch einen Promotor erkennen, der im Chromatin eng eingebunden ist, nämlich dann, wenn die Erkennungsstrukturen des Promotors innerhalb des Chromatins so präsentiert werden, daß der Transkriptionsfaktor trotzdem binden kann (Piña et al. 1990). Dabei kann es zu Strukturveränderungen im Chromatin kommen und das betreffende Gen aktiviert werden (Truss et al. 1994). Auf diese Weise lassen sich verschlossene „Genomschubladen“ offenbar wieder öffnen.

Ein weiterer Punkt, der bei der Differenzierung von Belang sein könnte, ist die Organisation der DNA in Domänen. Viele Befunde sprechen dafür, daß die DNA abschnittsweise am Proteinskelett des Zellkerns (Kernmatrix) verankert ist. Ein solcher

---

<sup>11</sup> Die Ablesung von Genen wird als Transkription bezeichnet.

<sup>12</sup> DNA ist im Zellkern mit Histonen und anderen Proteinen zum Chromatin komplexiert. Die Packungsweise des Chromatins kann relativ dicht oder eher aufgelockert sein, und viele Hinweise sprechen dafür, daß die Chromatinstruktur eines Gens oder einer ganzen chromosomalen Domäne die Ablesbarkeit der enthaltenen genetischen Information beeinflusst. Eine aufgelockerte Chromatinstruktur begünstigt die Transkription, stark kondensiertes Chromatin (Heterochromatin) dagegen verhindert sie. So ist zum Beispiel bei weiblichen Säugern eines der beiden X-Chromosomen inaktiv, und diese Inaktivierung geht mit einer dichten Chromatinpackung und DNA-Methylierung einher. (Das inaktive X-Chromosom ist bei geeigneter Anfärbung als punktförmiges Barr-Körperchen in weiblichen Interphase-Kernen lichtmikroskopisch erkennbar [Barr 1959].)

DNA-Abschnitt repräsentiert häufig eine chromosomale Domäne, die einer gemeinsamen Regulation unterstehen kann, zum Beispiel über eine Locus-Kontrollregion, wie sie für die benachbart gelegenen Globin-Gene bekannt ist. Mitunter sind chromosomale Domänen durch „Abschirmungssequenzen“ (Isolatoren) von Nachbardomänen abgegrenzt. Solche Isolatoren verhindern, daß regulatorische Wirkungen von einer Domäne in die nächste übergreifen (Lewin 1998a, S. 700ff.).

Eine differenzierte Zelle ist also durch einen bestimmten Satz von Transkriptionsfaktoren, ein bestimmtes Methylierungsmuster ihrer DNA und eine bestimmte Struktur und Organisation ihres Chromatins gekennzeichnet. Dadurch unterscheidet sie sich von Zellen anderer Gewebe, und dadurch ist gewährleistet, daß sie nur die Gene exprimiert, die sie benötigt. Gleichwohl ist dieser differenzierte Zustand des Genoms nicht starr: Wenn man etwa unterschiedliche somatische Zelltypen miteinander fusioniert, beispielsweise eine Muskelzelle mit einer Zelle aus einem anderen Gewebe, können Transkriptionsfaktoren der Muskelzelle im Zellkern des Fusionspartners muskelspezifische Gene aktivieren (Blau et al. 1985). Auf ähnliche Weise lassen sich auch Globin-Gene in Kernen von Zellen einschalten, die nicht der Erythrozyten-Linie angehören (Baron & Maniatis 1986.)

Fusioniert man nun eine differenzierte Zelle mit einer entkernten Eizelle, geschieht offenbar entsprechendes: Man nimmt an, daß zytoplasmatische Faktoren der Eizelle das eingebrachte Genom reprogrammieren, so daß es seinen spezialisierten Zustand verliert, sein derzeitiges Expressionsverhalten also einstellt und in die Lage versetzt wird, künftig wieder alle Expressionsmuster auszuführen, die bei der Entwicklung des Embryos und später im ausgewachsenen Tier gebraucht werden<sup>13</sup>. Bei einigen früh in der Embryonalentwicklung exprimierten Genen konnte das Ergebnis der Reprogrammierung direkt beobachtet werden. So können Kerne aus späteren Embryonalzellen der Maus ein im 2-Zell-Stadium exprimiertes Gen (das sie selbst also bereits abgeschaltet haben) nach dem Transfer in eine entkernte befruchtete Eizelle zur richtigen Zeit wieder aktivieren (Latham et al. 1991). Ein anderes Gen bei Rindern, das erst im 32-Zell-Stadium zur Expression gelangt, wird nach dem Transfer von Kernen aus diesem Stadium in der Eizelle zunächst folgerichtig aus- und bei Erreichen des 32-Zell-Stadiums erwartungsgemäß wieder eingeschaltet (van Stekelenburg-Hamers et al. 1994). Freilich kann die Sachlage anders aussehen, wenn man eine Vielzahl von Genen beziehungsweise Proteinen gleichzeitig untersucht: Nach Transfer von Kernen aus 8-Zell- in 1-Zell-Embryonen der Maus stellten Solter und Mitarbeiter Expressionsveränderungen bei mindestens 50 Proteinen fest (Latham et al. 1994).

---

<sup>13</sup> Zumindest geschieht das ansatzweise, denn in den meisten Fällen gelangt ein durch Kerntransfer erzeugter Embryo nicht zur vollständigen Entwicklung. Vgl. Abschnitt 4.

Nach der Fusion zwischen entkernter Oozyte und Kernspenderzelle lassen sich eine Reihe von morphologischen Veränderungen des eingebrachten Zellkerns beobachten: Typischerweise kommt es zu einem Abbau der Kernhülle und zu einer Kondensation der Chromosomen, der Kern bildet sich dann neu und schwillt auf ein Vielfaches seiner ursprünglichen Größe an (First & Prather 1991, Collas & Robl 1991, Fulka et al. 1996). Bei der Injektionsmethode, die bei Cumulina angewendet wurde, geschieht zunächst entsprechendes – Auflösung des eingebrachten Kerns und Chromosomenkondensation. Wakayama et al. (1998) berichten dann jedoch über die Neubildung zweier Kerne, die sie als Pseudovorkerne bezeichnen. Das entspräche der Situation nach einer normalen Befruchtung, bei der das befruchtende Spermium einen Kern mit einfachem Chromosomensatz mitbringt, die Eizelle besitzt bereits einen solchen. Somit hat eine befruchtete Eizelle zwei Vorkerne oder Pronuclei. Offenbar besteht die Tendenz, nach Injektion eines diploiden Kerns in eine kernlose Eizelle diesen Zustand nachzuahmen, daher wählten Wakayama et al. vermutlich diesen Begriff.

Die Auflösung des eingebrachten Zellkerns und die Chromosomenkondensation erfolgt offenbar unter Einfluß eines Faktors mit dem Kürzel MPF (für *maturation promoting factor* oder *M-phase promoting factor*) (Fulka et al. 1996), der den Eintritt einer Zelle in die Mitose kontrolliert (Lewin 1998a, S. 880ff.). Benutzt man hingegen Eizellen, die einige Zeit vor der Fusion aktiviert wurden<sup>14</sup>, unterbleiben Auflösung der Kernhülle und Chromosomenkondensation, da in solchen Eizellen der MPF-Spiegel bereits gesunken ist (Fulka et al. 1996). Gleichwohl können sich aus solchen Fusionsprodukten ebenfalls lebensfähige Embryonen entwickeln, doch offenbar mit geringerer Effizienz als wenn man Eizellen mit hoher MPF-Aktivität verwendet (Campbell et al. 1996a). Vermutlich läßt die MPF-gesteuerte Auflösung des eingebrachten Zellkerns dessen Genom sogleich mit Proteinfaktoren der empfangenden Oozyte in Kontakt geraten, so daß im Vergleich zu MPF-verarmten Empfängeroozyten mehr Zeit zur Verfügung steht, um das Donorgenom zu reprogrammieren. Dies ist offenbar dann besonders wichtig, wenn man einen differenzierten (fetalen oder adulten) Zellkern in die Eizelle einbringt.

Das Zeitfenster, innerhalb dessen die Reprogrammierung des Spendergenoms erfolgen kann, scheint beim kerntransferbasierten Klonen von großer Bedeutung zu sein, zumal bei der Verwendung differenzierter Donorzellen. Vermutlich muß die Reprogrammierung abgeschlossen sein, bevor die Aktivierung und Transkription des embryoeigenen (beim kerntransferbasierten Klonen also des Donor-)Genoms einsetzt (Ste-

---

<sup>14</sup> Aktivierung einer Eizelle bedeutet, sie zur Teilung anzuregen. Dies kann künstlich durch einen Stromimpuls oder durch andere Behandlungen, etwa mit bestimmten Salzlösungen, geschehen. (Natürlicherweise erfolgt die Aktivierung durch den Befruchtungsvorgang). Die Teilung beginnt nicht sofort nach der Aktivierung, so daß man auch nach der Aktivierung noch eine Fusion mit einer Kernspenderzelle durchführen kann.

wart 1997). Während der ersten Furchungsteilungen einer befruchteten Eizelle (Zygote) wird nämlich das Genom nicht oder kaum abgelesen, da die Eizelle schon vor der Befruchtung hinreichend mit den erforderlichen (vom mütterlichen Genom stammenden) RNA- und Protein-Molekülen ausgestattet worden ist, so daß die ersten Schritte der Embryonalentwicklung ohne Transkription ablaufen können. Doch nach einiger Zeit muß der Embryo auf sein eigenes Genom zurückgreifen, um neue Proteine synthetisieren zu können. Der Übergang zur embryonalen Genexpression erfolgt bei unterschiedlichen Säugern zu verschiedenen Zeiten.

Bei der Maus beginnt die Expression des embryonalen Genoms bereits im 2-Zell-Stadium. In Rindern, Schafen und Kaninchen hingegen setzt die embryonale Transkription heutigem Wissen zufolge erst im späten 4-Zell-Stadium ein und erreicht ihr Maximum im 8- bis 16-Zell-Stadium (Prather & First 1990). Dieser Unterschied könnte ein Grund dafür sein, daß es bislang so schwierig war, Mäuse durch Kerntransfer zu erzeugen: Vor Cumulina ist es nicht gelungen, Donorzellen jenseits des embryonalen 8-Zell-Stadiums zum Klonen von Mäusen zu verwenden (Cheong et al. 1993, Tsunoda & Kato 1993). Die frühe Aktivierung des embryonalen Genoms in der Maus läßt nur wenig Zeit, um ein Donorgenom aus einer differenzierten Zelle rechtzeitig und vollständig zu reprogrammieren. Daher erscheint die nach den früheren Ergebnissen leichtere Klonierbarkeit von Rindern und Schafen nur folgerichtig: Immerhin stehen drei bis vier Zellteilungen zur Verfügung, um das Donorgenom wieder in den undifferenzierten Zustand zu versetzen. Dabei wird jedesmal die Kernhülle aufgelöst, so daß Proteinfaktoren aus dem Zytoplasma erleichterten Zugang zur DNA erhalten. Zudem finden damit drei bis vier DNA-Replikationsvorgänge je sich ergebender Zelle statt, und man nimmt an, daß während einer Replikation die Chromatinstruktur des Genoms relativ leicht umgeformt werden kann (Lewin 1998a, S. 696ff.).

Der Trick bei Cumulina war wahrscheinlich der, die Eizelle erst einige Stunden nach der Kerninjektion zu aktivieren (Wakayama et al. 1998). Damit wurde das Zeitfenster zur Reprogrammierung offenbar erweitert.

Ziegen entsprechen bei der embryonalen Genomaktivierung den Mäusen, Schweine nehmen eine Zwischenstellung zwischen Mäusen und Schafen ein: Ihr embryonales Genom erreicht den Höhepunkt seiner Transkriptionsaktivität im 4-Zell-Stadium (Prather et al. 1987). Der Mensch wiederum entspricht, wie in so vielen physiologischen Dingen, eher dem Schwein: Die transkriptionelle Aktivierung des Genoms von Humanembryonen erfolgt im 4- bis 8-Zell-Stadium (Braude et al. 1988). Schweine ließen sich unseres Wissens bislang nur aus embryonalen Zellen klonen (Prather et al. 1989, Robl & Stice 1989), nicht aus fetalen oder adulten. Doch nach Cumulina ist anzunehmen, daß auch letzteres über kurz oder lang gelingen wird.

Zwei weitere Umstände scheinen die Effizienz des Klonens aus differenzierten Zellen günstig zu beeinflussen. Zum einen: Während man bei früheren Kerntransferexperimenten befruchtete Eizellen (Zygoten) als Empfänger verwendet hat (McGrath & Solter 1983, 1984a), benutzt man heute in der Regel unbefruchtete. Dadurch verlängert sich wahrscheinlich die zur Verfügung stehende Reprogrammierungszeit. Überdies ist denkbar, daß ein Großteil der zur Reprogrammierung notwendigen (hypothetischen) zytoplasmatischen Proteinfaktoren nach der Befruchtung vom Genom der beiden Vorkerne abgefangen werden (Solter 1996). Folglich würden in einer Zygote weniger „Reprogrammierungsfaktoren“ bereitstehen als in einer unbefruchteten Eizelle; mithin wäre letztere besser geeignet, einen differenzierten Spenderzellkern in den entwicklungs-offenen Anfangszustand rückzusetzen. Die bisherige Erfolgsbilanz spricht für diese Sichtweise.

Zum anderen ist offenbar die Synchronisation der Zellzyklen<sup>15</sup> von Donorzelle und Empfängeroocyte wichtig (Collas et al. 1992a, Fulka et al. 1996, Stewart 1997). Wenn der Donorzellkern in eine Oocyte gelangt, die MPF-Aktivität besitzt (siehe oben), wird eine Zellteilungsrunde initiiert (Campbell et al. 1993). Befand sich der Donorzellkern vor der Fusion mit der Oocyte seinerseits in der S-Phase, so war er bereits partiell tetraploid: Eine neue Replikationsrunde, die vor dem Abschluß der bereits begonnenen einsetzt, kann daher zu chromosomalen Aberrationen und Aneuploidien führen (Collas et al. 1992b), welche die Entwicklung des Embryos beeinträchtigen und schließlich zum Stillstand kommen lassen. Die Gruppe um Wilmut erreichte die Synchronisation dadurch, daß sie die Spenderzellen in Kultur hungern ließen, so daß sie ihre Zellteilungsaktivität aufgaben und in die diploide G<sub>0</sub>-Phase eintraten (Campbell et al. 1996, Wilmut et al. 1997, Schnieke et al. 1997). Und Yanagimachis Gruppe verwendete zur Erzeugung ihrer Klonmäuse von vornherein Zellen, von denen bekannt ist, daß sie sich bereits im Körper nicht mehr teilen (Wakayama et al. 1998).

---

<sup>15</sup> Der Zellzyklus umfaßt die verschiedenen Phasen der Zellteilung. Er besteht aus der G<sub>1</sub>-Phase (G steht für *gap* oder Lücke, so bezeichnet, weil in dieser Phase bezüglich der Zellteilung nichts Erkennbares geschieht), der anschließenden S-Phase (S für Synthese, da in dieser Phase die DNA der Zelle verdoppelt, also eine DNA-Kopie synthetisiert wird), der G<sub>2</sub>-Phase (die zweite „Lückenphase“) und schließlich der M-Phase (M für Mitose, der eigentlichen Zellteilung). In der G<sub>1</sub>-Phase ist eine Säugierzelle diploid, hat also den normalen doppelten Chromosomensatz. Da die gesamte DNA in der S-Phase verdoppelt wird (damit später beide Tochterzelle den kompletten diploiden Chromosomensatz mitbekommen), ist die Zelle mit Erreichen der G<sub>2</sub>-Phase tetraploid, das heißt, sie besitzt einen vierfachen Chromosomensatz. Wenn Zellen sich nicht mehr teilen, etwa weil sie terminal differenziert sind oder weil die Umgebungsbedingungen einer Teilung entgegenstehen (beispielsweise Nahrungsmangel), so befinden sie sich in der sogenannten G<sub>0</sub>-Phase. G<sub>0</sub>-Zellen sind wie G<sub>1</sub>-Zellen diploid.

### 2.2.2 Offene Fragen

Nach obigen Schilderungen kann der Eindruck entstehen, viele wichtige Fragen bezüglich des kerntransferbasierte Klonens von Säugern seien geklärt. Das mag sogar sein, denn anders hätten Dolly, Polly, George und Charly und schließlich Cumulina kaum entstehen können. Genauer betrachtet jedoch entspricht der aktuelle Wissensstand gleichsam dem eines durchschnittlichen Fernsehkonsumenten über die Funktionsweise seines TV-Geräts: Er weiß, daß Netzstecker und Antennenkabel mit den richtigen Steckdosen verbunden sein müssen und er den Einschaltknopf drücken muß, dann erscheinen bunte Bilder. Doch wie diese eigentlich zustande kommen, weiß er nicht. Immerhin hat er den Vorteil, daß jedesmal, wenn er auf den Knopf drückt, die Bilder auftauchen (falls sein Gerät nicht defekt ist). Um Säuger durch Kerntransfer zu klonen, muß man dagegen mitunter viele hundert Male „auf den Knopf drücken“, bis man endlich Erfolg hat.

Klonen ist Fleißarbeit, formuliert Davor Solter in der *ZEIT* (Albrecht et al. 1998). Kerntransferbasiertes Klonen gelingt nur mit einer gewissen Wahrscheinlichkeit. Und die Erfolgswahrscheinlichkeit ist offenbar um so höher, je weniger differenziert die verwendete Spenderzelle ist und je länger die Zeitspanne reicht, die zur Reprogrammierung des eingebrachten Kerns zur Verfügung steht. Durch Kunstgriffe läßt sich, wie bei Cumulina, diese Zeitspanne zwar offenbar verlängern, doch auch dann erreichen nur höchstens eines oder zwei Tiere aus hundert Kerntransfers die Geburt.

Damit scheint Klonen eine Prozedur, die statistischen Einflüssen unterliegt: Das Verfahren gehorcht keiner direkten Kausalbeziehung in dem Sinn, daß man einen Zellkern in eine entkernte Eizelle verpflanzt und dadurch unweigerlich ein Tier erhält. Vielmehr gehen die meisten der so erzeugten Embryonen zugrunde, und selbst die, die sich fortentwickeln, sterben nicht selten noch kurz vor oder kurz nach der Geburt ab. Ian Wilmut bestätigte uns das im Interview: „Der zeitliche Verlauf der Absterberate entspricht einer Kurve, wie man sie vom radioaktiven Zerfall kennt: Sie beginnt mit einem hohen Wert, fällt dann steil ab und wird schließlich flacher. Viele der geklonten Schafembryonen sterben, die meisten gleich am Anfang ihrer Entwicklung, andere später, und manche sogar noch nach der Geburt.“

Das legt nahe, daß auch die überlebenden Tiere mit wie auch immer gearteten „kleinen Fehlern“ behaftet sein können, die zwar ihrer bisherigen Entwicklung nicht im Wege standen, jedoch möglicherweise noch künftig ihre Gesundheit und ihr Wohlergehen beeinträchtigen. Wilmut: „Es müssen viele Dinge im Genom passieren, damit ein Klon sich richtig entwickeln kann, und nur selten geschehen alle zusammen. Das ist meiner Ansicht nach die wahrscheinlichste Erklärung für die geringe Effizienz. Die vielen Schritte, die erfolgen müssen, verlaufen unabhängig voneinander, so daß der Erfolg des

Klonens eine Frage von kombinierten Wahrscheinlichkeiten wird. Wenn man also eine ganze Population von Kerntransfer-Embryonen untersuchen könnte, werden manche davon wohl keine der notwendigen Veränderungen im Genom zeigen, und diese würden rasch absterben. Andere hätten alle notwendigen Veränderungen, und daraus entstünden die Tiere, die zur Geburt gelangen. Die meisten jedoch würden irgendwo dazwischen liegen, entwickeln sich eine Woche lang oder zwei oder auch sechs Monate, je nachdem, und sterben dann ab.“

Zu bestimmten Zeitpunkten der Individualentwicklung müssen bestimmte Gene aktiviert werden. Wenn diese Aktivierung nicht möglich ist, aus welchem Grund auch immer, stirbt der Embryo oder das Tier oder erleidet zumindest Schäden. Wilmut führte auch das Beispiel der Chorea Huntington (Veitstanz) an, einer Erbkrankheit beim Menschen, die erst im mittleren Alter auftritt. Verantwortlich dafür ist ein einzelnes Gen, und es mag sein, daß im Zuge der Klonprozedur „Webfehler“ im Genom auftreten, die sich wie diese Krankheit erst im fortgeschrittenen Alter manifestieren.

Ob dies auf Dolly und die anderen aus mehr oder weniger differenzierten Zellen erzeugten Klontiere tatsächlich zutrifft, ist bislang offen. Das Problem ist, daß man nicht weiß, welche Mechanismen im einzelnen zur Reprogrammierung und Dedifferenzierung des Donorgenoms führen, wie die daran beteiligten „Reprogrammierungsfaktoren“ beschaffen sind und wo die Fehlerquellen liegen, die das kerntransferbasierte Klonen derzeit so ineffizient machen. Einer der Gründe dafür ist schlicht der, daß auch über die Mechanismen der differentiellen Genaktivierung in normalen Zygoten recht wenig bekannt ist. Letztlich sind Spermium und Oozyte ebenfalls hochdifferenzierte Zellen, deren Chromatin nach dem Befruchtungsvorgang umgeformt und reprogrammiert werden muß (Clarke 1992, Albrecht et al. 1998, Clarke et al. 1998). Die Frage drängt sich auf, welche Unterschiede es zwischen diesem natürlichen Umformungsprozeß gibt und dem, der nach einem künstlichen Kerntransfer stattfindet.

Eine Schlüsselrolle bei der Reprogrammierung kommt wahrscheinlich der Chromatinstruktur zu. Die DNA in Spermienkernen ist überwiegend mit einer Proteinsorte komplexiert, die man Protamine nennt (Clarke 1992, Doenecke et al. 1997). Protamine dienen offenbar dazu, den genomischen Inhalt eines Spermienkerns größtmöglich zu kompaktieren, damit das Spermium in seiner Bewegungsfreiheit möglichst wenig behindert ist. Nach dem Befruchtungsvorgang müssen die Protamine des männlichen Vorkerns durch Histone ersetzt werden. Die Eizelle besitzt demgegenüber eine Chromatinzusammensetzung, die eher der von somatischen Zellen entspricht: In ihr ist die DNA wie üblich weitgehend mit Histonen komplexiert. Gleichwohl gibt es hier ebenfalls Un-

terschiede: Das Histon H1, auch als Linker-Histon<sup>16</sup> bezeichnet, ist in Eizellen anders beschaffen als in gewöhnlichen Körperzellen (Clarke et al. 1998). In der frühen Embryonalentwicklung wird dieser oozytentypische H1-Subtyp gegen somatische Formen umgetauscht. Bei Mäusen geschieht dies im 4-Zell-Stadium, also nach der zweiten Furchungsteilung (Clarke et al. 1992), bei Rindern nach der vierten bis sechsten (Smith et al. 1995). Zugleich geht das Chromatin allmählich von einem generell repressiven (transkriptionsunterdrückenden) teilweise in einen transkriptionskompetenten Zustand über: Es wird für Transkriptionsfaktoren zugänglich, Histone werden chemisch modifiziert, und spezifische Enhancer (transkriptionsfördernde Kontrollsequenzen auf der DNA) beginnen zu wirken (Nothias et al. 1995, Schultz & Worrall 1995, Wiekowski et al. 1997).

Ein somatischer Zellkern dagegen besitzt weder Protamine noch oozytenspezifische Linkerhistone. Je nach Differenzierungszustand sind in ihm andere Genombereiche in einer transkriptionskompetenten Chromatinkonfiguration und andere Gene aktiv. Es stellt sich die Frage, ob nach einer Transplantation in eine entkernte Oozyte sein Chromatin zuerst auf den Oozytenzustand gebracht wird – die somatischen Linkerhistone also gegen den oozytenspezifischen Subtyp ausgetauscht werden – oder ob die Umformung in den Embryonalzustand ohne diesen Umweg geschieht. Beim Krallenfrosch *Xenopus laevis* gibt es Hinweise dafür, daß der erstere Weg eingeschlagen wird: Dimitrov und Wolffe (1996) vom Albert-Bonniot-Institut in La Tronche (Frankreich) setzten Kerne von Erythrozyten<sup>17</sup> Eizytoplasma-Extrakten aus und stellten fest, daß die somatischen Linkerhistone effizient durch die eispezifischen ersetzt werden, und zwar unter Vermittlung eines Hilfsproteins namens Nucleoplasmin. Infolge der Umformung werden schließlich in den Erythrozytenkernen bereits abgeschaltete Gene wieder aktiviert.

Ob beim Kerntransfer in Säugeroozyten ähnliches geschieht, ist unbekannt. Auf jeden Fall muß das jeweilige Expressionsprogramm des eingebrachten Donorkerns zunächst auf irgendeine Weise abgeschaltet werden, da es dem einer differenzierten Zelle entspricht und für die Embryonalentwicklung nicht benötigt wird, ja sogar störend wirken dürfte. Im nächsten Schritt müssen die für die Embryonalentwicklung notwendigen Gene und Genombereiche nach und nach aktiviert werden. Es gibt Hinweise, daß eine

---

<sup>16</sup> Die Grundeinheit des Chromatins ist das Nukleosom. Es besteht aus acht Proteinmolekülen, den Core-Histonen, die zusammen eine scheibenförmigen Struktur bilden, und natürlich aus DNA, die sich um diese Proteinscheibe knapp zweimal herumwindet. Insgesamt entsteht dabei eine perlschnurartige Struktur, in der je zwei Nukleosomen durch ein kurzes DNA-Verbindungsstück (Linker-DNA) zusammengehalten werden. An diese Linker-DNA bindet wiederum das Histon H1 (daher Linker-Histon), das an der Bildung höherer Organisationsstufen des Chromatins beteiligt ist und als genereller Repressor der Transkription gilt.

<sup>17</sup> Frosch-Erythrozyten sind im Gegensatz zu denen von Säugern kernhaltig.

solche Ereignisfolge tatsächlich stattfindet (Kanka et al. 1996). Man weiß freilich nicht, wie schnell das Eizytoplasma das Chromatin des Donorkerns umformen und dessen jeweiliges Expressionsprogramm vollständig ausschalten kann. Möglicherweise kann dieser sein spezifisches Gensortiment oder Teile davon noch einige Zeit weiter transkribieren – eine solche Restaktivität könnte den Erfolg des Klonens negativ beeinflussen. Zudem gelangt nach der Verschmelzung von Spenderzelle und entkernter Eizelle<sup>18</sup> das gesamte Zytoplasma der ersteren mit sämtlichen enthaltenen Organellen, Proteinen und sonstigen Molekülen in das Fusionsprodukt. Der Volumenanteil ist gegenüber dem der Oozyte zwar relativ klein, gleichwohl könnten die in der Donorzelle enthaltenen Proteine und Transkriptionsfaktoren den Reprogrammierungsprozeß stören und zu epigenetischen „Webfehlern“ im Genom führen (siehe nächsten Abschnitt), die möglicherweise an die nächsten Zellgenerationen weitergegeben werden und die Effizienz des Klonens vermindern. Und neben Proteinen sind im Spenderzytoplasma auch mRNA-Moleküle<sup>19</sup> enthalten, die in der Empfängereizelle noch in Proteine übersetzt werden können (Parry & Prather 1995). Zumindest beim Frosch hat man beobachtet, daß Proteine aus adulten Zellen, in befruchtete Froscheier injiziert, zu Abnormitäten in der Entwicklung führen können (Prather & First 1990). Einen Hinweis, daß auch bei Säugern zytoplasmatische Komponenten der Donorzelle den Reprogrammierungs- und Entwicklungsprozeß im geklonten Embryo stören können, fand die Gruppe um Eckhard Wolf an der Universität München und am Bayrischen Forschungszentrum für Fortpflanzungsbiologie in Oberschleißheim. Die Forscher verschmolzen Kernspenderzellen und entkernte Eizellen von Rindern in unterschiedlichen Größenverhältnissen und stellten fest, daß das Entwicklungspotential der so erzeugten Embryonen tendenziell um so größer war, je geringer das Zytoplasmavolumen der Spenderzelle gegenüber dem der Empfängeroozyte ausfiel (Zakhartchenko et al. 1997). Mit anderen Worten: je geringer der Anteil des Spenderzytoplasmas, desto geringer auch der Anteil darin enthaltener Bestandteile mit potentiell negativem Einfluß auf die Embryonalentwicklung. Wohlgedenkt, potentiell negativ, denn auch bei ungünstigen Volumenverhältnissen konnten sich einige der Kerntransfer-Embryonen zu Blastozysten entwickeln, nur eben seltener. Was wiederum ein Hinweis dafür ist, daß das kerntransferbasierte Klonen keiner deterministischen Regel folgt, sondern einem mehr oder weniger gerichteten Zufall, einer statistischen Unschärfe, unterliegt. In diesem Zusammenhang ist interessant, daß Yanagimachis Gruppe beim Klonen von Mäusen aus adulten Zellen, was bislang ja als extrem schwierig galt, nicht auf die

---

<sup>18</sup> Wie bereits erwähnt, wird beim kerntransferbasierten Klonen nicht nur der Donorkern verpflanzt, sondern die gesamte Donorzelle mit der aufnehmenden Eizelle verschmolzen.

<sup>19</sup> Boten-RNAs, Abschriften (Transkripte) von Genen, die ja auf der DNA im Zellkern lokalisiert sind. Anhand der Bauanleitungen in den mRNAs stellt die Zelle im Zytoplasma ihre Proteine her.

Methode der Zellfusion setzten, sondern auf die Injektion weitgehend zytoplasmafreier Kerne in die entkernten Empfängeroozyten (Wakayama et al. 1998).

Möglicherweise gibt es differenzierte (fetale und/oder adulte) Zelltypen, deren Chromatinstruktur über das gesamte Genom, deren eventuelle genomische Restaktivität in der aufnehmenden Eizelle und deren zytoplasmatische Komponenten weniger störend auf die Reprogrammierung und anschließende Embryonalentwicklung nach einem Kerntransfer wirken als andere. Bisher liegen dazu kaum dokumentierte Erfahrungen vor. Man kann also derzeit nicht sagen, wie eine differenzierte Spenderzelle beschaffen sein muß, damit man aus ihr mit höchstmöglicher Wahrscheinlichkeit ein lebensfähiges Tier klonen kann. Beim Klonen von Mäusen zumindest erwiesen sich Cumulus-Zellen in ihrer Eigenschaft als Kernspender als überlegen gegenüber Sertoli- und Nervenzellen<sup>20</sup> (Wakayama et al. 1998).

Neben der Chromatinstruktur wird das Methylierungsmuster der DNA als Faktor diskutiert, der die Reprogrammierung des Spendergenoms und die Erfolgsbilanz des kerntransferbasierten Klonens beeinflussen kann (Kono 1997). Wie bereits erwähnt, sind transkriptionsaktive Gene häufig untermethyliert, stummgeschaltete Gene dagegen meist übermethyliert. Das Methylierungsmuster eines differenzierten Spendergenoms müßte folglich rückgesetzt werden, damit es nach dem Kerntransfer wieder alle genetischen Programme ausführen kann, die für die Entwicklung des Embryos notwendig sind. Im Durchschnitt ist die DNA einer differenzierten Zelle relativ stark methyliert. Spermien-DNA ist im Vergleich dazu etwas und Oozyten-DNA deutlich untermethyliert. Während der frühen Entwicklung eines normalen Embryos (d.h. vor dessen Einnistung in die Gebärmutterschleimhaut) kommt es zu einer weiteren Demethylierung der von Spermium und Oozyte stammenden DNA, worauf nach der Gastrulation eine fortschreitende und gewebsspezifische Neumethylierung folgt (Monk et al. 1987). Bislang weiß man nicht, ob bei Kerntransfer-Embryos diese Demethylierungs- und Neumethylierungsprozesse in gleicher Weise ablaufen. Es ist denkbar, daß die gegenüber Keimzellen höhere Ausgangsmethylation differenzierter Donorzellen diese Prozesse ungünstig beeinflussen kann und möglicherweise dazu führt, daß einzelne Gene oder ganze Genombereiche mit einer gewissen Wahrscheinlichkeit methyliert bleiben und daher in der späteren Entwicklung nicht ordnungsgemäß eingeschaltet werden.

Hinweise auf die Vollständigkeit der Demethylierung nach einem Kerntransfer könnten etwa Untersuchungen der X-Chromosomen geklonter weiblicher Tiere liefern. In

---

<sup>20</sup> Cumulus-Zellen umgeben die Eizelle nach der Ovulation und dienen ihr als Nährgewebe, sind aber rein somatischen Ursprungs (sie entstehen aus dem Mesoderm, während die Keimzellvorläufer aus dem Ektoderm kommen). Sertolizellen sind bestimmte Zellen im Hodengewebe, die den Cumulus-Zellen in mancherlei Hinsicht entsprechen.

weiblichen Säugern wird eines der beiden X-Chromosomen in der frühen Embryonalentwicklung inaktiviert, um eine doppelte Expressionshöhe der auf diesem Chromosom befindlichen Gene zu vermeiden<sup>21</sup>. Die Inaktivierung geht (neben einer Kondensation des Chromatins) mit einer DNA-Übermethylierung einher – viele Gene auf dem inaktivierten X-Chromosom sind also stark methyliert. Im eigentlichen Embryo erfolgt diese Inaktivierung zufällig: Sie kann in manchen Zellen das vom Vater, in anderen das von der Mutter stammende erfassen<sup>22</sup> – in bezug auf die Expression X-chromosomaler Gene sind weibliche Säuger daher genetische Mosaik (Monk 1992).

Wenn sich auch Dolly als ein solches X-chromosomales Mosaik erweist, würde das dafür sprechen, daß in ihrer Embryonalentwicklung das adulte DNA-Methylierungsmuster aus dem Genom der Euterzelle, der sie ihre Existenz verdankt, ordnungsgemäß gelöscht wurde (zumindest was das X-Chromosom anbelangt). Stellt sich dagegen heraus, daß in all ihren Zellen das gleiche X-Chromosom inaktiviert ist (dasjenige, welches auch in der Kernspenderzelle inaktiv war<sup>23</sup>) müßte man auf eine unvollständige Löschung der vorgegebenen DNA-Methylierung schließen. Entsprechende Untersuchungen stehen jedoch noch aus; Wilmut gab uns gegenüber freimütig zu, daß dieser Aspekt bei Dolly noch nicht analysiert worden ist.

DNA-Methylierung und Chromatinstruktur sind epigenetische Eigenschaften des Genoms, die zumindest nicht direkt durch seine Sequenz bedingt sind, sondern ein Resultat seiner strukturellen Eigenschaften und von Entwicklungsprozessen. Sie beeinflussen das Expressionsverhalten von Genen und Genombereichen, nicht aber deren eigentlichen, in der DNA-Sequenz festgelegten Informationsgehalt. Sie sind dem Genom gleichsam als „Zusatzvermerke“ beigefügt, die der Zelle sagen, wie sie mit dem jeweiligen Sequenzinhalt verfahren soll. Wie die Sequenz des Genoms selbst sind auch sie vererbbar, jedenfalls in gewissen Grenzen, etwa innerhalb von Zellabstammungslinien im selben Organismus, bisweilen aber auch über Generationen hinweg (Holliday 1987, Roemer et al. 1997, Lewin 1998b), so daß sie die Ablesbarkeit eines Gens mitunter dauerhaft beeinflussen. Beim kerntransferbasierten Klonen könnten solche „Zusatzvermerke“ im Zuge einer unvollständigen Reprogrammierung des Donorkerns verfälscht werden, mit dem Ergebnis, daß wichtige Gene künftig nicht mehr zur Expression gelangen oder – der umgekehrte Fall – Gene zur unpassenden Zeit und am falschen Ort aktiviert werden. Das hätte Konsequenzen für den betreffenden Embryo und das Tier, das

---

<sup>21</sup> Männliche Tiere besitzen ja nur ein X-Chromosom, und offensichtlich sind Säuger an eine einfache Gendosis X-chromosomaler Gene angepaßt, daher schalten Weibchen zur Dosiskompensation eines ihrer beiden X-Chromosomen stumm.

<sup>22</sup> Dagegen wird in extraembryonalen Geweben bevorzugt das vom Vater geerbte inaktiviert, ein Phänomen des Imprintings, siehe Abschnitt 2.3.

<sup>23</sup> Was sich allerdings wohl nicht mehr nachprüfen läßt.

eventuell aus diesem entsteht. Hier könnte eine wesentliche Problematik der Klonprozedur liegen, da dieser innerzelluläre Prozeß durch eine Modifikation des Verfahrens kaum zu kontrollieren sein dürfte. Es gibt Hinweise, daß solche epigenetisch bedingten Expressionsveränderungen nach einem Kerntransfer tatsächlich auftreten können. Wir werden darauf im nachfolgenden Abschnitt intensiver zurückkommen und wollen uns vorher einigen anderen ungeklärten Aspekten des Verfahrens zuwenden.

Ein weiterer Faktor, der den Klonierungserfolg und das langfristige Wohlergehen geklonter Tiere beeinflussen könnte, ist die Länge der Telomere an den Chromosomenenden des Spenderkerns. Telomere sind gleichsam die Schutzkappen an den Enden eines Chromosoms. Wie man aus Zellkulturbefunden schließen kann, geht in primären Zellen<sup>24</sup> bei jeder Zellteilung ein kleines Telomerstück an beiden Enden eines Chromosoms verloren; mithin stellt die Telomerlänge ein Maß oder Zählwerk für das Alter einer Zellabstammungslinie dar. Sind die Telomere schließlich „abgenagt“, kann sich die Zelle zwar noch teilen, doch ihre Tochterzellen verlieren unter Umständen essentielle genetische Informationen am Ende der Chromosomen; zudem kann es zu fatalen Chromosomenumlagerungen kommen (Weinberg 1996, Blasco et al. 1997). Wenn man also einen „vergreisten“ Zellkern mit kurzen Telomeren zum kerntransferbasierten Klonen verwendet, könnte ein daraus entstandenes Tier früh altern oder zumindest vorzeitige Schäden in Geweben erleiden, die besonders teilungsaktiv sind – es sei denn, die Telomere werden im Verlauf der Embryonalentwicklung wieder aufgefüllt.

Es gibt ein Enzym namens Telomerase, das dazu imstande ist: Stattet man primäre menschliche Zellen mit einem aktiven Gen für Telomerase aus, so verlängert sich ihre Lebensspanne in Kultur (Bodnar et al. 1998)<sup>25</sup>. Andererseits sind Mäuse, in denen eine funktionelle Komponente der Telomerase künstlich ausgeschaltet wurde, normal lebensfähig (Blasco et al. 1997), und ebenso gibt es permanente Zelllinien, die sich auch ohne erkennbare Telomerase-Aktivität unablässig weiterteilen (Reddel et al. 1997). Offenbar existiert also ein alternativer Mechanismus, der das Zählwerk der Zellalterung wieder zurückstellen kann. Bisher ist nicht untersucht, was mit den Telomeren der Chromosomen eines Spenderzellkerns nach der Kerntransferprozedur und anschließenden Embryonalentwicklung passiert und welchen Einfluß dies auf das geklonte Tier hat. Zumindest gibt es einige indirekte Hinweise, daß „abgenutzte“ Telomere nach klassischem Mechanismus wieder verlängert werden könnten: So ließ sich bei Ratten in Oo-

---

<sup>24</sup> Das sind solche, die man direkt aus einem Organismus gewonnen hat und in Kultur nimmt. In der Regel sind primäre Zellen nur begrenzt kultivierbar: nach einer gewissen Zahl von Zellteilungen geht die Kultur zugrunde. Anders ist es bei permanenten Zellkulturlinien: Zellen solcher Linien sind potentiell unsterblich und haben offenbar einen Weg gefunden, ihre Telomere wieder aufzufüllen.

<sup>25</sup> Diese Veröffentlichung wurde auch in der deutschen Tagespresse in übertriebener Weise als Entdeckung des „Unsterblichkeitsgens“ gefeiert, sicherlich als Ergebnis geschickten Marketings: Die Autoren gehören einer Firma an, die sich kommerziell mit Altersforschung beschäftigt.

zyten und 4-Zell-Embryonen Telomerase-Aktivität nachweisen (Eisenhauer et al. 1997), beim Menschen zumindest in Blastozysten und in den meisten Geweben (außer Gehirn) von 16 bis 20 Wochen alten Feten (Wright et al. 1996). Nach der Geburt kommt die Telomerase-Expression beim Menschen offenbar zum Erliegen. In der Plazenta und in kultivierten Amniozyten konnten Wright und Mitarbeiter keine Telomerase-Aktivität nachweisen. Das hätte möglicherweise Konsequenzen fürs kerntransferbasierte Klonen: Wenn in den extraembryonalen Nährgeweben kein alternativer Weg zur Telomerverlängerung mobilisiert wird, könnte ein aus einer gealterten Zelle geklonter Embryo absterben, obwohl er selbst vielleicht gar nicht an Telomerverkürzung leidet. Es reicht, daß seine Plazenta vorzeitig zugrunde geht; damit wird auch seine Nahrungs- und Sauerstoffzufuhr unterbrochen, und er selbst stirbt ebenfalls. Zudem ist fraglich, ob die für normal entstandene Embryonen gewonnen Beobachtungen hinsichtlich der Telomerase-Aktivität unbedingt auf Kerntransfer-Embryonen übertragbar sind.

Ferner bedarf das Konzept der Keimbahn wohl einer neuen Definition. Vor Dolly galt, daß alle sich normal differenzierenden somatischen Zellen unweigerlich sterben müssen und nur die Zellen der Keimbahn, also jene, aus denen die Keimzellen entstehen, potentiell unsterblich sind. Denn nur Keimzellen (Spermien und Oozyten) konnten bisher zu einem neuen Lebewesen beitragen und in Form nachfolgender Generationen überdauern.<sup>26</sup> Die Frage, die sich zunächst daraus ergab, war also, ob Dolly und andere Klontiere, deren Spenderkern aus differenzierten, nicht mehr der Keimbahn angehörenden Zellen stammt, überhaupt fruchtbar sind und sich sexuell fortpflanzen können. Inzwischen ist diese Frage beantwortet: Wie uns Wilmut bestätigte, hat Dolly ein weibliches Lamm geworfen („Bonnie“), und ebenso hat sich Cumulina als fruchtbar erwiesen (Wakayama et al. 1998). Die Grenze zwischen Soma und Keimbahn erweist sich somit zumindest beim kerntransferbasierten Klonen als durchlässig.

### 2.3 Änderung epigenetischer Vorprägungen des Genoms

Wie ein Lebewesen aussieht, wie es sich verhält und auch welche Krankheiten es entwickelt – kurz gesagt sein Phänotyp – wird nach klassischer Sichtweise durch zweierlei Einflüsse bestimmt: Zum einen durch seinen Genotyp – die im Erbgut enthaltene Information, festgelegt in der Basensequenz der DNA. Und zum anderen durch äußere Bedingungen und Einflüsse wie Nahrungsangebot, Umstände des Heranwachsens, dem Wirken von Giften, Krankheitserregern oder schädigender Strahlung, denen das Indivi-

---

<sup>26</sup> Auch Krebszellen sind zwar potentiell unsterblich, doch diese ihre Eigenschaft manifestiert sich nur in Zellkultur. Wenn der Patient geheilt ist, sind sie tot, wenn er stirbt, gehen auch sie zugrunde. Zu einer neuen organismischen Generation können sie nicht beitragen.

duum im Laufe seines Lebens vielleicht ausgesetzt ist. Nach dieser Auffassung müßte ein geklontes Tier, das unter den gleichen Umweltbedingungen wie sein Genomspender aufwächst, auch dessen Phänotyp entwickeln<sup>27</sup>. Allerdings dürfte es nicht ganz einfach sein, die Identität der Bedingungen tatsächlich zu gewährleisten.

Forschungsarbeiten der letzten ein bis zwei Jahrzehnte ließen jedoch zunehmend erkennen, daß die Sachlage so einfach nicht ist. Es gibt eine dritte Art von Einflüssen auf den Phänotyp, die unter dem Begriff „Epigenetik“ subsummiert werden – Phänomene, die der Vererbung nach den Gesetzen der klassischen Genetik gleichsam aufgelagert sind (das Präfix *epi* steht für „auf“). Sie führen dazu, daß sich ein Gen bei gleicher Sequenz und unabhängig von Umweltbedingungen unterschiedlich verhalten kann – mal wird es abgelesen und mal nicht. Es handelt sich also um prinzipiell reversible Zustände des Erbguts, die seinen Informationsgehalt nicht verändern, jedoch dessen Umsetzung. Wie schon erwähnt, wird die Ablesbarkeit eines Gens wesentlich dadurch bedingt, in welcher Form seine DNA und insbesondere seine Kontrollsequenzen (Promotor und eventuelle Enhancer) im Chromatin eingebunden sind, ob diese Kontrollsequenzen methyliert oder sind oder nicht, ob sich das Gen in einer übergeordnet regulierten Genomdomäne befindet und schließlich davon, ob das vorhandene Sortiment an Transkriptionsfaktoren ausreicht, um die Ablesung des Gens zu bewerkstelligen. Ein bestimmter Zustand der Ablesbarkeit kann vererbt werden, auf Tochterzellen im selben Organismus, mitunter aber auch über die Keimbahn an die nachfolgende Generation (Holliday 1987, Roemer et al. 1997, Lewin 1998b). Ein Beispiel für die Keimbahnvererbung epigenetischer Zustände ist das sogenannte Imprinting, die unterschiedliche „Vorprägung“ einer Reihe von Genen in der weiblichen und männlichen Keimbahn (Latham et al 1995). Das Imprinting führt dazu, daß in einem (natürlich entstandenen) Embryo bestimmte Gene nur dann abgelesen werden, wenn sie von der Mutter stammen, andere Gene wiederum sind nur auf dem vom Vater ererbten Chromosomensatz aktiv. Ursache dafür ist in der Regel offenbar eine spezifische DNA-Methylierung (Li et al. 1993, Reik & Allen 1994): Die betreffenden Gene erhalten je nach vererbendem Geschlecht ein anderes Methylierungsmuster. Der Embryo erbt also von Vater und Mutter unterschiedlich methylierte Allele eines solchen Gens und exprimiert nur eines davon. Zur vollständigen Entwicklung bedarf ein Embryo daher nicht irgendeines diploiden Chromosomensatzes<sup>28</sup>, sondern die Hälfte davon muß aus einer weiblichen Keimzelle und die

---

<sup>27</sup> Abgesehen von den Beiträgen, die das mitochondriale Genom der Empfängeroozyte und eventuelle spontane Mutationen zum Phänotyp liefern.

<sup>28</sup> Höhere Organismen sind in der Regel diploid, das heißt, sie besitzen in ihren Körperzellen einen doppelten Chromosomensatz. Ein Satz stammt von der Mutter, der andere vom Vater. Bei der Keimzellentwicklung wird der doppelte Satz halbiert, so daß Spermium und Eizelle jeweils einen einfachen Chromosomensatz besitzen – sie sind haploid. Nach deren Vereinigung zur Zygote hat diese wieder den normalen doppelten Satz.

andere aus einer männlichen stammen: Künstlich erzeugte Embryonen, die beide Chromosomensätze aus Keimzellen desselben Geschlechts bezogen haben, können sich nicht vollständig entwickeln (McGrath & Solter 1984b).

Diese Beobachtungen haben für das kerntransferbasierte Klonen zweierlei Implikationen.

- Zum einen stellt sich die Frage, inwieweit das ererbte Imprintingmuster des Genoms einer somatischen Zelle nach der Kerntransferprozedur konserviert wird. Daß es offenbar in funktioneller Weise erhalten bleiben kann, zeigt die Existenz von Dolly: Sie wäre wahrscheinlich kaum lebensfähig, wenn sich infolge des Kerntransfers die Imprintingmuster ihres Spenderkerns verändert hätten. Andererseits sind ihre 276 „Geschwister“ noch während der Embryonalentwicklung gestorben (Wilmut et al. 1997), und es ist nicht auszuschließen, daß eine Veränderung des Imprintings dazu beigetragen hat. Wolf Reik (Cambridge, UK) wies im Gespräch mit uns darauf hin, daß bei der Reprogrammierung nach einem Kerntransfer nach derzeitiger Vorstellung Methylierungsmuster im Genom unterschiedlich behandelt werden müssen: Solche, die im Zuge der Differenzierung einer Zelle entstehen, müssen gelöscht werden (wie oben schon geschildert), während solche, die im Zuge des Imprintings entstehen, erhalten bleiben müssen; andernfalls könnten Probleme in der Entwicklung auftreten.
- Zum anderen, und dies hätte möglicherweise erhebliche Konsequenzen für Nutzwendungen des kerntransferbasierten Klonens, läßt sich aus den Untersuchungen zu den epigenetischen Einflüssen auf die Ablesbarkeit von Genen folgern, daß der primäre Informationsgehalt eines Genoms nicht ausreicht, um den Phänotyp eines mit Hilfe dieses Genoms geklonten Individuums vorherzusagen. Das würde bedeuten, daß sich ein geklontes Tier unter Umständen anders entwickelt, daß es anders aussieht, sich anders verhält und möglicherweise auch für andere Krankheiten anfällig ist als sein genetisch identischer Genomspender. Die Frage ist, wie eine entkernte Eizelle bei der Klonprozedur mit den vorhandenen „aufgedruckten“ epigenetischen Zusatzvermerken des eingebrachten Spendergenoms verfährt – ob sie die notwendigen (etwa die Imprintingmuster) beibehält und die störenden (etwa solche, die im Zuge der Differenzierung der Spenderzelle entstanden sind und die nunmehr die Embryonalentwicklung behindern) in korrekter Weise löschen kann. Es ist denkbar, daß die empfangende Eizelle das Genom des Spenderkerns gelegentlich mit „falschen“ epigenetischen Zusatzvermerken versieht oder vorhandene wichtige irrtümlich streicht, mit dem möglichen Ergebnis, daß die Ablesung des Spendergenoms ungünstig beeinflusst wird.

Es gibt in der Tat eine Reihe von Hinweisen, daß sich die Ablesbarkeit eines Genoms nach einem Kerntransfer verändern kann – daß also Gene nicht mehr ordnungsgemäß exprimiert werden. Bereits erwähnt wurde die Arbeit von Latham, Garrels und Solter

(1994): Die Autoren fanden nach Kerntransfer von Maus-Blastomeren des 8-Zell-Stadiums in entkernte 1-Zell-Embryonen, daß in der weiteren Entwicklung die Syntheseraten von mindestens 50 Proteinen gegenüber normalen Mausembryonen verändert waren. Als Ursache dafür vermuten sie eine fehlerhafte oder mangelhafte Reaktivierung von Genen – zum einen solcher, die im kernspendenden 8-Zell-Embryo bereits abgeschaltet waren, zum anderen solcher, die in 8-Zell-Embryonen aktiv sind, nach dem Kerntransfer in den 1-Zell-Embryo jedoch inaktiviert wurden und dann nicht wieder ordnungsgemäß eingeschaltet werden konnten. Ähnliche Beobachtungen machte eine chinesische Arbeitsgruppe an Kaninchen (Liu et al. 1995).

Offensichtlich können dabei Bestandteile des aufnehmenden Zytoplasmas von Bedeutung sein: Je nach Beschaffenheit des Empfängerzytoplasmas kann sich ein Spermakern unterschiedlich verhalten, wird sein Genom unter Umständen anders abgelesen. Wenn man zum Beispiel bei der Maus androgenetische 1-Zell-Embryonen konstruiert – das sind Embryonen mit zwei männlichen Vorkernen<sup>29</sup> und ohne einen weiblichen –, so zeigt sich deren Entwicklungspotential davon abhängig, von welchem Mausstamm das aufnehmende Eizytoplasma stammt. Der Ursprung der männlichen Vorkerne hingegen spielt eine untergeordnete Rolle. Sind die beiden männlichen Vorkerne „zu Gast“ in einem Ei des Mausstammes C57BL/6, so entwickelt sich der Embryo meist bis zur Blastozyste. Ein Embryo aus zwei männlichen Vorkernen und dem Eizytoplasma des Stammes DBA/2 hingegen entwickelt sich kaum über das 16-Zell-Stadium hinaus. Keith Latham und Davor Solter (1991), die Autoren dieser Studie, folgern, daß die eingebrachten männlichen Vorkerne je nach aufnehmendem Eizytoplasma unterschiedlich modifiziert werden – sprich andere epigenetische Zusatzvermerke aufgeprägt bekommen. Offensichtlich unterscheiden sich die Oozyten der beiden Mausstämme in ihrem Gehalt an Faktoren, die solche Modifikationen durchführen können. Besonders bemerkenswert dabei ist, daß selbst der vorübergehende Kontakt mit dem entwicklungshemmenden DBA/2-Zytoplasma die männlichen Vorkerne offenbar stabil „einrasten“ läßt: Ein anschließender Transfer in das entwicklungsöffnere C57BL/6-Zytoplasma kann das nunmehr verminderte Entwicklungspotential nicht mehr rücksetzen – es scheint im Genom der Vorkerne fest eingepreßt und vererbt sich offensichtlich auch im eigentlich permissiven Zytoplasma auf die Blastomeren der ersten Furchungsteilungen (Latham 1994).

---

<sup>29</sup> Nach der Befruchtung hat die Zygote, wie schon in einer vorigen Fußnote erwähnt, zunächst zwei haploide Zellkerne: einen von der Eizelle und einen vom Spermium. Diese Kerne bezeichnet man als Vorkerne oder Pronuclei. Sie verschmelzen nach der ersten Furchungsteilung. Zur Erzeugung eines androgenetischen Embryos entfernt man im 1-Zell-Stadium dessen weiblichen Vorkern und stattet ihn mit einem zweiten männlichen aus.

Ein weiteres Beispiel für die epigenetische Aktivität des empfangenden Eizytoplasmas auf einen dorthinein transplantierten Kern demonstrierten Jean-Paul Renard und seine Mitarbeiter (Chastant et al. 1996). Die französische Gruppe untersuchte die Aktivität des Promotors für das Gen HSP70.1 in zweizelligen Mausembryonen. Das Gen gehört zu den ersten, die im Mausembryo aktiv werden; die Regulation seiner Expression erfolgt offenbar in erster Linie über Chromatinstrukturveränderungen (Thompson et al. 1995). Wie die Autoren zunächst herausfanden, wird HSP70.1 in zweizelligen Embryonen des Mausstammes CH3 etwa doppelt so hoch exprimiert wie in solchen vom Stamm BALB/c. Nach Kerntransfer zwischen unterschiedlichen Stämmen<sup>30</sup> erwies sich, daß die Expressionshöhe nicht vom eingebrachten Kern bestimmt wird, sondern vom empfangenden Eizytoplasma: Auch in den Transferexperimenten zeigte sich die Expressionsaktivität des HSP70.1-Promotors im BALB/c-Empfängerzytoplasma etwa doppelt so hoch wie im CH3-Zytoplasma, unabhängig von der Herkunft des Donorkerns! Offenbar nehmen also Faktoren aus dem Empfängerzytoplasma epigenetischen Einfluß auf das eingebrachte Genom und modifizieren es so, daß es seine eigene Ablesbarkeit nicht mehr selbst bestimmt.

Wie diese Arbeiten erkennen lassen, kontrolliert das Zytoplasma der empfangenden Eizelle über epigenetische Effekte mit, welchen Phänotyp ein durch Kerntransfer geklontes Tier entwickelt. Das bedeutet, Spenderkern und Empfängerzytoplasma müssen miteinander „kompatibel“ sein, wenn ein Klontier erzeugt werden soll, das mit seinem Genomsponsor phänotypisch möglichst identisch ist. Die Bedingungen für diese Kompatibilität sind kaum erforscht. Bei der Maus hat man immerhin Hinweise auf eine Reihe von Genen gefunden, die epigenetische Genomzustände wie Methylierungs- und Imprintingmuster beeinflussen (Sapienza et al. 1989, Allen et al. 1990, Engler et al. 1991, Latham 1994). Die Produkte dieser Gene verhalten sich in verschiedenen ingezüchteten Mausstämmen teilweise unterschiedlich und könnten dazu führen, daß Oozyten je nach Inzuchtstamm einem eingebrachten Kern andere epigenetische Stempel aufsetzen<sup>31</sup>. Bei anderen Säugetieren, etwa Rindern und Schafen, ist über solche Gene noch nichts bekannt. Das liegt zum Teil daran, daß es nur bei Mäusen genetisch gut charakterisierte Inzuchtstämme gibt, die die Suche nach derartigen Genen erheblich erleichtern.

---

<sup>30</sup> Als Donorzellen wurden Blastomeren des 8-Zell-Stadiums zweier Hybridstämme benutzt, als Empfänger entkernte 1-Zell-Embryonen von BALB/c- und CH3-Mäusen.

<sup>31</sup> Es mag etwas widersprüchlich klingen, daß Gene epigenetische Effekte kontrollieren – damit wäre der Begriff Epigenetik ja eigentlich hinfällig, wenn doch wieder alles von den Genen abhinge. In der Tat werden die Rahmenbedingungen für epigenetische Phänomene letztlich durch genetische Einflüsse gesetzt, was aber nicht heißt, daß Gene alle Aspekte der Epigenetik kontrollieren. Wenn Tiere mittels Kerntransfer geklont werden, gewinnt die Sachlage eine zusätzliche Dimension: Die Eizelle, die das Spendergenom empfängt, ist von ihrem eigenen (inzwischen entfernten) Genom bereits mit molekularen Faktoren ausgestattet, welche die Ablesbarkeit des Spendergenoms beeinflussen können. Dadurch verliert dieses zumindest teilweise seine eigene Steuerfähigkeit.

Gleichwohl ist anzunehmen, daß sie auch bei anderen Säugern existieren und sich auf die Entwicklung von Kerntransfer-Embryonen auswirken können. Chastant et al. (1996) weisen sogar darauf hin, daß epigenetische Effekte bei Rindern und Schafen nach einem Kerntransfer noch deutlicher ausgeprägt sein könnten als bei Mäusen, da das Genom dieser Nutztiere nicht vor dem 8- bis 16-Zell-Stadium aktiviert wird und damit erheblich länger dem ausschließlichen Einfluß zytoplasmatischer Faktoren der Empfängerocyte ausgesetzt ist als bei der Maus.

Doch damit nicht genug: Nach einem Kerntransfer können Gene derart stabil in einen veränderten Ablesbarkeitszustand „einrasten“, daß sich dieser nicht nur auf das ausgewachsene Tier auswirkt, sondern sogar auf dessen Nachkommen vererbt. Dies zeigte die Arbeitsgruppe um Wolf Reik und Irmgard Roemer (Berlin): Die Wissenschaftler transplantierten weibliche Vorkerne aus den Eizellen zweier Mausstämme (C57BL/6 und DBA/2) in befruchtete Eizellen des jeweils anderen Stammes, deren eigenen weiblichen Vorkern sie zuvor entfernt hatten. Damit erhielten sie „nukleozytoplasmatische Hybride“ – die verpflanzten weiblichen Vorkerne befanden sich nunmehr in der Umgebung eines Eizytoplasmas mit fremden genetischen Entstehungshintergrund. Aus diesen Embryonen entstanden Tiere, die langsamer wuchsen als normal, veränderte DNA-Methylierungsmuster zeigten und eine reduzierte Expression einer Reihe von Genen in Leber, Herz und Hirn aufwiesen (Reik et al. 1993, Roemer et al. 1997). Eines davon ist in der Leber für die Bildung eines Proteins (MUP, *major urinary protein*) zuständig, das im Urin offenbar einen männlichen Sexuallockstoff, ein Pheromon, transportiert und dessen Wirkung auf andere Mäuse vermittelt: Weibliche Mäuse finden den Pheromongeruch attraktiv und reagieren, falls noch nicht erfolgt, mit dem Einsetzen der Pubertät; geschlechtsreife Männchen stößt der Geruch ab (Mucignat-Caretta et al. 1995, 1998). Ein zweites betroffenes Gen kodiert bemerkenswerterweise ein Protein, das an der Geruchswahrnehmung im Gehirn beteiligt ist (OMP, *olfactory marker protein*, siehe Buiakova et al. 1996). Man kann sich leicht vorstellen, daß bei Mäusen, denen diese Proteine fehlen, in Sexualentwicklung und -verhalten einiges durcheinandergerät.

Wie gesagt, erwiesen sich diese epigenetisch bedingten Phänotypveränderungen in anschließenden Kreuzungsversuchen als übertragbar auf die nächste und nach vorläufigen Untersuchungen offenbar auch auf die übernächste Generation von Mäusen. Auf welche Weise dieser epigenetische Vererbungsvorgang erfolgt, ist unbekannt. Wolf Reik weiß dafür, wie er uns erzählte, bislang keine stichhaltige Erklärung.

Zudem stellten die Autoren fest, daß ein geringer Prozentsatz ihrer Kontrolltiere den veränderten Phänotyp ebenfalls aufwies. Diese Mäuse waren aus Embryonen entstanden, die ebenfalls manipuliert worden waren, in denen jedoch der genetische Hinter-

grund von Zytoplasma und weiblichem Vorkern übereinstimmte. Auch in der Kontrollgruppe zeigte sich der veränderte Phänotyp auf die nächste Generation vererbbar.

Ausgehend von den Ergebnissen von Reik und Roemer lassen sich eine Reihe wichtiger Schlüsse ziehen:

- Erstens kann der Kerntransfer in ein genetisch fremdes Eizytoplasma zu epigenetischen Genomveränderungen führen, welche Expressionsveränderungen nach sich ziehen und sich auf den Phänotyp des entstehenden Tieres auswirken. Diesen Schluß legen auch die zuvor beschriebenen Arbeiten von Latham und Solter (1991) und Chastant et al. (1996) nahe. Durch die Hybridsituation zwischen Kern und Zytoplasma kann die Eintrittswahrscheinlichkeit einer epigenetischen Veränderung sehr groß werden: Unter 28 Tieren, die Roemer, Reik und Mitarbeiter aus nukleozytoplasmatischen Hybriden gewannen, befand sich nur eines, das normal geblieben war.
- Zweitens können allein durch die Manipulation eines frühen Embryos – ohne daß eine genetische Hybridsituation zwischen Spenderkern und Empfängerzytoplasma vorliegen muß – offenkundig ebenfalls epigenetische Veränderungen entstehen, nur mit niedrigerer Wahrscheinlichkeit. Grundsätzlich scheint also die Embryomanipulation als solche schon zu genügen, um in dessen Genom das gelegentliche „Umkippen“ epigenetischer Zusatzvermerke herbeizuführen. Die Hybridsituation scheint die Eintrittswahrscheinlichkeit lediglich zu verschieben – von gering nach hoch. Demnach wäre weder das Eintreten noch das Nichteintreten einer phänotypischen Veränderung bei einem gegebenen manipulierten Embryo mit Sicherheit voraussagbar. Dies würde die These unterstützen, daß der Erfolg beim kerntransferbasierten Klonen einem mehr oder weniger gerichteten Zufall unterliegt. Es sei darauf hingewiesen, daß nicht nur Kerntransplantationen, sondern auch andere Manipulationen am frühen Embryo sich auf das Erscheinungsbild des entstehenden Individuums auswirken können. Schon allein die künstliche Embryokultivierung führt bei Rindern und Schafen bisweilen zum „large calf syndrome“ – zu ungewöhnlich großen Kälbern beziehungsweise Lämmern (Campbell et al. 1996b). Sowohl Reik als auch Wilmut halten es für möglich, daß dieses Syndrom durch Imprintveränderungen entsteht, geklärt ist dies jedoch nicht.

Beim Menschen hat man nach *in vitro*-Fertilisationen gehäuft Frühgeburten und unterdurchschnittliches Geburtsgewicht beobachtet (Doyle et al. 1992). Und Mäuse, die aus eingefrorenen Embryonen entstanden sind, zeigen eine signifikant hohe Rate von morphologischen, physiologischen und Verhaltensänderungen, die teilweise erst im Alter auftreten – mithin sind nach Embryomanipulationen auch Spätfolgen möglich, die am neugeborenen Tier noch nicht unbedingt ins Auge fallen (Dulioust et al. 1995). Es ist nicht auszuschließen, daß epigenetische Effekte zumindest eine Teilursache für all diese Phänomene sind: Unphysiologische molekulare Einflüsse unter den Bedingungen der künstlichen Embryokultivierung und (noch ungeklärte) physi-

kochemische Prozesse beim Einfrieren und Auftauen von Embryonen könnten epigenetische Vermerke im Genom gleichsam verwischen. So wäre zum Beispiel beim Einfrieren und Auftauen von frühen Embryonen eine partielle „Umkristallisierung“ der Chromatinstruktur denkbar, die zu Expressionsveränderungen betroffener Gene führen könnte. Die Chromatinstruktur des Genoms beruht auf relativ lockeren Bindungen zwischen DNA und beteiligten Proteinen, und es ist nicht auszuschließen, daß es beim Einfrier- und oder Auftauvorgang zu gelegentlichen Molekülverschiebungen kommt. DNA-Methylierungsmuster hingegen dürften sich dabei kaum ändern, denn die fraglichen Methylgruppen sind über kovalente Bindungen fest mit der DNA verknüpft. Ein unphysiologisches Kulturmedium wiederum könnte Komponenten enthalten (etwa bestimmte Proteine oder auch eine falsche Konzentration von Calciumionen<sup>32</sup>), die ein früher Embryo als Signal zur Umstellung seiner Genexpression fehlinterpretiert und die ihn zur Veränderung epigenetischer Vermerke veranlassen, wodurch es durchaus zu den beobachteten mehr oder weniger subtilen Phänotypveränderungen kommen könnte.

Nun sind Kultivierung und Kryopräservierung von Embryonen vergleichsweise geradezu „sanfte“ Manipulationen. Wenn solche Techniken bereits Folgen für die entstehenden Lebewesen nach sich ziehen können, ist dies für einen derart massiven Eingriff wie den Kerntransfer um so mehr erwarten. Hinzu kommt die Kombination der Techniken: Beim kerntransferbasierten Klonen muß man die Empfängeroozyte zwangsläufig in Kultur nehmen, um sie mit der kernspendenden Donorzelle zu fusionieren, und je nach Kapazität an Arbeitskräften und Tragetieren kann es durchaus vorkommen, daß die gewonnenen frühen Kerntransfer-Embryonen vorübergehend eingefroren werden.

- Der dritte Schluß aus den Arbeiten von Roemer, Reik und Mitarbeitern schließlich lautet, daß manipulationsbedingte – mithin erworbene – epigenetische Veränderungen sich derart stabil ins Genom einprägen können, daß sie sich auch auf nachfolgende Generationen auswirken. Offenbar kann es dabei sogar zu einer Verschlimmerung des Zustands kommen: Die Sterblichkeitsrate innerhalb der Säugephase war bei betroffenen Tieren der zweiten Generation deutlich höher als bei den ursprünglichen nukleozytoplastischen Hybrid-Mäusen des Anfangsexperiments (Roemer et al. 1997). Inwieweit diese Beobachtung signifikant ist, sei angesichts der relativ geringen Zahl der Tiere in diesem Einzelexperiment dahingestellt, doch es gibt durchaus Befunde, nach denen epigenetische Modifikationen des Genoms sich im Verlauf von mehreren Generationen verfestigen und zu einer zunehmend stärkeren Beeinflussung des Phänotyps führen können (Allen et al. 1990). Überdies könnte sich ein einmal gesetzter epigenetischer „Kristallisationspunkt“ auf benachbarte Chromosomenbezirke ausbreiten. So ist von der Taufliege *Drosophila* das Phänomen der Positionsef-

---

<sup>32</sup> Calciumionen nehmen innerhalb der Zelle vielfältige Steuerfunktionen wahr, ihre Konzentration kann die Aktivität vieler zellulärer Proteine beeinflussen, darunter auch Transkriptionsfaktoren und andere Proteine, die sich auf die Ablesbarkeit des Genoms auswirken.

fekt-Variation bekannt: Gene, die auf einem Chromosom in der Nachbarschaft von Heterochromatinregionen liegen (Heterochromatin ist stark kondensiertes Chromatin, das keine Genablesung mehr erlaubt), werden bisweilen von der Heterochromatisierung mit erfaßt und können dann nicht mehr abgelesen werden. Wie weit die Heterochromatisierung reicht, ist offenbar vom Zufall abhängig. In manchen Zellen der Fliege werden angrenzende Gene noch exprimiert, in anderen nicht, so daß genetisch identische Zellen sich phänotypisch unterscheiden. Dabei wird ein Gen um so häufiger inaktiviert, je dichter es an der Heterochromatinregion liegt (Lewin 1998a, S.644f). Bei Säugern hat man ferner beobachtet, daß der Methylierungszustand integrierter fremder DNA auf benachbarte Wirtssequenzen übergreifen kann (Jähner & Jaenisch 1985, Hasse & Schulz 1994).

Fazit ist: Das kerntransferbasierte Klonen birgt das Risiko, daß sich epigenetische Modifikationen des Spendergenoms ändern und diese Änderungen sich unter Umständen sogar auf die möglichen Nachkommen eines geklonten Tieres vererben. Wolf Reik hält nach unseren Nachfragen ein solches Geschehen für durchaus möglich, betont aber, daß dies näher untersucht werden müsse. Ian Wilmut betrachtet die Ergebnisse von Reik und Roemer als einen Sonderfall, der sich auf die spezielle Inzuchtstammsituation in dem Experiment bezieht, gab aber zu, daß so etwas passieren könne, nur würde man es unter den vielen anderen möglichen Reprogrammierungsfehlern wahrscheinlich kaum bemerken.

Die Bedingungen, unter denen epigenetische Reprogrammierungsfehler geschehen, bedürfen daher näherer Untersuchung. Epigenetische Effekte können keineswegs nur, wie oben angedeutet, das Sexualleben eines Individuums beeinflussen. Beim Menschen stehen eine Reihe von Krankheiten, darunter auch Krebs, mit epigenetischen Phänomenen in Zusammenhang (Solter 1992, Lalande 1996). Beispiele sind das Prader-Willi- und das Angelman-Syndrom (Cassidy & Schwartz 1998, siehe auch *DER SPIEGEL* 17/1998, S. 174ff), das Beckwith-Wiedemann-Syndrom (Weksberg et al. 1993, Reik et al. 1995) und der Wilms-Tumor (Rainier et al. 1993, Ogawa et al. 1993). Diese Krankheitsbilder sind nicht gerade selten: Das Prader-Willi-Syndrom, eine Störung, die mit Minderwuchs, Übergewicht, geistiger Behinderung und anderen Anomalien einhergeht, trifft eines von 10 000 Neugeborenen; das Beckwith-Wiedemann-Syndrom (oder Exomphalos-Makroglossie-Gigantismus-Syndrom), gekennzeichnet unter anderem durch Überwuchs und hypertrophierte Organe im Kindesalter sowie eine erhöhte Neigung zur Bildung maligner Tumoren (darunter auch der Wilms-Tumor), tritt mit einer Rate von 1:15 000 auf, und der Wilms-Tumor, eine bösartige Geschwulstform der Niere, ist mit 7,5 Prozent eine der häufigeren Krebserkrankungen im Kindesalter (Pschyrembel 1994).

Die Entstehungsursachen dieser Krankheiten sind vielfältig, beteiligt sind meist auch zusätzliche „klassische“ Mutationen, etwa Verluste von Chromosomenstücken. Doch manche Beckwith-Wiedemann-Patienten besitzen einen offensichtlich normalen Chromosomensatz, und ihre Krankheit scheint allein daher zu rühren, daß das Imprintingmuster mindestens eines oder zweier Gene sich verändert hat (Weksberg et al. 1993, Reik et al. 1995): Ein normalerweise nur vom väterlichen Chromosomensatz exprimiertes Gen für einen Wachstumsfaktor (IGF2) ist bei diesen Patienten auch auf dem mütterlichen Satz aktiv – es trägt dort fälschlich denselben Imprint wie sein vom Vater ererbtes Gegenstück. Daher produzieren diese Patienten die doppelte Menge dieses Wachstumsfaktors, was wahrscheinlich der Grund für ihre Überwuchersymptome ist. Zusätzlich kann der Gegenspieler des IGF2-Gens, das Gen H19, das normalerweise nur auf dem mütterlich ererbten Chromosom aktiv ist, dort lahmgelegt sein – es trägt dann ebenfalls das falsche väterliche Methylierungsmuster, was bei diesem Gen zur Inaktivierung führt. Der Informationsgehalt der fraglichen Gene ist nicht betroffen, lediglich ihre Ablesbarkeit. Besonders eindrucksvoll zeigt sich die epigenetische Grundlage des Beckwith-Wiedemann-Syndroms an Zwillingsstudien: Von eineiigen Zwillingsgeschwistern, also genetisch identischen klonalen Individuen, kann eines die Krankheit entwickeln, während das andere davon verschont bleibt (Clayton-Smith et al. 1992).

Bei einem Teil der Patienten mit Wilms-Tumor findet sich ein ähnliches Bild: Sie exprimieren aufgrund falscher Imprintingmuster IGF2 von beiden Allelen und/oder H19 von keinem (Rainier et al. 1993, Ogawa et al. 1993). Das ist zwar nicht die alleinige Ursache für den Krebs, doch offenbar ein wesentlicher Schritt zu seiner Entstehung. Das Krebsgeschehen ist ein Mehrstufenprozeß: Es reicht nicht aus, daß nur ein Gen in seiner Expression oder seiner Sequenz verändert wird, um einen malignen Tumor entstehen zu lassen; in der Regel sind mehrere Gene daran beteiligt. Gene, die das Zellwachstum fördern, können übermäßig aktiv werden, Gene, die es bremsen oder die den physiologisch notwendigen programmierten Zelltod (die Apoptose) herbeiführen, können lahmgelegt sein – beide Arten von Veränderungen tragen zur Tumorentstehung bei (Weinberg 1996)<sup>33</sup>. Bislang galten in erster Linie „klassische“ Mutationen als Ursache für Tumoren, ebenso könnten aber auch epigenetische Effekte zu nachteiligen Expressionsveränderungen tumorrelevanter Gene führen, ohne daß sich deren Sequenz verändern muß (MacLeod 1996). So beruht die karzinogene Wirkung bestimmter Substanzen, zum Beispiel Nickel, möglicherweise weniger auf ihren mutagenen Eigenschaften als

---

<sup>33</sup> Zusätzlich ist allerdings zu berücksichtigen, daß auch der Status des Immunsystems der betroffenen Menschen dabei nicht unerheblich ist; es kann besser oder schlechter in der Lage sein, Tumorzellen zu eliminieren.

vielmehr darauf, daß sie die Methylierung tumorrelevanter Gene beeinflussen (Klein & Costa 1997).

## 2.4 Aktivierung mobiler genetischer Elemente

Ein weiterer epigenetischer Effekt des kerntransferbasierten Klonens könnte in der Aktivierung „springender Gene“ oder Transposons liegen. Bislang gibt es nach unseren Recherchen keine Untersuchungen darüber, ob nach einem Kerntransfer solche mobilen genetischen Elemente tatsächlich aktiviert werden, und auch Wilmut wußte nichts darüber. Die Möglichkeit ist jedoch nicht auszuschließen. Wie Jeffrey Yoder, Colum Walsh und Timothy Bestor von der Columbia-Universität in New York schreiben, enthält das Genom von Säugern über eine Million Transposons. Mehr als 35 Prozent des menschlichen Genoms besteht aus solchen Elementen oder deren Überresten – die Autoren bezeichnen sie als „intragenomische Parasiten“ (Yoder et al. 1997). Dazu gehören in erster Linie sogenannte *LI*- und *Alu*-Elemente sowie endogene Retroviren oder endogene retrovirale Sequenzen<sup>34</sup>. Das Gen für das Enzym reverse Transkriptase, mittels derer diese Elemente im Genom springen, zählt mit mehreren hundert Kopien zu den häufigsten proteinkodierenden Sequenzen im menschlichen Genom überhaupt<sup>35</sup>.

Die meisten dieser Elemente sind infolge von Mutationen defekt und können aus eigener Kraft nicht mehr in andere Stellen des Genoms springen beziehungsweise, wie im Falle endogener Retroviren, infektiöse Partikel bilden. Darüber hinaus sind sie praktisch alle hochgradig methyliert und damit nicht transkriptionsaktiv, folglich sind auch die intakten lahmgelegt. Yoder et al. postulieren die etwas provokante These, daß in dieser

---

<sup>34</sup> Retroviren (wie zum Beispiel das Aidsvirus HIV) sind Viren, die ein RNA-Genom enthalten, nach der Infektion einer Wirtszelle dieses aber in eine DNA-Kopie „zurückschreiben“, in Umkehrung des normalen genetischen Informationsflusses. Dazu benutzen sie ein eigenes mitgebrachtes Enzym namens reverse Transkriptase. Die DNA-Kopie des Virusgenoms baut sich dann an zufälliger Stelle in den Chromosomensatz der befallenen Zelle ein und wird dort zu einem stabilen Bestandteil deren Genoms. Von dort aus veranlassen die retroviralen Gene die Produktion neuer Viruspartikel, die von der befallenen Zelle abknospen und weitere Zellen infizieren können. Gelegentlich kann es vorkommen, daß Retroviren Zellen der Keimbahn infizieren und ihr Genom dort stabil einbauen. Es vererbt sich dann wie ein normales Wirtsgen auf die Nachkommen des befallenen Individuums. Solche vererbten integrierten Retrovirusgenome bezeichnet man als endogene Retroviren. Häufig bleiben sie nicht als vollständige Virusgenome erhalten, sondern es gehen Teile davon verloren, so daß nur noch retrovirale Teilsequenzen übrig bleiben.

<sup>35</sup> Die meisten Transposons bei höheren Organismen sind Retrotransposons: Sie werden zunächst wie ein normales Gen in RNA umgeschrieben (transkribiert), von dieser RNA wird dann aber wie bei Retroviren durch die reverse Transkriptase eine DNA-„Rückschrift“ erstellt, die dann an neuer Stelle ins Wirtsgenom integriert. Der Einfachheit halber wird dieser Vorgang oft „Springen“ genannt, obwohl der Begriff etwas mißverständlich ist: Das ursprüngliche Transposon verbleibt an seinem alten Platz im Genom, lediglich seine Kopie „springt“ in eine neue Stelle. Retrotransposons im engeren Sinne können eine Zelle nicht verlassen und daher nur innerhalb desselben Genoms springen. Im weiteren Sinne zählt man auch die Retroviren dazu, die zwischen verschiedenen Zellen wandern können. Wenn in diesem Text das Wort „Transposon“ benutzt wird, sind die Retroviren mit eingeschlossen.

Inaktivierung mobiler genetischer Elemente die Hauptfunktion der DNA-Methylierung zu sehen sei, da zum einen der weitaus überwiegende Teil der methylierten DNA-Bausteine des Säugergenoms sich innerhalb solcher Elemente befindet und zum anderen Organismen, in denen es keine DNA-Methylierung gibt (zum Beispiel Insekten, also auch *Drosophila*), weit stärker unter den Auswirkungen von Transposons leiden als Säuger. Zu diesen Auswirkungen gehören vor allem Mutationen: Weil Transposons zufällig in neue Genomstellen integrieren, können sie wichtige Gene unterbrechen und dadurch lahmlegen. Da höhere Organismen ein diploides Genom besitzen, hat das oft keine Konsequenzen: Das Allel auf dem homologen zweiten Chromosom kann häufig die Funktion alleine übernehmen. Kritisch wird es jedoch, wenn dieses bereits defekt ist, wenn das Zielallel auf dem einzig aktiven X-Chromosom liegt oder zu den Genen gehört, die ein Imprintingmuster tragen und daher monoallelisch exprimiert werden, oder wenn die Funktionserfüllung eine Gendosis erfordert, die die Expression beider Allele verlangt. Hinzu kommt, daß bisweilen unvollständige Transposons in die neue Genomstelle integrieren. Im Falle integrierter, unvollständiger retroviraler Genome ist bekannt, daß dadurch zelluläre Gene übermäßig aktiviert werden können: Wenn ein partielles Retrovirusgenom mit einem funktionellen Promotor sich dicht neben ein Gen einbaut, gelangt das Gen unter den Einfluß des retroviralen Promotors, das heißt, dieser steuert nunmehr die Transkription des Gens. Das bedeutet in der Regel, daß das betroffene Gen weit höher exprimiert wird als normal, da die retroviralen Kontrollsequenzen zur Transkriptionssteuerung deutlich wirksamer sind als die meisten zellulären Promotoren. Ein expressionsfördernder Effekt auf Wirtsgene kann auch indirekt entstehen, etwa indem sich nach der Integration des Retrovirus die Chromatinstruktur eines benachbarten Gens zugunsten einer erhöhten Expressionsrate ändert oder dessen Promotor unter den Einfluß transkriptionsverstärkender retroviraler Sequenzen (Enhancer) gerät. Wenn das fragliche Wirtsgen das Zellwachstum fördert, kann dadurch ein erster Schritt zur Krebsentstehung gesetzt sein. Viele Tumoren in Labormäusen sind auf diese Weise entstanden und haben zur Identifizierung krebserrelevanter Gene geführt (Rohdewohld & Breindl 1985). Ferner kann es auch vorkommen, daß retrovirale Sequenzen mitten in ein Gen integrieren und dann von diesem nur noch ein Teilstück exprimiert wird. Das entsprechend verstümmelte Genprodukt kann in seiner Funktion verändert sein und physiologische Abläufe stören. Überdies können Transposons Chromosomenbrüche und -umlagerungen induzieren (Yoder et al. 1997).

Trotz der Häufigkeit von Transposons im Säugergenom haben sie normalerweise kaum eine mutagene Wirkung. Yoder et al. berichten, daß nur eine von 500 Keimbahnmutationen beim Menschen auf der Aktivität von Transposons beruht, und diese geringe Rate führen sie auf die Schutzfunktion der DNA-Methylierung zurück. Wie im Ab-

schnitt 2.3 geschildert, können sich Methylierungsmuster nach einem Kerntransfer jedoch ändern. Uns sind zwar keine Untersuchungen bekannt, nach denen DNA-Methylierungen infolge von Kerntransplantationen gelöscht werden, doch gehen wir davon aus, daß solches ebenso möglich ist wie die Addition neuer Methylierungen, wie von Roemer, Reik und Mitarbeitern berichtet. Zumindest können Gene nach einem Kerntransfer stärker exprimiert werden als in ihrer ursprünglichen zellulären Umgebung (Latham & Solter 1991, Chastant et al. 1996), und es ist nicht auszuschließen, daß dies auch für Transposons gilt. Ebenso vermutet Wilmut, daß Gene im Zuge von Reprogrammierungsfehlern nach der Kerntransferprozedur nicht nur irrtümlich ab-, sondern auch eingeschaltet werden können.

Die Aktivität von Transposons kann sich gerade in Hybridsituationen stark erhöhen, also dann, wenn man Tiere unterschiedlicher Stämme oder Arten miteinander kreuzt. So gibt es bei *Drosophila* das relativ gut untersuchte Phänomen der Hybrid-Dysgenese (Lewin 1998a, S. 476ff): Kreuzt man Männchen eines bestimmten Stammes (P) mit Weibchen eines anderen (M), so wird eine bestimmte Klasse von Transposons (P-Elemente) im P-Chromosomensatz aktiviert. (Der M-Chromosomensatz enthält diese Elemente nicht). Diese Transposons richten dann im Genom des Fliegenembryos allerlei Unheil an, führen zu Mutationen und Chromosomenumlagerungen, und die aus diesen Kreuzungen entstehenden Fliegen sind häufig steril. Die umgekehrte Kreuzung, zwischen M-Männchen (ohne das P-Element) und P-Weibchen (mit P-Element), zeigt diesen Effekt nicht. Das liegt daran, daß im Zytoplasma von Fliegen des P-Stammes ein Repressormolekül vorhanden ist, das die Transposition des Elements unterdrückt. Die Eier eines P-Weibchens enthalten also in ihrem Chromosomensatz zwar das P-Element, aber in ihrem Zytoplasma auch den zugehörigen Repressor, so daß das P-Element stillgelegt bleibt, auch wenn sie von einem P-Spermium befruchtet werden. Die Eier eines M-Weibchens hingegen enthalten weder das Element noch den Repressor. Werden sie von einem P-Spermium befruchtet, kann das in dessen Chromosomen enthaltene P-Element daher ungehindert sein Unwesen treiben. Auf die Kerntransfermethode übertragen, würde das bedeuten, daß die Transplantation eines somatischen Zellkerns mit P-Elementen in ein entkerntes Ei vom M-Typ, also ohne den entsprechenden Repressor im Zytoplasma, zur Aktivierung von P-Elementen führen müßte, die im Genomspender bislang unauffällig geblieben waren.

In Säugern gibt es durchaus vergleichbare Situationen. So werden bei Kreuzungen zwischen Mäusen der Stämme SWR/J und RF/J in den entstehenden Embryonen in hohem Maße endogene Retroviren aktiviert, auch in Zellen der Keimbahn (Jenkins & Copeland 1985). Und in einer aktuellen Arbeit über Kreuzungen zwischen verschiedenen

Känguruharten konnten Rachel Waugh O'Neill und ihre Koautoren von der La Trobe-Universität in Bundoora (Australien) und der Princeton-Universität in New Jersey zeigen, daß in den Hybridkänguruhs in weiten Genombereichen Methylierungsmuster gelöscht, Retrotransposons aktiviert und Chromosomenstücke umgelagert werden (Waugh O'Neill et al. 1998).

Fazit: Mit diesen Betrachtungen sei nicht behauptet, daß das kerntransferbasierte Klonen zwangsläufig zur Ausschaltung wichtiger Gene, zu Krebs und anderen Störungen oder zur Aktivierung von mobilen genetischen Elementen führen muß. Die bislang vorliegenden Befunde zu epigenetischen Effekten des Kerntransfers und zu den Besonderheiten von Hybridsituationen legen aber nahe, daß derartige Risiken bestehen. Wie schon mehrfach erwähnt, scheint der Zufall eine große Rolle zu spielen. Unter welchen Bedingungen sich die Wahrscheinlichkeit für epigenetische Effekte beim kerntransferbasierten Klonen in die eine oder andere Richtung verschiebt, kann nur durch genauere Untersuchungen geklärt werden. Hybridsituationen zwischen Spendergenom und empfangender Eizelle bergen offenbar ein stark erhöhtes Risiko für unerwünschte epigenetische Effekte.

Vor diesem Hintergrund sind besonders Versuche zum „Transspezies-Klonen“, bei denen somatische Zellkerne einer schwierig zu klonenden Säugerart in entkernte Eizellen einer leichter klonbaren transferiert werden, als problematisch anzusehen. So hat eine amerikanische Gruppe um Maisam Mitalipova, Tanja Dominko und Neill First bereits Zellkerne aus Ratten, Schafen, Schweinen und Affen in Rinderoozyten (Pennisi 1998a), eine chinesische Gruppe Kerne von Mäusen in Kanincheneizellen (Mei et al. 1993) transferiert. Bislang ist aus solchen Experimenten zwar noch kein lebendes Tier hervorgegangen, doch spricht man auf der Internet-Nachrichtenseite der Universität von Wisconsin in Madison, wo ein Teil der amerikanischen Experimente stattfand, bereits enthusiastisch von Kuheizellen als „universellen Empfängeröozyten“, für Anwendungen von der Erzeugung von Transplantationsgeweben für den Menschen bis hin zur Erhaltung gefährdeter Tierarten. Tatsächlich können sich nach solchen artübergreifenden Kerntransplantationen offenbar Embryonen zumindest bis zu dem Stadium entwickeln, in dem sie sich in die Gebärmutterschleimhaut eines Tragetieres einnisten würden. Doch bleibt abzuwarten, wie solche Tiere, wenn sie sich denn weiterentwickeln sollten, aussehen werden oder wie die Zellen und Gewebe beschaffen sind, die man auf diese Weise für Transplantationszwecke gewinnen will. Die Gefahr, daß in so erzeugten Zellen oder Tieren mobile genetische Elemente aktiviert und Gene des Spendergenoms in veränderter Weise exprimiert werden, dürfte ausgesprochen hoch sein. Hinzu kommt,

daß man nicht weiß, wie gut das Genom in den Mitochondrien der Empfängereizelle mit dem artfremden Genom des Spenderkerns zusammenarbeiten kann.

## 2.5 Ausblick und Forschungsperspektiven

Das Klonen hat also nicht nur Spemanns Frage beantwortet, ob ein ausdifferenzierter Zellkern die Entwicklung eines Eies bis zum erwachsenen Individuum steuern kann, sondern gleichzeitig eine Vielzahl neuer Fragen aufgeworfen. Insofern hat sich diese methodische Innovation als ungemein fruchtbar für die Grundlagenforschung erwiesen. An Schafen oder Kühen wäre die Untersuchung dieser Fragen allerdings aufgrund der langen Tragzeiten, geringen Wurfgrößen und aufwendigen Haltung sehr zeitraubend und kostspielig. Alex Kind, einer der Mitarbeiter im Team, das Dolly und Polly erzeugt hat, brachte es im Gespräch mit uns auf den Punkt: „If you work with cows, you can do just ten experiments, and then you retire“ (Wenn man an Kühen arbeitet, kann man gerade mal zehn Experimente machen, und schon geht man in Rente.).

Da nunmehr das Klonen von Mäusen möglich geworden ist, lassen sich viele der Fragen wohl auf praktikable Weise untersuchen. Mäuse haben kurze Tragzeiten, werfen viele Junge und sind einfach zu halten. Zudem ist über ihre Genetik sehr viel mehr bekannt als über die von anderen Säugern (mit Ausnahme vielleicht des Menschen). Überdies sind Labors der biomedizinischen Grundlagenforschung in der Regel auf das Halten von Mäusen eingerichtet; Forschungsleiter müßten also keine zusätzlichen Investitionen zum Halten von Schafen einplanen oder beantragen, wenn sie die Bedingungen des Klonens analysieren oder sich diese Technik anderweitig zunutze machen wollen.

Eine unserer Fragen an Ian Wilmut war, ob es typische Pathologien gäbe, die bei absterbenden Kerntransfer-Feten gehäuft aufträten. Er wußte es nicht und gab zu, daß es bisher kaum einen Weg gab, um dies in praktikabler Weise zu überprüfen. Er schlug eine Untersuchungsreihe vor, in der eine große Zahl von Kerntransfer-Feten zu unterschiedlichen Zeitpunkten ihrer Entwicklung auf Fehlbildungen und eventuelle Todesursachen analysiert würden, was freilich mit dem Töten der Tragetiere verbunden wäre: „A way to look at this is to slaughter the foster mothers to recover the fetuses at particular times and check them; though, we haven't done that. But this should be realistic in mice.“

In ähnlicher Weise machte Wolf Reik im Interview einen Vorschlag, die Häufigkeit epigenetischer Veränderungen zu untersuchen: „Charakterisiere den epigenetischen Zustand des somatischen Kerns, den du transplantierst, und dann schau' nach, was passiert, nachdem er transferiert worden ist, und dies zu verschiedenen Zeitpunkten der

Entwicklung. Nach Möglichkeit vergleichst du Embryos, die erfolgreich geklont wurden, mit solchen, die absterben, um herauszufinden, was anders ist zwischen beiden Gruppen. Das wird in Zukunft wichtig sein, um die Methode zu optimieren.“ Mit Mäusen ist dies machbar, mit Schafen oder Rindern kaum, darauf hat Reik ebenfalls hingewiesen.

Ebenso läßt sich ein eventueller Einfluß des Klonens auf die Lebenserwartung der betreffenden Tiere untersuchen, indem man etwa Zellkerne aus unterschiedlich alten Mäusen und/oder aus Zellen, die unterschiedlich lange in Kultur gehalten wurden, zum Transfer verwendet und verfolgt, wie lange die entstehenden Mäuse leben und woran sie sterben. Ferner ließe sich die Frage studieren, ob das Klonen infolge epigenetischer Effekte und/oder akkumulierten Mutationen in den somatischen Spenderzellen zu einer erhöhten Krebsanfälligkeit oder sonstigen Pathologien in den Klontieren führen kann. In diesem Zusammenhang ist auch die Verwendung von etablierten Zellkulturlinien als Kernspender kritisch zu betrachten, wie sie etwa Davor Solter in seinem Kommentar zu Cumulina vorschlägt (Solter 1998). Genetisch gut charakterisierte Zellkulturlinien als Kernspender fürs Klonen können bei der Untersuchung von Grundlagenfragen wie den oben beschriebenen sehr hilfreich sein, da sich genau nachprüfen läßt, mit welchem Genotyp (und auch, welchem epigenetischen Zustand des Genoms) man beginnt und diese Zellen immer wieder aufs Neue benutzt werden können, so daß sich je nach Bedingungen des Einzelexperiments wertvolle und aussagekräftige Vergleiche ziehen lassen. Freilich stehen solche Zellen nicht unter dem Selektionsdruck, einen funktionsfähigen kompletten Organismus zu bilden – sie könnten daher nach langer Zeit in Kultur eine Vielzahl von Mutationen akkumuliert haben, die zwar ihre Lebensfähigkeit als Einzelzellen nicht beeinträchtigt und somit in Kultur unbemerkt blieben, die aber die Fähigkeit ihres Genoms zur Heranbildung eines ganzen Körpers erheblich einschränken könnten.<sup>36</sup> Solter weist auf unsere Nachfrage zu diesem Punkt darauf hin, daß dies zwar zutreffen könne, aber in gleicher Weise auch für somatische Zellen im Organismus gelte. Auch eine Hautzelle beispielsweise muß nicht mehr einen ganzen Organismus bilden und könnte in gleicher Weise Mutationen angehäuft haben, die ihren Zellkern das Potential verlieren lassen, die Entwicklung eines kompletten Körpers zu steuern. Wir werden die Problematik somatischer Mutationen in Kernspenderzellen in Abschnitt 4 näher diskutieren.

Interessant ist auch die Frage, ob jede adulte Zelle (bzw. jeder Zellkern) wieder totipotent gemacht werden kann. Wilmut bezweifelt das, und die Experimente von Wakayama und Mitarbeitern (1998) zeigen unterschiedliche Effizienzen der verwendeten

---

<sup>36</sup> Allerdings ist bisher noch nicht erwiesen, ob sich Mäuse überhaupt aus kultivierten Zellen klonen lassen: Wakayama et al. (1998) benutzten Zellen, die sie direkt aus dem Körper adulter Mäuse gewannen.

Spenderzellen. Welche Voraussetzungen müssen also vorliegen, damit ein ausdifferenzierter Zellkern wieder totipotent werden und die Entwicklung eines kompletten Organismus steuern kann, welche seiner Eigenschaften bedingen eine solche Kompetenz? Kann man vielleicht eine Spenderzelle so manipulieren, daß ihr Kern zum Klonen besser geeignet wird und die Effizienz des Klonens damit steigt? (Wilmut: „We have to do different things to the donor cells, to potentiate efficiency, to make it really work.“)

Und wie erfolgt die Reprogrammierung, welche Faktoren der Eizelle führen diese durch? Gibt es Unterschiede gegenüber der natürlichen Reprogrammierung der haploiden Keimzellvorkerne? Lassen sich aus Eizellen molekulare Reprogrammierungsfaktoren isolieren und charakterisieren und mit ihrer Hilfe ausdifferenzierte Zellen dedifferenzieren, ohne ihren Kern in eine Eizelle transferieren zu müssen? Könnten mit Hilfe solcher Faktoren Zellen dedifferenziert und gezielt zur Neudifferenzierung angeregt werden, ohne daß ein Kerntransfer-Embryo erzeugt werden muß? Wilmut und Alan Colman halten dies auf lange Sicht für möglich, und das wäre von enormer medizinischer Bedeutung: Man könnte dann Ersatzgewebe für Transplantationszwecke direkt aus dem Patienten gewinnen, also gesundes eigenes Gewebe der einen Sorte so verändern, daß es krankes Gewebe der anderen Sorte funktionell ersetzen kann, und würde damit nicht nur alle Abstoßungsprobleme umgehen, sondern müßte auch keinen zuvor erzeugten Embryo opfern (siehe dazu Abschnitt 3.3). Doch das ist noch Zukunftsmusik und sehr spekulativ. Durch die Forschungsmöglichkeiten, die das kerntransferbasierte Klonen eröffnet, erscheint die Entwicklung solcher therapeutisch einsetzbarer Zellen jedoch zumindest theoretisch nicht mehr ausgeschlossen.

Ferner lassen sich, wie schon anfangs erwähnt, mit Hilfe des kerntransferbasierte Klonens transgene Tiere herstellen. Da dieser Aspekt derzeit vorwiegend angewandte Bereiche berührt, werden wir ihn in den folgenden Abschnitten näher erörtern. Des weiteren gibt es Vorstellungen, mittels des Kerntransfer-Verfahrens Gentherapie durchzuführen. Auch darauf werden wir noch zurückkommen (Abschnitt 3.3).

### 3 Klonen in der angewandten medizinischen Forschung

Derzeit werden im wesentlichen vier mögliche Anwendungsfelder des kerntransferbasierten Klonens für medizinische Zwecke diskutiert:

- die Herstellung transgener Tiere zur Erzeugung therapeutisch nutzbarer Proteine in der Milch („Gen-Pharming“, Abschnitt 3.1),
- das Konstruieren und Vermehren von Tieren, die als Organspender für den Menschen dienen könnten (Xenotransplantation, Abschnitt 3.2),
- die Nutzung des Kerntransferverfahrens zur Gewinnung von autologem Transplantationsgewebe und in der Gentherapie (Abschnitt 3.3), und
- die Nutzung durch Kerntransfer geklonter Tiere in der präklinischen Forschung, etwa als Modelle für menschliche Krankheiten und/oder zum Testen von Pharmaka (Abschnitt 3.4).

Beim Gen-Pharming, bei der Entwicklung von Krankheitsmodellen in Großtieren und bei der Xenotransplantation ist zunächst weniger das genetisch identische Vervielfältigen von Tieren interessant als vielmehr die Möglichkeit, das Kerntransferverfahren als ein Mittel zu benutzen, um transgenes Vieh zu erzeugen – also fremde Gene stabil in Nutztiere einzubringen. Das war bislang sehr mühselig, zudem war nur die Addition neuer Gene möglich, nicht dagegen das Ausschalten oder Modifizieren bereits vorhandener Gene, wie es in der Maus schon länger möglich ist (siehe unten). Das Einbringen neuer Gene in das Genom von Schafen ist mittels Kerntransfer bereits gelungen (Schnieke et al. 1997, Pennisi 1998b), an der Modifikation vorhandener Gene wird gearbeitet (Pennisi 1998b, Mitchell 1998; Alan Colman, persönliche Mitteilung). Schließlich war die Suche nach einem effizienteren Weg zur Herstellung transgener Nutztiere der eigentliche Hintergrund bei der Entstehung von Dolly, wie Ian Wilmut im Gespräch mit uns bestätigte.

Denn das Kerntransferverfahren ermöglicht nicht nur das Kopieren eines natürlichen Genoms in ein neues Tier, sondern auch das eines künstlich veränderten. Als Kernspender fürs Klonen eignen sich grundsätzlich auch kultivierte Zellen (Sims & First 1994, Campbell et al. 1996a, Wells et al. 1997, Schnieke et al. 1997), und eine Zelle in Kultur ist der genetischen Manipulation leicht zugänglich. Durch verschiedene Methoden lassen sich auf relativ einfache Weise neue Gene in kultivierte Zellen einbringen. Zudem können die erfolgreich veränderten Zellen mit Hilfe gleichzeitig eingebrachter Resistenzgene bequem selektiert und in Kultur angereichert, und anschließend daraufhin überprüft werden, ob sie das neue Gen als intaktes Ganzes in ihr Genom aufgenommen haben, oft sogar auch, ob sie es in gewünschter Weise ablesen (exprimieren). Erfolg-

reich manipulierte Zellen lassen sich dann unter geeigneten Umständen dazu verwenden, durch Kerntransfer Tiere mit dem neuen Gen zu erzeugen.

Daß dieser Ansatz funktionieren kann, dokumentierte Wilmuts Team unter Federführung von Angelika Schnieke Ende letzten Jahres (Schnieke et al. 1997; kommentierte Vorberichte u.a. in der *New York Times* [Kolata 1997b] und in *Science* [Pennisi 1997]). Die Gruppe brachte das menschliche Gen für den Blutgerinnungsfaktor IX in fetale Schafsfibroblasten ein und klonete daraus mittels Kerntransfer Schafe (darunter Polly, über die auch in deutschen Medien berichtet wurde), die das neue Gen enthalten. Kurz nach Schniekes Veröffentlichung berichteten James Robl und Steven Stice auf einem Kongreß der International Embryo Transfer Society, sie hätten auf ähnliche Weise transgene Kälber (George und Charlie, seinerzeit ebenfalls in der deutschen Tagespresse erwähnt), die ein fremdes Testgen tragen, aus genetisch manipulierten fetalen Rinderfibroblasten erzeugt (Pennisi 1998b).

Der ursprüngliche Weg zur Transgenese von Säugetieren verläuft dagegen quasi nach dem Prinzip der Katze im Sack: Das einzubringende Gen wird in eine befruchtete Eizelle injiziert; diese läßt man von einem Ersatzmuttertier austragen und hofft, daß das so gewonnene Tier das transgene Merkmal aufweist – eine sehr aufwendige Methode, da nur ein Bruchteil der behandelten Embryonen das injizierte Gen tatsächlich stabil aufnimmt und davon wiederum nur ein Bruchteil dieses auch exprimiert (Campbell et al. 1996b, Schnieke et al. 1997, Velander et al. 1997, Pennisi 1998b, siehe auch unten). Die Verlegung der eigentlichen Transgenese in die Zellkultur hat den Vorteil, daß geprüft werden kann, ob das Transgen tatsächlich ins Genom der Empfängerzellen eingebaut worden ist, bevor aus ihnen Tiere erzeugt werden.

Bisher waren zellkulturbasierten Techniken zur Transgenese von Säugern nur bei der Maus möglich, allerdings nicht auf Grundlage des Kerntransfers, sondern unter Verwendung bestimmter embryonaler Stammzelllinien (ES-Zellen). Diese ES-Zellen sind pluripotent: Injiziert in eine Blastozyste, können sie sich an allen Geweben der entstehenden Maus beteiligen, auch an ihrem Keimgewebe. Selber können diese Zellen sich allerdings nicht zu einem vollständigen Embryo entwickeln. Der Weg bei Mäusen ist daher der, als erstes ES-Zellen in Kultur genetisch zu manipulieren – ein fremdes Gen hinzuzufügen oder ein eigenes Gen auszuschalten beziehungsweise durch ein maßgeschneidertes neues gezielt zu ersetzen.<sup>37</sup> Im nächsten Schritt isoliert man die erfolgreich

---

<sup>37</sup> Letzteres ist als Gen-Targeting oder Gen-Knockout bekannt. Zumeist integrieren künstlich eingebrachte Gene zwar an zufälliger Stelle im Chromosomensatz der manipulierten Zellen, manchmal kann aber ein fremdes Gen genau an der Stelle eingebaut werden, an der sich ein ähnliches zelleigenes Gen befindet – und dieses ersetzen. Ein solcher Vorgang wird als homologe Rekombination bezeichnet. Durch geschickt gewählte Selektionsverfahren kann man innerhalb einer genetisch manipulierten Zellkultur nicht nur die Zellen herausfinden, die das eingebrachte Gen überhaupt stabil aufgenommen haben, sondern

veränderten Zellen und injiziert sie in Maus-Blastozysten. Es entstehen dann zunächst Mäuse, die genetische Chimären oder Mosaik sind: Ein Teil ihrer Zellen stammt von der Empfängerblastozyste ab, der andere Teil von den injizierten ES-Zellen. Mit etwas Glück gehen aus den injizierten ES-Zellen auch Keimzellen hervor, und durch natürliche sexuelle Fortpflanzung lassen sich dann schließlich Mäuse erzeugen, die keine Chimären mehr sind, sondern das Transgen in all ihren Zellen enthalten.

Pluripotente Stammzellen, die auch an der Keimbahn partizipieren, ließen sich von anderen Säugern bisher jedoch nicht gewinnen (Campbell 1996b; Ian Wilmut, persönliche Mitteilung; Alan Colman, persönliche Mitteilung). Zudem hat das ES-Zell-Verfahren den Nachteil, daß eine zusätzliche Generation abgewartet werden muß, bevor Tiere entstehen, die genetisch einheitlich sind, und das bedeutet bei Rindern und Schafen einen erheblichen Zeitverlust. Mäuse vermehren sich innerhalb von Wochen, Großvieh dagegen innerhalb von Jahren. Die im vorigen Abschnitt zitierte Bemerkung von Alex Kind kommt durchaus nicht von ungefähr.

Der Ausweg bei Nutztieren war also, auf das Kerntransferverfahren zu setzen, und offenkundig ist dieser Weg gangbar: Transgene Schafe und Rinder können dadurch erzeugt werden. Ob auf diese Weise auch Gen-Targeting und Gen-Knockout bei Nutz- oder Großtieren durchführbar werden, bleibt abzuwarten, erscheint aber realistisch. Welche Anwendungsmöglichkeiten sich dadurch für die Medizin im einzelnen eröffnen, werden wir im folgenden diskutieren, ebenso die möglichen Nutzenanwendungen des Klonens ohne begleitende Transgenese.

### 3.1 Gen-Pharming

Am weitesten fortgeschritten ist die praktische Anwendung des kerntransferbasierten Klonens beim Gen-Pharming. Die Suche nach Möglichkeiten, billiger als bisher menschliche Proteine für pharmazeutische Zwecke zu gewinnen, war ein wesentliches Ziel bei den Forschungen, die zur Entstehung von Dolly führten. Es gibt eine Reihe von Krankheiten, die auf den Mangel an bestimmten Proteinen zurückzuführen sind. Insulinabhängiger Diabetes mellitus etwa ist ein klassisches Beispiel dafür. Weitere Krankheiten infolge des Fehlens eines Proteins sind etwa die Bluterkrankheit (Mangel an den Blutgerinnungsfaktoren VIII oder IX), der  $\alpha_1$ -Antitrypsinmangel (eine erblich bedingte Form von Lungenemphysem, auch Laurell-Eriksson-Syndrom genannt, häufigste Stoff-

---

auch diejenigen seltenen Exemplare, die es infolge einer homologen Rekombination genau an der gewünschten Stelle in ihrem Genom tragen. Auf diese Weise lassen sich vorhandene Gene gezielt durch neue ersetzen. Oder auch komplett lahmlegen: Dadurch nämlich, daß man ein vorsätzlich defekt gemachtes Gen an die Stelle seines funktionsfähigen natürlichen Gegenstücks ins Genom hineinrekombinieren läßt (Capecchi 1989, 1994).

wechselerbkrankheit in Europa) oder der Antithrombin-III-Mangel (ebenfalls erblich bedingt, Häufigkeit 1:5000, erhöhte Neigung zu Thrombosen und Embolien).

Insulin läßt sich inzwischen gentechnisch in Bakterien herstellen, so daß man nicht mehr auf die Gewinnung dieses Proteinhormons aus Rindern oder Schweinen angewiesen ist. Die gentechnische Produktionsweise in Bakterien ist jedoch nicht immer gangbar, da in Säugern vielen Proteinen nach ihrer Synthese zusätzliche Molekülgruppen angehängt werden, die ihre biologische Aktivität zumindest mitbedingen. Bakterien können solche „posttranslationalen Modifikationen“ nicht durchführen. Proteine dieser Art mußten daher bislang direkt aus menschlichem Blutplasma gewonnen werden, was jedoch sehr teuer und in vielen Fällen gar nicht praktikabel ist, da die Konzentrationen der gewünschten Proteine im Plasma meist viel zu niedrig liegen. Zudem sind mit dieser Gewinnungsweise Infektionsrisiken verbunden: Viele Bluterkrankte haben sich in der Vergangenheit über Plasmapräparate mit Aids oder Hepatitis infiziert.

Ein alternativer Weg ist die Produktion solcher Proteine in Säugerzellkulturen. Dies ist jedoch aufwendig, da Säugerzellen weit anspruchsvoller sind als Bakterien, weit teurere Nährmedien benötigen und ihre Kultivierung entsprechend kostspielig ist. Oft müssen allein in Bioreaktoren 40 Millionen Mark oder mehr investiert werden, um auch nur mäßige Mengen eines seltenen Proteins in Zellkultur zu erzeugen (Velandar et al. 1997). Einfacher und billiger wäre es, therapeutische Proteine von transgenen Tieren herstellen zu lassen. Karatzas und Turner (1997) zitieren Schätzungen, nach denen die Produktion eines Gramms an humanem Gewebe-Plasminogenaktivator<sup>38</sup> in Bakterien 20.000, in Säugerzellkultur 10.000 und in transgenen Kühen gerade mal zehn US-Dollar kosten würde. Ob diese enorme Kostendifferenz so stimmt, mag bezweifelt werden, doch gibt sie zumindest einen Eindruck über die erwartete Effizienz der Methode. Auch machen die unmittelbaren Herstellungskosten häufig nur einen kleineren Teil der Kosten eines Produktes aus, der größere Teil entfällt auf Entwicklung, Prüfung, Verfahrensvalidierung und Vertrieb.

Die Milchdrüse als Produktionsort scheint insofern besonders geeignet, als sie schon natürlicherweise zur Produktion großer Mengen von Proteinen ausgelegt ist, und zudem ihre Produkte nach außen abgibt, so daß sich die Gewinnung einfach gestaltet und keinen Eingriff in das Tier erfordert. Strategie dabei ist, das Gen für ein gewünschtes Protein mit einer Kontrollsequenz zu versehen, einem genetischen Schalter, der die Expression des Proteins in der Milchdrüse gewährleistet, und möglichst nur in diesem Organ, um zu vermeiden, daß das Tier durch Expression in anderen Organen belastet wird. Das ist prinzipiell möglich, da eine Reihe von Kontrollsequenzen für die Expression von

---

<sup>38</sup> Ein Protein (Kürzel: tPA), das bei Schlaganfall und Herzinfarkt Blutgerinnsel auflösen hilft.

Milchproteinen bekannt sind, etwa der b-Lactoglobulin-Promotor oder der Promotor des Gens für das saure Molkenprotein (Wilmut & Whitelaw 1994, Velander et al. 1997). Das gesamte Genkonstrukt wird dann in das Genom des Tieres eingeschleust, in der Hoffnung, daß dieses das gewünschte Protein schließlich mit seiner Milch abgibt.

Entsprechende Experimente sind erfolgreich durchgeführt worden, und so gibt es bereits etwa Schweine, die Protein C (einen Gerinnungshemmer), Ziegen, die Antithrombin III, und Schafe, die  $\alpha_1$ -Antitrypsin mit ihrer Milch abgeben. Die beiden letzteren Substanzen befinden sich schon in der klinischen Prüfung (Velandar et al. 1997, Karatzas & Turner 1997, Pennisi 1998b; Alan Colman, persönliche Mitteilung)<sup>39</sup>. Diese Tiere sind freilich nach der klassischen Methode entstanden, also durch Injektion der fremden DNA in einen der Vorkerne befruchteter Eizellen.

Polly enthält nun das menschliche Gen für den Blutgerinnungsfaktor IX, gekoppelt an den Schafpromotor für ein Milchprotein (b-Lactoglobulin). Dieses Genkonstrukt wurde zunächst in kultivierte fetale Schafsfibroblasten eingeschleust, und aus erfolgreich manipulierten Zellen wurden dann mit Hilfe der Kerntransfermethode ganze Lämmer geklont, darunter Polly. Und wie uns Alan Colman und Ian Wilmut mitteilten, wird in Pollys Euterzellen tatsächlich Faktor IX gebildet. An diesem Experiment zeigt sich, daß das kerntransferbasierte Klonen im Hinblick auf die Erzeugung transgener Tiere eine Reihe von Vorteilen bietet:

- Angelika Schnieke und Kollegen (1997) zeigen in ihrer Dokumentation des Experiments auf, daß durch das Kerntransferverfahren weniger Tiere eingesetzt werden müssen als bei der klassischen Injektionsmethode: Um ein lebendes transgenes Lamm zu erzeugen, waren bei der Firma PPL in den Jahren 1989 bis 1996 mit der alten Methode durchschnittlich rund 51 weibliche Tiere als Oozytenspenderinnen und Ersatzmütter notwendig, bei dem Polly-Experiment jedoch nur noch knapp 21.
- Ein großer Vorteil bei Verwendung der Kerntransfermethode ist, daß die manipulierten Kernspenderzellen zuerst auf Anwesenheit des fremden Gens getestet werden können, bevor aus ihnen ein Embryo erzeugt wird. Daher werden von vornherein nur gesichert transgene Embryos in die Ersatzmütter implantiert, so daß alle Lämmer, die zur Geburt gelangen, auch tatsächlich transgen sind. Bei der Injektionsmethode ist dagegen unsicher, ob das Gen überhaupt eingebaut wird: Von den insgesamt 1286 geborenen Lämmern bei PPL, bei denen die Geninjektion angewendet wurde, waren gerade 56 transgen, nur rund 4 Prozent. Die meisten Trächtigkeiten waren also, was

---

<sup>39</sup> Antithrombin III ist laut Meldung der Firma Genzyme Transgenics auf ihrer Internet-Seite ([www.genzyme.com](http://www.genzyme.com)) in Phase III. Und  $\alpha_1$ -Antitrypsin ist in Phase II, wobei es, wie uns Colman mitteilte, zur Behandlung von Mukoviszidose (Zystische Fibrose) getestet wird und noch nicht als Mittel gegen das Laurell-Eriksson-Syndrom. Die Firma PPL stelle mit Hilfe ihrer Schafe, so Colman weiter, wöchentlich ein Kilogramm dieser Substanz her, das ist für ein solches Protein eine gewaltige Menge.

das angestrebte Ziel betrifft, umsonst. Zudem kann bei der alten Methode eine verzögerte Integration (nach der ersten Teilung der Eizelle) dazu führen, daß das entstehende Lamm ein genetisches Mosaik ist. Dann wäre das fremde Gen zwar in vielen Zellen des Lamms präsent, aber vielleicht nicht in der Milchdrüse, was das Tier als Produzenten ungeeignet machen würde, und/oder nicht in den Keimzellen, so daß das Transgen nicht weiterverbt werden kann.

- Und schließlich lassen sich bei der Kerntransfermethode als Kernspender von vornherein weibliche Zellen auswählen – bei der alten Methode ist dagegen zunächst unklar, ob sich aus der befruchteten Eizelle, in die das neue Gen injiziert wird, ein weibliches oder männliches Tier entwickeln wird. Ist das transgene Lamm männlich, muß man es kreuzen und eine weitere Generation abwarten, bevor man weiß, ob das gewünschte neue Protein auch wirklich in der Milch erscheint (Schnieke et al. 1997) – bei Großtieren ein erheblicher Zeitverzug.

Colman meinte im Interview mit uns zur Kerntransfermethode: „You can look upon that in two ways: commercially it's cheaper, and from the animal welfare aspect: you're using less animals.“ PPL will jetzt, so Colman, wegen der höheren Milchleistung auf Kühe umstellen, was die ganze Produktion noch weiter vereinfache, kosteneffektiver mache und die Markteinführung eines neuen Produkts erheblich beschleunige: Man könne auf einen Schlag durch die Kerntransfermethode zehn Kühe generieren, und damit ließe sich für die meisten in Frage kommenden therapeutisch nutzbaren Proteine der Weltbedarf decken. Die Kühe wären alle transgen und genetisch identisch, doch letzteres sei gar nicht wichtig, wichtig sei vielmehr, daß man nicht mehr über viele Generationen eine große Herde heranzüchten müsse. (Colman: „Cloning is to produce the transgenic animals, not to multiply them. But with cows we wouldn't have to worry about breeding by any route, we would just make ten cows, and that's it.“) Er wies auch daraufhin, daß es wenig sinnvoll sei, adulte Zellen als Kernspender zu verwenden; bei der Produktion transgener Tiere seien fetale Zellen vollkommen ausreichend und schon allein aus Effizienzgründen vorzuziehen.

An weiteren Proteinen produziert PPL nach Aussagen Colmans derzeit in Schafen Fibrinogen zur Verwendung als Gewebekleber, den schon oben erwähnten Gerinnungshemmer Protein C sowie eine Lipase mit dem Kürzel BSSL (für *bile salt-stimulated lipase*), die die Verwertung von Lipiden im menschlichen Darm erhöhen kann, besonders bei Frühgeborenen (Karatzas & Turner 1997). Für BSSL erwartet Colman den Beginn klinischer Versuche in diesem Jahr, ebenso eine erste klinische Testreihe zur Behandlung des Laurell-Eriksson-Syndroms mit schafsproduziertem  $\alpha_1$ -Antitrypsin.

In Kühen sei zunächst geplant, humane Milchproteine einzuführen, etwa humanes  $\alpha$ -Lactalbumin zur besseren Verwertbarkeit von kuhmilchbasierter Säuglingsnahrung und

zur Herabsetzung von Allergien. Eine mutierte Version dieses Lactalbumins, das kein Phenylalanin mehr enthält, sei ebenfalls in Planung, als Kost für Säuglinge, die an der erblich bedingten Phenylketonurie leiden. Ian Wilmut hielt zudem die Produktion monoklonaler Antikörper oder von humanem Hämoglobin in Tiermilch für ein lohnenswertes Unterfangen.

Das Gen-Pharming stellt also die Produktion neuer Arzneimittel und sogenannter „therapeutischer Nahrungsmittel“ („Nutraceuticals“) in Aussicht, die vorher kaum herzustellen waren, und deren Notwendigkeit und Wert zumindest umstritten sind. Die Produktion in transgenen Tieren scheint dabei kostengünstiger zu sein als beispielsweise in der Zellkultur, wobei allerdings fraglich ist, ob die Firmen den Kostenvorteil an Patienten und Krankenversicherungen immer entsprechend weitergeben. Darüber darf jedoch nicht in Vergessenheit geraten, daß bei dieser Produktionsweise eine Reihe von Problemen auftreten können:

- So stellt sich nach dem Einbringen eines Transgens – ob durch Injektion oder mittels Kernttransfer – zunächst die Frage, ob es tatsächlich exprimiert wird, und vor allem in ausreichender Höhe, damit sich die Isolierung des Proteins auch wirtschaftlich lohnt. Das ist nicht immer der Fall.
- Ferner muß das transgene Protein biologisch aktiv sein und frei von unverträglichen Nebenwirkungen. Das wäre wohl gegeben, wenn das Produkt identisch ist mit dem Originalprotein im Menschen, jedoch auch das ist wider Erwarten nicht stets der Fall. Häufig zeigen aus der Milch isolierte transgene Humanproteine ein geringeres Molekulargewicht als die Originalformen (Wilmut & Whitelaw 1994), was daran liegen kann, daß die Milchdrüse des Erzeugertieres nicht immer alle posttranslationalen Modifikationen so ausführt wie das Organ, in dem das Protein im Menschen normalerweise synthetisiert wird (meist die Leber).
- Darüber hinaus ist es wichtig, daß das Transgen genetisch stabil ist. In Tracy, dem ersten transgenen Schaf von PPL, das humanes  $\alpha_1$ -Antitrypsin erzeugte, war das nicht so: Tracy selbst hatte nach Aussagen Colmans 14 bis 16 Kopien des Transgens in ihrem Genom, ihre erste Tochter dagegen nur noch vier, ihr erster Sohn acht. Kopien des Transgens können also nach Mehrfachintegrationen (und die werden fast immer beobachtet) im Zuge normaler sexueller Reproduktion wieder verlorengehen. Die derzeitige Herde von  $\alpha_1$ -Antitrypsin produzierenden Schafen bei PPL sind daher auch nicht Tracys Abkömmlinge, sondern gingen aus einem neu erzeugten Tier hervor. In dieser Herde sei das Transgen aber schon in der fünften Generation stabil und werde verlässlich exprimiert, so Colman. Bei dem weiter oben beschriebenen Szenario mit dem Klonen von zehn Kühen auf einen Schlag entfällt das Problem natürlich, da keine sexuelle Vermehrung mehr notwendig ist und sich im Bedarfsfalle neue Kühe aus der einmal erzeugten transgenen Kernspenderzelllinie klonen lassen.

Nun sind dies Punkte, die eher die Interessen der Produktionsfirma beziehungsweise Fragen der Arzneimittelzulassung berühren. Hinzu kommen Probleme, die bei den betroffenen Tieren selbst auftreten können:

- Schon die Transgenese als solche könnte das Tier schädigen: Transgene integrieren in der Regel zufällig, können also auch vorhandene wichtige Gene unterbrechen und lahmlegen. Da Säuger von fast allen Genen zwei Kopien besitzen, hat das in der Regel keinen Effekt und würde sich erst in späteren Generationen im Falle einer Rein-erbigkeit für das Transgen bemerkbar machen (siehe jedoch dazu auch Abschnitt 2.2.4; die dort für die Insertion von Transposons aufgeführten Argumente gelten auch in diesem Fall).
- Ferner könnte das fremde Protein schädigende Wirkung im Tier haben. In der Milchdrüse selbst ist das zwar weniger zu erwarten, da das Protein abgegeben und ausgeschieden wird, doch völlig ausschließen läßt sich das nicht. Ein transgenes Protein könnte allerdings durchaus auch positive Effekte auf die Milchdrüse ausüben: Eine Kuh, die etwa menschliches Lysozym und Lactoferrin in ihrer Milch produziert, beides Substanzen mit antibakterieller Wirkung, würde möglicherweise seltener an Mastitis und Infektionen des Gesäuges leiden als eine normale Kuh (Karatzas & Turner 1997); diese Hypothese wurde allerdings noch nicht überprüft.
- Kritischer kann es werden, wenn das Protein in anderen Organen exprimiert wird. Man versucht zwar, das Transgen mit allen Kontrollelementen auszustatten, die eine ausschließliche Expression im Gesäuge sicherstellen, doch gelegentlich kommt eine „Sickerexpression“ in anderen Geweben vor (Wilmot & Whitelaw 1994, Velandar et al. 1997). Gründe dafür könnten überlagerte regulatorische Einflüsse des genomischen Ortes sein, in den das Transgen integriert ist, oder eventuell fehlende Kontrollelemente in seinem „Expressionsschalter“. Möglicherweise lassen sich solche Probleme reduzieren, wenn Transgene per Gen-Targeting in einen bestimmten Genomort plaziert werden können, etwa an die Stelle eines Gens für ein endogenes Milchprotein, was mit der Kerntransfermethode ja realistisch erscheint. Dann könnte man auf das Vorschalten von Kontrollelementen verzichten, da die bereits am Integrationsort vorhandenen nun wirksam würden, und die sollten korrekter arbeiten als künstlich angehängte, zudem entfielen eventuelle nachteilige regulatorische Einflüsse aus der Umgebung eines zufälligen Integrationsortes. Doch ein möglicher Übertritt des fremden Proteins in die Blutbahn des Tieres läßt sich dadurch auch nicht ausschließen, und laut Alan Colman kann dies ebenfalls vorkommen.

Wie stark ein transgenes Produzentier von dem fremden Protein geschädigt wird, ist daher im Einzelfall zu prüfen. Velandar et al. (1997) beobachteten eine geringe Produktion von menschlichem Protein C auch in den Speicheldrüsen ihrer transgenen Schweine, gehen aber davon aus, daß den Tieren dadurch keine Nachteile entstehen. Colman

dagegen berichtete uns über den Versuch, Erythropoetin<sup>40</sup> in Mäusemilch zu produzieren, und das war für die betroffenen Mäuse äußerst unzutraglich. („These mice were very sick, so we dropped that project.“) Zu beachten ist, daß viele der infrage kommenden Proteine schon in sehr geringen Konzentrationen eine massive Wirksamkeit entfalten - nicht von ungefähr reichen zehn Kühe aus, um den Weltbedarf zu decken -, so daß ein Übertritt ins Blut oder eine Fehlexpression in anderen Geweben für die Produzententiere erhebliche Folgen haben kann. PPL teste die Produktion eines neuen Proteins daher, so Colman, zuerst in Mäusen und lasse, falls nachteilige Effekte auftreten, von dem Projekt ab. Und auch Velandar et al. (1997) weisen darauf hin, daß die Gesundheit der Tiere an erster Stelle stehen müsse, schon allein deswegen, weil geschwächte Tiere für Infektionen anfälliger seien und dadurch die Produktqualität beeinträchtigt werden könne.

Dazu meinte Colman aber auch: „If you could make a product where three sick sheep would cure a hundred thousand people, would you think, it's ethical? And what is, if three sheep would cure a hundred people, or only one person ... Are ethics movable according to benefit over risk? Well, to date our view has been to have healthy animals, and they are.“

Ein Risiko, das die Patienten schließlich betrifft, die die Produkte nehmen, ist, sich mit tierischen Pathogenen infizieren. Zwar kann eine begrenzte Herde transgener Tiere sehr viel leichter auf Infektionen kontrolliert werden als eine Unzahl anonymer Blutspender, so daß die Wahrscheinlichkeit für Skandale wie die Aids- und Hepatitis-Infektionen bei Blutern durch verseuchte Plasmaprodukte sicherlich sinken würde. Doch auch Colman räumte ein, daß PPL seine Herden nicht jeden Tag auf Infektionen kontrollieren könne. Die Arbeit mit Kühen werde im übrigen in den USA gemacht, schlicht wegen BSE in Großbritannien. Dabei ist allerdings anzunehmen, daß diese Entscheidung wohl eher aus marktorientierten Erwägungen fiel. PPL dürfte sehr wohl auch in Schottland die Möglichkeit haben, garantiert BSE-freie Rinderherden zu halten, nur würde wahrscheinlich kaum ein Patient auf dem europäischen Kontinent das Produkt anwenden wollen, wenn er erführe, daß es von britischen Rindern stammt.

Das Problem bei der Produktion von Pharmazeutika in transgenen Tieren sind wahrscheinlich weniger die bekannten Pathogene; auf die läßt sich relativ leicht testen. Das Risiko besteht eher darin, daß Infektionswege für neue, zuvor unbekannte Pathogene eröffnet werden, die sich beim Aufreinigungsprozeß vielleicht nicht gänzlich entfernen lassen, und für die noch keine Tests verfügbar sind. Als Aids aufkam, gab es zunächst

---

<sup>40</sup> Ein Hormon, das die Blutbildung anregt und jüngst bei dem Doping-Skandal während der Tour de France auch einer breiteren Öffentlichkeit bekannt wurde.

auch keine Nachweismethode für den neuen Erreger in Blutspenden; und kaum jemand hätte damit gerechnet, das Rinder nach Verzehr von unzureichend denaturiertem, Scrapie-verseuchtem Schafsmehl an BSE erkranken können. Therapeutische Proteine dürfen in der Regel nicht denaturiert werden, sonst sind sie unwirksam; und viele von ihnen werden ins Blut injiziert, so daß eine wesentliche Schutzbarriere wegfällt – die der Passage durch den Verdauungstrakt und durch die Darmschleimhaut.

Als Fazit ist festzuhalten, daß das kerntransferbasierte Klonen die Erzeugung transgener Tiere zum Zweck der Produktion von (humanidentischen) pharmazeutisch einsetzbaren Proteinen im Vergleich zu den herkömmlichen Verfahren der Transgenesis effektiver und zielgerichteter macht. Dies kann im Einzelfall zu einer Reduktion der Zahl der dafür benötigten Versuchstiere führen. Auch ist der Zeitaufwand aufgrund der durch die Zellkultur gegebenen Vorselektionsmöglichkeiten geringer. Allerdings bleiben für die Tiere gewisse Risiken, die durch die Transgenesis, durch die biologische Aktivität des produzierten Proteins und durch das Klonverfahren selber bedingt sind. Gefährdungen für Menschen können durch Veränderungen der Produkte sowie durch die mögliche Aktivierung und Übertragung von Krankheitserregern entstehen, wobei vor allem erstere durch sorgfältige Arzneimittelprüfungen weitgehend ausgeschlossen werden können.

Schwer einschätzbar sind quantitative Aspekte. Diese betreffen u.a. die Frage, wieviele therapeutisch wirksame Stoffe mithilfe transgener Tiere tatsächlich hergestellt werden können bzw. sollen. Dies hängt sowohl von ihrer Verträglichkeit für die Tiere, als auch von ihrer Wirksamkeit im Menschen und von vorhandenen Indikationen für ihre Anwendung ab. Angesichts der mithilfe transgener Tiere möglichen Produktionsmengen könnte es dabei durchaus sein, daß der Bereich der „therapeutischen Nahrungsmittel“ - der „Nutraceuticals“ - verstärkt in den Blick genommen wird, weil die Märkte dafür sehr viel größer und vielfältiger sein können. Darüber läßt sich bei heutigem Entwicklungsstand der Transgenesis- und Klontechnologie allerdings nur spekulieren.

### **3.2 Xenotransplantation**

Ein weiterer Bereich, in dem die Herstellung und der Einsatz transgener Tiere verfolgt wird, ist die Xenotransplantation, also die Transplantation von Tierorganen in den Menschen. Dazu ist es jedoch notwendig, Organe oder Gewebe von Tieren für Menschen besser verträglich zu machen. Firmen wie Novartis, auch Baxter (Nextran), US Surgical Corporation (Alexiar) und PPL, forschen an dieser Möglichkeit, denn es wird ein großer Bedarf an transplantierfähigen Organen konstatiert: Die Organtransplantation ist

inzwischen für zahlreiche chronische Erkrankungen die Behandlungsmethode der Wahl, da sie entweder die einzige Möglichkeit zur Lebensrettung darstellt oder eine bedeutende Verbesserung der Lebensqualität der Patienten verspricht.

Die Nachfrage nach transplantierbaren Organen steigt ständig. Gründe dafür sind unter anderem verbesserte Techniken der Immunsuppression, wodurch auch frühere Risikogruppen wie Säuglinge, Diabetiker und Ältere von dieser Technik profitieren können. Allein in Deutschland wurden 1996 rund 2000 Nieren, 500 Herzen und 700 Lebern transplantiert. Ungefähr doppelt so viele Patienten warten auf eine Leber oder ein Herz, mehr als 8000 Dialysepatienten warten auf eine Niere (Eurotransplant 1997). 30 Prozent der auf eine Leber oder ein Herz Wartenden sterben während der Wartezeit (Hammer 1995). Dieser Mangel an Spenderorganen führt zu einem starkem Interesse an alternativen Organressourcen. Der Xenotransplantation wird dabei eine Schlüsselstellung zugeschrieben. Bei ihrer Entwicklung spielen bio- und gentechnische Methoden zur Überwindung der Abstoßungsreaktion eine entscheidende Rolle. Besonders bei der Realisierung der Xenotransplantation solider Organe wie Herz, Niere, Leber und Lunge setzen die Wissenschaftler auf gentechnische Methoden und die Züchtung geeigneter transgener Tiere. Je besser das menschliche Immunsystem die tierischen Organe akzeptiert, um so geringer kann die Belastung des Patienten durch eine systemische Immunsuppression gehalten werden.

Die Realisierung der Xenotransplantation mittels verträglicher und funktionsfähiger tierischer Organe könnte nicht nur das Leben vieler auf Organe wartender Menschen retten, weil Transplantationszeitpunkte nicht mehr nach Organverfügbarkeit, sondern nach medizinischen Kriterien bestimmt würden. Darüber hinaus würde auch solchen Patientengruppen der Zugang zu Transplantaten ermöglicht werden, denen diese Behandlungsmethode bisher verschlossen blieb.

Frühere Versuche, die Xenotransplantation beim Menschen durchzuführen, sind stets gescheitert. Ein gewisser Erfolg konnte nur bei der Transplantation von Schimpansenieren auf den Menschen verzeichnet werden: Eine Patientin überlebte 1964 neun Monate mit dem Affenorgan (Reemtsma 1991). Dagegen verliefen die jüngsten Experimente mit der Transplantation zweier Pavianlebern in den Jahren 1992 und 1993, bei der die Überlebenszeit der Patienten 70 bzw. 26 Tage betrug, nicht erfolgreich (Starzl et al. 1993, 1994). Bei Betrachtung der Autopsieergebnisse stellt sich die Frage, ob die Organe ihre Funktion im Rezipienten überhaupt wahrgenommen haben.

Als Organquellen für den Menschen werden mittlerweile von den meisten Experten Schweine favorisiert (Cooper et al. 1991). Diese haben verschiedene Vorteile gegenüber Affen, die aufgrund ihrer nahen Verwandtschaft zum Menschen zunächst im Zent-

rum des Interesses standen. Zu diesen Vorteilen von Schweinen zählen zum Beispiel die freie Verfügbarkeit, eine für die Transplantation auf den Menschen geeignete Organgröße bei Tieren bestimmter Rassen sowie anspruchslosigkeit und damit geringe Kosten in Aufzucht und Haltung. Aufgrund der entwicklungsgeschichtlichen Entfernung ist außerdem die Übertragung von Pathogenen von Schweinen auf den Menschen weniger wahrscheinlich als bei näher verwandten Arten. Darüber hinaus werden für das Schwein auch geringere Kontroversen um die prinzipielle Nutzung von Tieren zum Zweck der Organexplantation erwartet, da in der westlichen Welt ohnehin schon pro Jahr und Person etwa ein Schwein zur Nahrungsproduktion aufgezogen wird (Hammer 1993).

Schweine könnten mittels der Kombination aus kontrolliertem Gen-Knockout und dem Einfügen neuer Gene so verändert werden, daß die Abstoßung ihrer Organe im Menschen zumindest abgeschwächt wird. Durch kerntransferbasiertes Klonen erscheint dieses Ziel schneller erreichbar als bislang vermutet. Ein gezieltes Ausschalten von Genen wie bei der Maus war in Schweinen mangels geeigneter embryonaler Stammzellen ohnehin noch nicht möglich. Nun scheint die Kerntransfertechnik den Weg dahin zu öffnen. Auch könnte ein so gewonnenes Organspender-Schwein durch kerntransferbasiertes Klonen zumindest theoretisch unbegrenzt oft kopiert werden: Dadurch wäre gewährleistet, daß die künstlich eingebrachten Genveränderungen (davon sind viele notwendig, siehe unten) als kompletter Satz in den geklonten Tieren zusammenbleiben. Die natürliche sexuelle Vermehrung eines vielfach transgenen Schweins wäre zwar billiger, doch kaum zweckmäßig: Dabei würden die Transgene segregieren, also unabhängig voneinander vererbt werden, so daß die entstehenden Ferkel manche oder auch alle der veränderten oder hinzugefügten Gene verloren haben können und von daher als Organspender für Menschen nicht mehr geeignet wären.

Freilich ist das Klonen von Schweinen durch Kerntransfer noch ungleich schwieriger als das von Kühen oder Schafen, wie uns Colman bestätigte. Niemann führt das hauptsächlich darauf zurück, daß Schweine für die Forschung (Landwirtschaft) bisher von geringerem Interesse waren als Rinder, und einfach weniger Erfahrung im Umgang mit Schweinezellen bei *in vitro*-Techniken vorhanden ist. Erst im Zuge der Xenotransplantation "stürzen" sich mehr Arbeitsgruppen auf Schweine. Das will übrigens auch Niemann, wie mir ein Doktorand aus seiner Gruppe erzählte. Die Methode, die bei Mäusen schließlich zum Erfolg führte (Wakayama et al. 1998), könnte hier Abhilfe schaffen. PPL will daher mit der Gruppe von Wakayama und Yanagimachi zusammenarbeiten, um Schweine zu klonen. Aber auch wenn die Erzeugung vielfach transgener Schweine, wie sie für die Xenotransplantation gebraucht werden, mit Hilfe der Kerntransfermethode nunmehr schneller erreichbar sein mag, ist ihre anschließende Vermehrung noch ein schwieriges logistisches Problem. Damit ihre vielen Transgene nicht von-

einander segregieren, müßten solche Schweine vermutlich stets nachgeklont werden. Der vermutete Bedarf an Spenderorganen würde aber erfordern, daß zehntausende von Schweinen geklont werden, und das ist derzeit selbst bei Schafen absolut impraktikabel. Alternativ ließen sich vielleicht aus einer kleinen Zahl durch Klonen erzeugter transgener Ursprungsschweine durch Inzuchtkreuzungen Nachkommen züchten, die schließlich in allen verlangten transgenen Merkmalen reinerbig sind. Aus diesen Nachkommen könnten dann ggf. die Herden entstehen, die den Bedarf an Transplantationsorganen decken.

Doch das ist nur die eine Seite des Problems, und zwar genau genommen die weniger schwierige. Denn schon die Herstellung von für Transplantationszwecke geeigneten, transgenen Schweinen ist mit einer Fülle von wissenschaftlichen und technischen Schwierigkeiten konfrontiert. Sie sollen im Folgenden kurz skizziert werden, ebenso wie einige der Strategien, die zu ihrer Überwindung vorgeschlagen und untersucht werden.

### **3.2.1 Abstoßungsreaktionen**

Die Erkennung des fremden Organs durch die Immunabwehr des Empfängers bereitet auch bei der Allotransplantation noch Probleme, allerdings verlaufen die Abstoßungsreaktionen bei Xenotransplantationen naturgemäß ausgeprägter als bei der Transplantation von Organen innerhalb einer Spezies. Die Abstoßung solider Organe wie des Herzens, der Niere, Leber oder Lunge unterscheidet sich darüber hinaus von der Abstoßung zellulärer oder Gewebetransplantate, da diese keine Vaskularisierung, d.h. Blutgefäße mit Endothelzellen des Donors aufweisen. Erst nach der Transplantation erfolgt die Neovaskularisierung, der Anschluß des Transplantats an das Gefäßsystem des Empfängers durch dessen eigene Zellen.

Die Formen der Transplantatabstoßung solider Organe lassen sich nach Zeitpunkt des Auftretens und nach Auslösemechanismus unterscheiden in:

- hyperakute Abstoßung,
- akute vaskuläre Abstoßung / verzögerte Abstoßung,
- zellvermittelte Abstoßung und
- chronische Abstoßung.

Wir wollen diese Formen im folgenden einzeln erörtern.

#### *I. Hyperakute Abstoßung*

Bei der Transplantation zwischen weit entfernten Arten, wie z.B. zwischen Mensch und Schwein (diskordante Xenotransplantation, Calne 1970) kommt es innerhalb von Minuten bis Stunden zur hyperakuten Abstoßung des Xenotransplantats. Dabei ist die Aktivierung des Komplementsystems ein zwingend notwendiger Schritt. Entscheidend für den Ablauf der Reaktion sind zwei Faktoren (Lawson & Platt 1996):

1. Die Existenz sogenannter xenoreaktiver Antikörper, die an die Endothelzellen in den Blutgefäßen des transplantierten Organs binden und zur Aktivierung des Komplementsystems führen, und
2. die Anfälligkeit des transplantierten Organs gegenüber dem Komplementangriff des Empfängers.

Die xenoreaktiven Antikörper (im folgenden XNA = *xenoreactive natural antibodies*) des Menschen sind hauptsächlich gegen ein einziges Oberflächenepitop<sup>41</sup> der Endothelzellen gerichtet, den Kohlenhydratrest Galaktosyl- $\alpha$ -(1,3)-Galaktose (Good et al. 1992, Collins et al. 1995). Dieser Zuckerrest ist in allen niederen Säugern und Neuweltaffen vorhanden, nicht aber in Menschen und Altweltaffen, da ihnen das zur Synthese dieses terminalen Kohlenhydrats notwendige Enzym fehlt, die  $\alpha$ -1,3-Galaktosyltransferase (Galili et al. 1987). Schon vor erstmaligem Kontakt mit dem Antigen weisen Menschen und Altweltaffen sogenannte präformierte Antikörper gegen die Struktur der Galaktosyl- $\alpha$ -(1,3)-Galaktose auf. Die Produktion der XNA ist vermutlich auf die Stimulation des Immunsystems durch Mikroorganismen des Verdauungstraktes zurückzuführen, die ebenfalls diese Epitope tragen (Squinto 1997). Die Bindung der Antikörper an das Ziel-epitop führt zur Aktivierung des Komplementsystems. Es besteht aus einer Vielzahl von Plasmaproteinen, gehört zur angeborenen, unspezifischen Immunität und führt unter anderem zur Lyse der Zielzellen und zur Freisetzung proinflammatorisch wirksamer Mediatoren.

Die Endothelzellen des Transplantats sind dem Angriff des Komplementsystems ungeschützt ausgesetzt, weil die Komplementregulatorproteine auf der Oberfläche des Schweineendothels das menschliche Komplementsystem nicht hemmen können. Diese Regulatorproteine<sup>42</sup> schützen körpereigene Zellen vor dem Angriff des Komplementsystems, wirken jedoch nur speziespezifisch (Miyagawa et al. 1988, Dalmaso et al. 1991).

Im Verlauf der hyperakuten Abstoßungsreaktion kommt es zur Bildung von Blutungen und Blutgerinnseln und durch den Gefäßverschluß schließlich zum Absterben des Transplantats (Platt et al. 1991). Die pathologischen Veränderungen werden dabei aber

---

<sup>41</sup> Bei einem Epitop handelt es sich um eine molekulare Struktur, die auf der Zelloberfläche präsentiert wird und somit von den Zellen des Immunsystems erkannt werden kann.

<sup>42</sup> beispielsweise DAF (CD 55, *decay accelerating factor*), MCP (CD 46, *membrane cofactor protein*) und CD59.

nicht durch die komplementvermittelte Lyse der Endothelzellen, sondern vielmehr durch nicht-cytotoxische Auswirkungen des Komplementsystems auf die Endothelzellen ausgelöst, die zu einer Veränderung von Struktur und Eigenschaften dieser Zellen führen (Typ-I-Aktivierung nach Bach et al. 1994, 1997a, Robson et al. 1995). Entscheidend ist dabei zum einen der Verlust der Barrierenfunktion des Endothels und zum anderen der Wandel von einem der Blutgerinnung entgegenwirkenden (anti-koagulatorischen) in einen blutgerinnungsfördernden (pro-koagulatorischen) Zustand. Zunächst kommt es zur Bildung interzellulärer Lücken durch Zellrektion, so daß der Inhalt der Gefäße freigesetzt und die Anheftung und Aktivierung von Thrombozyten ermöglicht wird. Diese wiederum setzen Plättchenfaktoren und vasoaktive Substanzen frei, so daß die Umgebung durch Anlagerung und Aktivierung verschiedener Blutgerinnungsfaktoren extrem gerinnselfördernd wird. Dieser Vorgang kann durch verschiedene Faktoren verstärkt werden<sup>43</sup>.

#### *Strategien zur Überwindung der hyperakuten Abstoßungsreaktion*

Denkbar für eine Verlängerung der Überlebenszeit des Xenotransplantats sind grundsätzlich Eingriffe am Organempfänger oder im Spendertier bzw. im transplantierten Organ. Ziel der meisten aktuellen Ansätze ist es, statt einer systemischen Immunsuppression des Patienten lediglich eine lokale Hemmung der Immunreaktion zu induzieren. Die zu diesem Zweck notwendigen speziellen genetischen Veränderungen im Gewebe des zu transplantierenden Organs sollen in transgenen Tieren verwirklicht werden. Die Inhibition der hyperakuten Abstoßungsreaktion kann an verschiedenen Punkten des Reaktionsablaufs ansetzen:

1. Entfernung der präformierten xenoreaktiven Antikörper,
2. Entfernung des Zielepitops der xenoreaktiven Antikörper von den Endothelzellen,
3. Inhibition des Komplementsystems, und
4. Verminderung der Anfälligkeit des Spenderorgans gegenüber dem Komplementangriff des Rezipienten.

---

<sup>43</sup> Eine Verstärkung des Vorgangs erfolgt durch eine verminderte Aktivität der Ekto-ATPDase (CD39), die ATP und ADP in AMP umwandelt. Auf diesem Weg verhindert das Enzym die Wirkung von ADP als Stimulanz für die Plättchen und entfernt die pro-inflammatorisch wirkenden Substanzen ATP und ADP. Das Abbauprodukt Adenosin wirkt anti-inflammatorisch und anti-aggregatorisch. Eine Verstärkung erfolgt auch durch die Freisetzung von Heparansulfat von der Oberfläche der Endothelzellen. Heparansulfat unterstützt die Aktivität von Antithrombin III, welches unter anderem zahlreiche Proteasen aus der Blutgerinnungskaskade inhibiert und dadurch die Blutgerinnung verhindert. Denkbar ist auch, daß die Veränderung im Zustand der Endothelzellen durch die Bindung von XNA an Galaktosyl- $\alpha$ -(1,3)-Galaktose-Reste von Integrinen erzeugt wird. Die Signaltransduktion durch die Integrine könnte zur Aktivierung der Endothelzellen führen (Holzknecht & Platt 1995).

## 1. Entfernung der präformierten xenoreaktiven Antikörper (XNA)

Die Entfernung der xenospezifischen Antikörper aus dem Organismus des Patienten kann durch verschiedene Methoden erfolgen. Eine davon ist die Immunoabsorption an einer Säule, an deren Matrix die Epitope des Donor-Organismus gekoppelt wurden, oder die *ex vivo*-Absorption an einem Xeno-Organ. In beiden Fällen binden die Antikörper an ihr Zielepitop, werden also quasi weggefangen und so aus dem Blutkreislauf entfernt (Bach et al. 1991, Leventhal 1997). Denkbar ist auch eine Verdrängung der vom Empfänger gebildeten Antikörper von den Zielepitopen durch Verabreichung freier Oligosaccharide zur Bindung der XNA, oder die *in situ*-Blockade der XNA durch sogenannte anti-idiotypische Antikörper, die wiederum gegen bestimmte Epitope der xenoreaktiven Antikörper gerichtet sind (Neethling et al. 1997, Koren et al. 1997). Diese Methode kann auch die Neusynthese xenoreaktiver Antikörper inhibieren, da eine Bindung der anti-idiotypischen Antikörper an die xenoreaktiven Antikörper auf der Oberfläche der entsprechenden B-Lymphozyten erfolgt. Die bisher zur Verfügung stehenden, gegen B-Zellen gerichteten Immunsuppressiva wie z.B. Cyclophosphamid, scheinen u.a. aufgrund ihrer Toxizität für den Einsatz im Patienten über einen längeren Zeitraum nicht geeignet. Eine dauerhafte Unterdrückung der Produktion xenoreaktiver Antikörper kann daher möglicherweise nur durch eine Spendertier-spezifische Nichtreaktivität bzw. B-Zell-Toleranz verhindert werden. Die Wege zur Induktion der B-Zell-Toleranz sind analog zu den weiter unten beschriebenen Maßnahmen zur Erzeugung der T-Zell-Toleranz über chimäre Immunsysteme.

## 2. Entfernung des Zielepitops der xenoreaktiven Antikörper von den Endothelzellen

Da sich ein Großteil der xenoreaktiven Antikörper gegen ein einziges Epitop richtet, verspricht man sich von der Entfernung dieses Oberflächenantigens, der Galaktosyl- $\alpha$ -(1,3)-Galaktose, eine umfassende Unterdrückung der hyperakuten Immunreaktion. Die natürliche Variabilität in der Konzentration des Oberflächenantigens bei Schweinen würde allerdings nicht ausreichen, um mit Hilfe klassischer Züchtungsmethoden Tiere mit hinreichend geringer Konzentration dieses Antigens zu erzeugen. Optimal zur Erzeugung eines „Universal-Donors“ wäre deshalb die Ausschaltung dieses Gens mit Hilfe eines „Knockouts“ der  $\alpha$ 1,3-Galaktosyltransferase, also des zur Synthese des terminalen Kohlenhydratrestes benötigten Enzyms.

Diese Methode läßt sich jedoch bei Schweinen mangels geeigneter embryonaler Stammzellen noch nicht durchführen. Es wird daher angestrebt, das Verfahren der homologen Rekombination an anderen Schweinezellen durchzuführen und durch anschließenden Kerntransfer in entkernte Eizellen Knockout-Schweine zu erzeugen (Niemann 1998, Campbell 1998). Denkbar ist auch die Produktion transgener Tiere, die eine antisense-RNA zur  $\alpha$ 1,3-Galaktosyltransferase produzieren, so daß die Expression des Enzyms inhibiert wird (Strahan et al. 1995). Alternativ zum Knockout-Prinzip ist die Integration eines Gens für ein konkurrierendes Enzym wie die  $\alpha$ 1,2-Fucosyltransferase (H-Transferase) denkbar. Dieses Enzym führt durch Übertragung des entsprechenden terminalen Zuckers zur Synthese eines universell tolerierten Oberflächenantigens, welches dem der Blutgruppe 0 entspricht (H-Antigen). Gegen diesen Rest werden keine Antikörper gebildet. Bei Überexpression der  $\alpha$ 1,2-Fucosyltransferase kommt es zur Verdrängung der Reaktion, die durch die  $\alpha$ 1,3-Galaktosyltransferase katalysiert wird. Für die 1,2-Fucosyltransferase transgene Schweine wurden bereits hergestellt (Hayashi 1997). Möglicherweise birgt das Verfahren der Verdrängung sogar Vorteile gegenüber dem Knockout der Galaktosyltransferase, da das Fehlen des terminalen Galaktosyl- $\alpha$ -(1,3)-Galaktose-Restes zur Exposition anderer, möglicherweise ebenfalls immunogener Kohlenhydratreste führen kann.

### 3. Inhibition des Komplementsystems

Die Aktivierung des Komplementsystems kann im Organempfänger durch verschiedene Substanzen verhindert werden, z.B. durch lösliche Komplementrezeptoren wie sCR1 (Pruitt et al. 1991, 1994), Cobravenomfaktor (Kobayashi et al. 1997) oder monoklonale Antikörper gegen bestimmte Komponenten des Komplementsystems (z.B. Kroshus et al. 1995). Diese Methoden können aber nicht nur durch erhöhte Expression der betroffenen Komponenten konterkariert werden, sondern führen darüber hinaus zu einer systemischen Inhibition des Komplementsystems und somit zu einer Immunsuppression, die das gewünschte Maß überschreitet. Eine Alternative stellen lösliche Hemmstoffe mit spezifischen Kohlenhydratresten dar, die zur Anheftung an die Zielregionen führen, zum Beispiel an die Adhäsionsmoleküle aktivierter Endothelzellen (Ryan 1995). Bei dieser Methode kann die Inhibition des Komplementsystems an die individuellen Bedürfnisse des Patienten angepaßt werden.

### 4. Verminderung der Anfälligkeit des Spenderorgans gegenüber dem Komplementangriff des Rezipienten

Die spezie-spezifische Wirksamkeit der Komplementregulatorproteine erfordert die Expression humaner Regulatoren auf der Oberfläche der Endothelzellen im Xenorgan. Bisher wurden bereits transgene Schweine mit den entsprechenden menschlichen Proteinen<sup>44</sup> und verschiedenen Kombinationen dieser Proteine erzeugt (Fodor et al. 1994, Rosengard et al. 1995, McCurry et al. 1995, Byrne et al. 1997). Bei der Transplantation von Organen transgener Schweine auf Primaten wurde dadurch die hyperakute Abstoßung verhindert, so daß die Abstoßung der Organe über die akute vaskuläre Abstoßungsreaktion erfolgt. In einem Fall überlebten transgene Schweineherzen bei starker Immunsuppression bis zu 60 Tagen in Cynomolgus-Affen (*Macaca cynomolgus*), wurden allerdings nur zusätzlich zum eigenen Herzen an den Kreislauf der Tiere angeschlossen, ohne eine Pumpfunktion wahrzunehmen. Bei orthotopen Herztransplantationen, bei denen das Organ an seinen natürlichen Ort plaziert wurde, überlebten die Tiere noch nicht länger als neun Tage. Die meisten dieser Ergebnisse wurden darüber hinaus nicht in wissenschaftlichen Zeitschriften („peer-reviewed“) publiziert, da sie von kommerziellen Unternehmen durchgeführt wurden (Bach 1997). Nieren transgener Schweine funktionierten bis zu 78 Tagen in Primaten, mit einem Median von 39 Tagen (Zaidi et al. 1998). Die hyperakute Abstoßung, die seit mehr als 30 Jahren als das Kernproblem der Xenotransplantation betrachtet wurde, scheint daher auf dem Weg der Einführung humaner Komplementregulatorproteine in den Spenderorganismus nicht mehr unüberwindbar.

## II. Akute vaskuläre Abstoßung / Verzögerte Abstoßung des Xenotransplantats

Wenn die hyperakute Abstoßungsreaktion zum Beispiel durch Komplementinhibitoren verhindert werden kann, kommt es dennoch innerhalb von Tagen oder Wochen nach der Xenotransplantation zur Abstoßung des Xenotransplantats. Zu unterscheiden ist zwischen den Theorien der sogenannten *verzögerten Abstoßungsreaktion* (DXR=delayed xenograft rejection; Blakely et al. 1994) und der *akuten vaskulären Abstoßungsreaktion* (AVR=acute vascular rejection; Leventhal et al. 1993). Das Konzept der DXR konzentriert sich auf die Infiltration des Organs durch bestimmte Zellen des Immunsystems, die Monocyten und die natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) ohne Beteiligung von T-Zellen, während die Theorie der akuten vaskulären Abstoßung auch der Produktion xenospezifischer Antikörper durch die Lymphozyten des Organempfängers eine besondere Rolle zuschreibt. Die Konzentration xenospezifischer Antikörper steigt nach Kontakt mit dem artfremden Organ, und korreliert mit der Entwicklung der akuten vaskulären

---

<sup>44</sup> Das sind humanes DAF (CD55, *decay accelerating factor*), MCP (CD46, *membrane cofactor protein*) oder CD59 (Protectin).

Abstoßungsreaktion. Das Entfernen der Antikörper verzögert hingegen das Auftreten der Abstoßungsreaktion (Lawson & Platt 1996). Anders als die hyperakute Abstoßung kann die DXR/AVR auch bei der Transplantation von Geweben erfolgen, wenn es an einigen Stellen des Transplantats zu spontanen Verbindungen (Anastomosen) zwischen Donor- und Rezipientenkapillaren kommt (Platt 1998).

Der genaue Mechanismus dieser Form der Transplantatabstoßung ist noch nicht bekannt. Charakteristisch ist eine Reihe von Veränderungen der Endothelzellen im Transplantat, die zusammen als Typ-II-Aktivierung bezeichnet werden (Bach et al. 1995). Die meisten dieser Veränderungen werden durch den Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B vermittelt (Baeuerle & Henkel 1994). Im Verlauf der Aktivierung kommt es zur Induktion zahlreicher pro-inflammatorischer und pro-koagulatorischer Gene und zur Bildung der entsprechenden Proteine, zur Inhibition anti-koagulatorischer Gene und zu einer komplexen Cytokin-Antwort<sup>45</sup>.

Eine weitere Rolle spielen wahrscheinlich molekulare Unverträglichkeiten, die die normale Regulation der Blutgerinnung verhindern. Ein Beispiel ist die Wechselwirkung zwischen Thrombomodulin und Thrombin, die gemeinsam das antikoagulatorisch wirkende Protein C aktivieren. Das Thrombomodulin des Schweins ist jedoch nicht in der Lage, mit dem humanen Thrombin zu interagieren, so daß es lokal zum Mangel an aktivem Protein C und daher zur Koagulation kommt (Lawson et al. 1997).

Im Zuge der Organabstoßung kommt es als Folge der aufgeführten Veränderungen zur Bildung von Blutungen und Blutgerinnseln; anders als bei der hyperakuten Abstoßungsreaktion läßt sich jedoch darüber hinaus eine im Zwischengewebe liegende Entzündungsreaktion feststellen. Das Transplantat wird hauptsächlich mit Monocyten und natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) infiltriert, die wahrscheinlich in aktiviertem Zustand vorliegen (Bach et al. 1997b).

### *Strategien zur Überwindung der akuten vaskulären Abstoßung / verzögerten Abstoßung*

---

<sup>45</sup> Zu nennen sind hier beispielsweise (Bach et al. 1995, 1997c) die Induktion verschiedener Adhäsionsmoleküle (E-Selektin, VCAM-1), die zur Bindung von Leukozyten und zur Infiltration des Gewebes führen, die Verminderung der tPA-Aktivität (tissue-type plasminogen activator), des Faktors, der Plasminogen aktiviert und auf diesem Wege die Fibrinolyse nach der Blutgerinnung ermöglicht, die Verminderung der Thrombomodulin-Expression auf den Endothelzellen (Infolgedessen sinkt die Aktivierungsrate des antikoagulatorisch wirksamen Proteins C, welches verschiedene Proteine der Blutgerinnungskaskade spaltet. Aktives Protein C wirkt nicht nur anti-koagulatorisch, sondern auch anti-inflammatorisch), die Verminderung der Konzentration von Heparansulfat auf der Oberfläche der Endothelzellen (Dies führt zur verringerten Aktivität von Antithrombin III, welches zahlreiche Proteasen aus der Blutgerinnungskaskade inhibiert und dadurch die Blutgerinnung verhindert.), der Verlust der Ekto-ATPDase Aktivität, die Erhöhung der Expression des Gewebefaktors (tissue factor), der als einer der Hauptinitiatoren bei der Blutgerinnungskaskade wirkt, die Induktion von IL-1, IL-6, IL-8 und MCP (*monocyte chemoattractant protein*) und die Freisetzung vasokonstriktorischer Botenstoffe wie Endothelin-1 und Prostacyclin.

Welcher Mechanismus der AVR/DXR tatsächlich zugrundeliegt, darüber wird kontrovers diskutiert (Bach et al. 1996, Parker et al. 1996). Wahrscheinlich spielt auch die Anwesenheit präformierter und induzierter xenoreaktiver Antikörper dabei eine Rolle, so daß eine effektive Immunsuppression der B-Zellen – anders als bei den präformierten Antikörpern der hyperakuten Abstoßung – inhibitorisch wirksam sein kann (Platt 1998). Allerdings sind dafür, wie bereits angesprochen, noch keine Substanzen eingeführt, die weniger toxisch sind als das Cyclophosphamid und trotzdem eine effektive B-Zell-Suppression bewirken. Darüber hinaus wäre zur Unterdrückung dieses Reaktionsweges wie bei der hyperakuten Abstoßung eine Entfernung der Zielepitope sinnvoll.

Von der Transplantation ABO-inkompatibler Nieren kennt man das als Akkomodation bezeichnete Phänomen. Es ist dadurch charakterisiert, daß ein Transplantat in Anwesenheit spezifischer, gegen Oberflächenantigene des Organs gerichteter Antikörper und bei normalen Konzentrationen der Komplementproteine überleben kann, wenn die vorhandenen Antikörper vor der Transplantation entfernt wurden und die Konzentration der Antikörper erst später wieder ansteigt (Alexandre et al. 1987, Bach et al. 1991, Pruitt et al. 1997). Dieser Mechanismus kann auch bei der Überwindung der akuten vaskulären Abstoßung von Xenotransplantaten hilfreich sein. Allerdings sind die biologischen Grundlagen der Akkomodation noch weitgehend ungeklärt. Es könnten Veränderungen in der Antigen-Antikörper-Erkennung oder eine Form der „Resistenz“ der Endothelzellen gegen die Schädigung durch humorale Faktoren zugrunde liegen (Lawson & Platt 1996). Für die letztere Möglichkeit spricht die starke Expression sogenannter protektiver, anti-apoptotischer, den Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B inhibierender Gene wie A-20, A-1, bcl-2 und bcl-xL in akkomodierten Organen (Bach et al. 1997a).

Die Unterdrückung von NF- $\kappa$ B wird als der entscheidende Schritt bei der Überwindung der akuten vaskulären Abstoßung betrachtet, da dieser Transkriptionsfaktor eine Schlüsselstellung bei der Aktivierung der Endothelzellen einnimmt. Der physiologische Hemmfaktor I $\kappa$ B hat allerdings die unerwünschte Nebenwirkung, daß er die Endothelzellen für den durch den Tumornekrose-Faktor (TNF) vermittelten Zelltod (Apoptose) sensibilisiert. Absterbende Endothelzellen wiederum wirken stark gerinnselfördernd. Diese Nebenwirkung findet man bei einer verkürzten Variante des I $\kappa$ B-Proteins (p65RHD) nicht. Beide Inhibitoren führen zur verstärkten Expression bestimmter anti-apoptotischer Gene wie A-20, A-1, bcl-2, bcl-xL. Diese sogenannten protektiven Gene verhindern nicht nur die Apoptose, sondern inhibieren auch NF- $\kappa$ B und blockieren die Induktion pro-inflammatorischer Gene (Bach et al. 1997b). Anstelle der Expression eines NF- $\kappa$ B-Inhibitors in den Endothelzellen der zu transplantierenden Organe ist daher auch die Überexpression eines oder mehrerer der schützenden Gene denkbar.

Unter Einbeziehung aller Aspekte im Ablauf der akuten vaskulären Abstoßung erscheinen zur Inhibition folgende genetische Veränderungen an den Endothelzellen der Spenderorgane als sinnvoll:

- Expression eines NF- $\kappa$ B-Inhibitors ohne Apoptose-Sensibilisierung, bzw. Expression protektiver Gene,
- Expression eines verkürzten Rezeptors für den Tumornekrosefaktor, der das Signal nicht weiterleitet und so die Aktivierung der Zelle auf diesem Weg verhindert,
- Expression des humanen Thrombomodulins, das zum einen die Wechselwirkung mit humanem Thrombin ermöglicht und außerdem als „Fänger“ für Thrombin wirkt, so daß dieses seine entscheidende Funktion in der Aktivierung der Blutgerinnung nicht ausüben kann.
- Überexpression der ATPDase (CD39) und
- Expression des humanen TFPI (tissue factor pathway inhibitor), eines wichtigen Regulators der Blutgerinnung. Der Inhibitor des Schweins kann die hierfür erforderliche Interaktion mit dem humanen Faktor X nicht ausüben.

Heute wird davon ausgegangen, daß diese Maßnahmen sowohl die Blutgerinnung als auch die entzündliche Reaktion unterdrücken, die beide durch die Aktivierung der Endothelzellen ausgelöst werden. Darüber hinaus nimmt die Infiltration des Gewebes mit NK-Zellen und Monocyten sowie deren Aktivierung ab. Vermutlich wird darüber hinaus auch die T-Zell-Reaktion reduziert.

### III. Zellvermittelte Abstoßung

Die zelluläre Abstoßung erfolgt innerhalb von Tagen oder Wochen nach der Transplantation und ist wahrscheinlich auch an der chronischen Abstoßung beteiligt. Die zelluläre Immunreaktion gegen Xenotransplantate wird hauptsächlich durch T-Zellen und NK-Zellen vermittelt, wobei letzteren schon eine entscheidende Rolle bei der Auslösung der DXR zugeschrieben wird (Bach et al. 1995).

Die Aktivierung von T-Zellen durch xenospezifische Antigene kann durch *direkte* oder *indirekte Erkennung* erfolgen: Bei der *direkten Erkennung* kommt es zur Wechselwirkung einer T-Zelle mit einer Spenderzelle, die über ihren MHC ein (Xeno-)Selbstantigen präsentiert, während die *indirekte Erkennung* die Präsentation prozessierter (Xeno-)Antigene durch antigenpräsentierende Zellen (im folgenden: APC) des Rezipienten erfordert (Yamada et al. 1995). Die zunächst verbreitete Hypothese, daß zumindest die zelluläre Immunreaktion auf Xenotransplantate durch direkte Erkennung geringer sein würde als die auf Allotransplantate, stützte sich auf die Annahmen, daß

- xenogene MHC Moleküle von den T-Zellen des Empfängers nicht erkannt werden, weil im Thymus lediglich eine positive Selektion der Zellen stattfindet, die den eigenen MHC erkennen und eine geringe Kreuzreaktivität mit xenogenen MHC-Molekülen erwartet wurde. Die direkte Erkennung wurde daher ausgeschlossen.
- die Costimulation durch verschiedene Oberflächenrezeptoren, die zur Aktivierung der T-Zellen notwendig ist, nur spezie-spezifisch erfolgen kann.
- fehlende Cytokinwechselwirkungen die Verstärkung der Immunantwort verhindern. (Auchincloss 1995).

Mittlerweile ist jedoch bekannt, daß zumindest in der klinisch relevanten Kombination Schwein-Mensch die molekularen Wechselwirkungen eine direkte Erkennung ermöglichen. Endothelzellen des Schweins, welche wie beim Menschen durch Expression von MHC-II-Molekülen als APC fungieren können, führen *in vitro* zur starken Proliferation menschlicher Lymphocyten (Bravery et al. 1994, Rollins et al. 1994). Andererseits ist es auch denkbar, daß molekulare Inkompatibilitäten zum Versagen von Kontroll- oder Suppressormechanismen führen, die normalerweise die T-Zellantwort regulieren (Lawson & Platt 1996).

Anders als bei der Allotransplantation stellt aber auch die indirekte Erkennung bei der Xenotransplantation ein großes Problem dar, da eine nahezu unendliche Anzahl von xenoreaktiven Peptiden nach Prozessierung und Präsentation durch APC des Rezipienten zur zellvermittelten Immunität beitragen kann (Lawson & Platt 1996).

NK-Zellen gehören anders als die T-Zellen zur unspezifischen Immunität und können nach einer Xenotransplantation über verschiedene Mechanismen zu einer Schädigung des transplantierten Organs führen: Angriffe der NK-Zellen auf autologe Zellen werden normalerweise durch die Wechselwirkung der KIR (*killer inhibitor receptors*) auf den NK-Zellen mit den MHC-I-Molekülen auf der Oberfläche der körpereigenen Zellen verhindert (Ljunggren & Kärre 1985, Lanier & Phillips 1996). Die xenogenen MHC-Moleküle sind wahrscheinlich nicht in der Lage, mit den KIR zu interagieren und ermöglichen so den Angriff der NK-Zellen (Lawson & Platt 1996). Darüber hinaus kann auch die Bindung von Antikörpern an die Oberfläche der xenogenen Zellen zu einer Stimulation der NK-Zell-Aktivität führen (Inverardi et al. 1992). Der Beitrag der NK-Zellen zur Abstoßung von Xenotransplantaten wurde noch nicht ausreichend untersucht, er umfaßt aber vermutlich neben der typischen cytotoxischen Reaktion auch strukturelle Veränderungen, die in den Endothelzellen ausgelöst werden (Malyguine et al. 1996, 1997).

*Strategien zur Überwindung der zellvermittelten Abstoßung*

Obwohl bei Untersuchungen *in vitro* nur schwache T-Zell-Reaktionen auf xenogenes Gewebe meßbar sind, deutet sich *in vivo* eine deutlich stärkere Reaktion als bei Allogtransplantationen an. Die normalerweise übliche Immunsuppression, etwa durch Cyclosporin, kann daher nicht ausreichend sein, um das Überleben des Organs zu gewährleisten. Statt dessen wird nach Agentien gesucht, die durch Interaktion mit dem T-Zell-Rezeptor oder den costimulatorischen Rezeptoren zu einer antigen-spezifischen Inhibition der T-Zellen führen könnten:

- So soll die Vorbehandlung des Patienten mit Donorzellen bei gleichzeitiger Unterdrückung ko-stimulatorischer Signale die Aktivierung von T-Zellen durch die indirekte Erkennung von Xenopeptiden auf antigenpräsentierenden Zellen des Rezipienten verhindern (periphere Toleranz).
- Die *direkte Erkennung* kann möglicherweise durch die genetische Veränderung des Spendertiers unterdrückt werden.
  - Immunregulatorische Signale wie der Fas-Ligand, der auf der Oberfläche der Xenorgane verstärkt exprimiert wird, könnten den Zelltod der attackierenden T-Zellen auslösen (Platt 1998, Lechler 1997).
  - Immunmodulatorisch wirksame Cytokine könnten die direkte Umgebung des transplantierten Organs beeinflussen (Gianello 1997).
- Auch die Aktivierung und Proliferation spezifischer immunregulatorisch wirksamer T-Zellen wird angestrebt (Waldmann & Cobbold 1993), wodurch es zu einem Übergang zwischen den Gebieten der Toleranzinduktion und der Immunsuppression kommen würde (Platt 1998).

Als langfristiges Ziel wird von einigen Arbeitsgruppen die Induktion der spezifischen Toleranz gegenüber dem aus dem Spendertier stammenden Organ oder Gewebe angestrebt. Da in Patienten mit allogenen Langzeittransplantaten eine geringe Anzahl von Leukocyten des Spenders in verschiedenen Geweben wie z.B. Haut, Lymphknoten und Blut gefunden wurde (Starzl et al. 1992), gehen diese Gruppen davon aus, daß die Donorstammzellen des Immunsystems die Fähigkeit besitzen, aus den transplantierten Organen auszuwandern und im Rezipienten auch ohne die Mikroumgebung des Knochenmarks zu überleben. Obwohl der quantitative Unterschied zwischen den koexistierenden Spender- und Empfänger-Leukozyten extrem hoch ist, kommt es durch den Zellverkehr in zwei Richtungen anscheinend zur Induktion der gegenseitigen Nichtreaktivität (Starzl et al. 1996). Dieser „systemische Mikrochimärismus“ schützt in Tierversuchen weitere Transplantate desselben Donors vor der Abstoßung (Calne 1969).

Die kontrollierte Induktion eines solchen Chimärismus stellt daher eine vielversprechende Perspektive für die Xenotransplantation dar, die fast alle Ebenen der Abstoßung beeinflussen könnte. Hämatopoetische Stammzellen des Donors sollen dem Immunsystem des Rezipienten fremde Antigene präsentieren, so daß es entweder zur negativen

Selektion unreifer T-Zellen im Thymus oder in der Peripherie zur Nichtreaktivität oder zum Tod reifer T-Zellen kommt. Die Maßnahmen zur Herstellung des Chimärismus, - Bestrahlung und Verabreichung cytotoxischer Medikamente, - sind jedoch noch zu radikal, um beim Menschen angewendet zu werden: Bei Nagern wurden zur Toleranzinduktion eine Thymektomie, Ganzkörperbestrahlung und eine Entfernung aller T- und NK-Zellen durchgeführt, bevor fetales Schweinethymus- und fetales Schweinelebergewebe unter die Nierenkapsel transplantiert wurden, um die Rekonstitution des Immunsystems in Anwesenheit fremder Stammzellen durchzuführen (Zhao et al. 1996). In anderen Versuchen führte eine temporäre Ausschaltung des Immunsystems des Rezipienten (in dem Fall waren es nicht-menschliche Primaten) mit anschließender Knochenmarktransplantation vom zukünftigen Organdonor (Schwein) zwar zur Rekonstitution des Immunsystems in Anwesenheit beider hämatopoetischen Systeme, verhindert jedoch nicht die Rückkehr von xenospezifischen Antikörpern in Form von IgG, d.h. unter Beteiligung von T-Zellen (Sachs et al. 1995).

Aber auch das Überleben des xenogenen Knochenmarks muß in einer fremden Umgebung erst noch ermöglicht werden: Neben den Angriffen des Immunsystems beeinträchtigen möglicherweise fehlende Wachstumsfaktoren das Anwachsen der hämatopoetischen Zellen (Gritsch et al. 1994). Zu befürchten ist darüber hinaus, daß eine Toleranzinduktion sich unter Umständen nur auf die MHC-Moleküle des Donors, nicht aber die zahllosen anderen fremden Antigene erstrecken könnte (Platt 1998), da diese nicht während der Bildung der T-Zellen im Thymus verfügbar waren.

Dieses Problem tritt wahrscheinlich in ähnlicher Form auf, wenn für bestimmte MHC-Moleküle des Menschen transgene Schweine produziert werden: Es erfolgt dann zwar keine Reaktion mehr gegen diese Proteine, aber gleichzeitig wird der Mechanismus der direkten Erkennung durch T-Zellen verbessert. Die Immunreaktion gegen die präsentierten porcinen Antigene wäre möglicherweise sogar stärker als vor der Manipulation.

Der Schutz der Endothelzellen vor NK-Zellen allerdings würde durch die Expression humaner MHC-I- Moleküle möglicherweise gewährleistet, da diese mit den KIR auf der Oberfläche der NK-Zellen interagieren könnten (Seebach et al. 1997, Itescu et al. 1997, Munz et al. 1997). Darüber hinaus können Angriffe der NK-Zellen auch durch die Unterdrückung der Expression der Galaktosyl-a-(1,3)-Galaktose auf den Endothelzellen vermindert werden, da zumindest einer der Reaktionsmechanismen der NK-Zellen (ADCC = *antibody-dependent cell cytotoxicity*) von der Anwesenheit xenospezifischer Antikörper auf der Endotheloberfläche abhängt (Watier et al. 1996).

#### IV. Chronische Abstoßung

Die chronische Abstoßung tritt frühestens einige Monate nach der Transplantation auf. Über ihren Mechanismus ist auch bei Allotransplantationen nur sehr wenig bekannt. Die primäre Schädigung besteht wahrscheinlich in einer entzündlichen Reaktion, die zur Proliferation der Gefäßinnenschicht, und infolgedessen zur verminderten Organversorgung führt (Häyry 1996). Erst infolge der pathologischen Veränderungen der Transplantatgefäße kommt es zu Fibrosen, zur Rückbildung funktionsfähiger Zellen und zur Verengung weiterer Gangsysteme wie Gallengängen und Bronchien.

Aufgrund der größeren Dringlichkeit der zuvor auftretenden Probleme ist die Bedeutung der chronischen Abstoßung für die Xenotransplantation noch recht gering. Auch bei der Allotransplantation gibt es bisher noch keine wirksamen Strategien zur Unterdrückung oder Behandlung der chronischen Abstoßungsreaktion.

#### Das „perfekte“ Organspenderschwein

Die Überwindung der Vielzahl von Abstoßungsmechanismen bei der Xenotransplantation zwischen diskordanten Spezies wie Mensch und Schwein ist durch konventionelle Methoden kaum vorstellbar. Nur vielfach transgene Tiere scheinen geeignet, Organe bereitzustellen, die das menschliche Immunsystem nicht als fremd erkennt. Das „perfekte“ Schwein als Organquelle für die Xenotransplantation stellt man sich in folgenden Eigenschaften transgen vor:

- Expression humaner Komplementregulatorproteine,
- Expression der  $\alpha$ 1,2-Fucosyltransferase zur Konkurrenz der  $\alpha$ 1,3-Galaktosyltransferase,
- Expression eines NF- $\kappa$ B-Inhibitors ohne Apoptose-Sensibilisierung,
- Expression protektiver Gene wie A-20, A-1, bcl-2, bcl-x<sub>L</sub>,
- Expression eines verkürzten Rezeptors für den Tumor-Nekrose-Faktor,
- Expression des humanen Thrombomodulins,
- Überexpression der ATPDase (CD39),
- Expression des humanen TFPI (tissue factor pathway inhibitor),
- Expression immunregulatorischer Signale, z.B. Fas-Ligand,
- Expression von Proteinen, die bestimmte physiologische Funktionen vermitteln oder therapeutisch wirksam sind (dazu zählen z.B. auch lokal wirksame Cytokine oder sogar Immunsuppressiva).

Zu den endogenen Genen und Sequenzen des Schweins, die es mithilfe eines Gen-Knockouts auszuschalten gilt, zählen:

- das Gen für die  $\alpha$ 1,3-Galaktosyltransferase und ggf.

- retrovirale Sequenzen (siehe Abschnitt 3.2.3).

Es ist kaum vorstellbar, solche Tiere mithilfe konventioneller Transgenesis zu erzeugen. Aus heutiger Perspektive erscheint es weiterhin unglaublich aufwendig und schwierig, die vielen notwendigen und wünschbaren Veränderungen allein in kultivierten Zellen zu erzeugen. Sobald dies jedoch - und sei es nur in Form einzelner Schritte - gelungen ist, könnte das kerntransferbasierte Klonen helfen, aus einer solchen Zelle ein vollständiges Tier werden zu lassen. Dies ist jedoch nur ein Schritt in einer langen Reihe komplizierter Manipulationen zur Veränderung eines extrem komplexen biologischen Mechanismus.

### 3.2.2 Organfunktion

Aufgrund der immensen Probleme, die mit der Überwindung der Immunreaktion nach der Xenotransplantation verbunden sind, ist es bisher nicht möglich, eine Aussage darüber zu machen, ob Organe in einer fremden Spezies auch ihre Funktion erfüllen werden. Angesichts der Tatsache, daß etwa 10.000 Proteine pro Zelle synthetisiert werden, die wahrscheinlich eine Kompatibilität von fast 100 Prozent in Allotransplantationen und höchstens 70 Prozent in der Transplantation von Schwein auf Mensch aufweisen, kann die Überwindung der Komplexität der immunologischen Abstoßungsreaktion erst der Anfang einer Reihe von Problemen bei der Xenotransplantation sein (Hammer 1994). Eine berechtigte Frage ist daher die nach der zu erwartenden Lebensqualität, die durch die Xenotransplantation ermöglicht wird (Hammer 1993). Nur Tierexperimente können die Frage klären, ob die Aufrechterhaltung des Lebens durch Organe anderer Spezies möglich ist. Bei einem Organ mit einfacherer Funktion wie dem Herzen, vielleicht auch der Niere, werden die Probleme sicherlich weniger gravierend sein als bei der Leber, die als Hauptkontrollorgan des Stoffwechsels fast 2500 verschiedene Enzyme synthetisiert. Die Frage, wie hormonelle und enzymatische Interaktionen in xenogenen Systemen ablaufen, erlangt in diesem Fall eine besondere Bedeutung. Neben der Stoffwechsel- und Wachstumsregulation seien als Beispiele komplexe Systeme wie das der Blutgerinnung oder das Komplementsystem genannt, bei denen sich bereits gezeigt hat, daß molekulare Inkompatibilitäten vorliegen.

Auch die Frage nach der Interaktionsfähigkeit xenogener Zellen mit der extrazellulären Matrix im Empfängergewebe und den Nachbarzellen verdient Beachtung. Eine genetische Veränderung der Spendertiere in dem Ausmaß, daß alle wichtigen Enzyme, Hormone, Adhäsionsmoleküle und andere mehr als humane Transgene vorliegen, ist

schwer vorstellbar, obwohl grundsätzlich die Möglichkeit des Einsatzes der Gentechnik bei physiologischem Versagen von Organen in Erwägung gezogen wird (Platt 1998, Akhter et al. 1997, Kypson et al. 1998). Visionäre der Xenotransplantation stellen sich die transplantierten Organe sogar als Träger für neue physiologische Funktionen oder therapeutisch erwünschte Gene vor. Diese würden nicht nur die bei der Gentherapie eingesetzten Viren ersetzen, sondern darüber hinaus die auf ein Organ begrenzte Bildung des Genproduktes ermöglichen.

### 3.2.3 Infektion mit Xenopathogenen

Die Übertragung von Krankheiten vom Donor auf den Rezipienten ist bei jeder Art von Transplantation ein zu berücksichtigendes Problem. Bei der Xenotransplantation besteht jedoch die besondere Gefahr, daß es zur Verbreitung sogenannter Xenozoonosen kommt. Dies sind definitionsgemäß Erkrankungen, die durch xenogenes Gewebe einschließende Prozesse vom Tier auf den Menschen übertragen werden (Fishman 1994, Michaels & Simmons 1994). Da bei der Transplantation alle natürlichen Barrieren, die das Eindringen von Erregern erschweren, etwa Haut, Mukosa oder Magensäure, durch die direkte Implantation der Fremdzellen oder -gewebe umgangen werden, kann die Übertragung von Erregern besonders leicht erfolgen. Darüber hinaus ermöglicht die Immunsuppression des Rezipienten die ungehinderte Vermehrung der Pathogene. Auch die Tatsache, daß bei der Transplantation ganzer Organe die Zell-Zell-Interaktionen aufrecht erhalten bleiben, kann dazu beitragen, daß eine Ausbreitung der Erreger leichter möglich ist. Zu berücksichtigen sind bei den Xenozoonosen (nach Steele & Auchincloss 1995)

- Organismen, die für Donor und Rezipient pathogen sind, wie Viren, Bakterien, Helminthen oder Pilze,
- Organismen, bei denen es im Laufe der Evolution zu einer Anpassung zwischen Wirt und Pathogen gekommen ist, so daß im natürlichen Wirt keine Erkrankung feststellbar ist (Chapman et al. 1995),
- Anfälligkeiten, die im Menschen durch die Immunsuppression nach der Transplantation entstehen und Erregern eine pathogene Wirkung verleihen, gegen die der Mensch normalerweise immun oder resistent ist,
- die lokale Reaktivierung von Organismen im transplantierten Gewebe (z.B. latente Viren) und
- die Entstehung neuer Pathogene durch retrovirale Rekombination, z.B. mit humanen Viren (Chapman & Fishman 1997).

Im Hinblick auf Infektionsmöglichkeiten stellt die Verwendung von Tierorganen gegenüber der menschlichen Leichenspende insofern einen Vorteil dar, als ein intensives Monitoring vor der Transplantation möglich ist (Fishman 1994). Dadurch wird jedoch nur die Verbreitung bekannter, auch für Tiere pathogener Erreger unwahrscheinlich, nicht aber die Übertragung unbekannter Agentien. Besonders bei den Viren ist davon auszugehen, daß eine Vielzahl unentdeckter Formen in der Tierwelt existiert. Die Unvorhersehbarkeit der Pathogenität von Erregern nach einem Spezieswechsel kann durch verschiedene Beispiele eindrucksvoll belegt werden und gilt für nah verwandte Arten in gleicher Weise wie für weiter entferntere Arten: Das cercopithecine Herpesvirus 1 (B-Virus) ähnelt bei der Infektion des natürlichen Wirtes, dem Makaken, einer menschlichen Herpes-simplex-Infektion. Im Menschen jedoch führt dieses Virus zu einer schweren Encephalitis mit einer Mortalitätsrate von ca. 70 Prozent (Holmes et al. 1995). Bei einer Infektion mit Hantaviren lassen sich beim natürlichen Wirt, dem Nager, keine Veränderungen in Mortalität oder Morbidität feststellen, bei der Übertragung auf den Menschen jedoch kommt es zu Mortalitätsraten von 50 Prozent (Chapman & Khabbaz 1994). Durch die Verwendung von Tieren mit humanen Transgenen wird tierischen Viren möglicherweise die Möglichkeit zur Präadaptation gegeben, d.h. sie können sich bereits im Tier an humane Rezeptoren anpassen. Ein Beispiel wäre die Anpassung porciner Viren, die normalerweise an porcine Komplementregulatorproteine binden, an die menschlichen Analoga, mit denen die Schweine transfiziert wurden (Weiss 1998). Bekannt ist, daß bestimmte Picornaviren an humanes DAF (CD 55) binden (Bergelson et al. 1995, Ward et al. 1994), während CD 46 (MCP) der Rezeptor für das Masernvirus ist (Doerig et al. 1993).

Überdies tritt bei membranumhüllten Viren, die ihre Hülle aus der Wirtszellmembran beziehen (beispielsweise Retroviren, siehe unten), ein weiteres Problem auf: Schweineviren dieser Art tragen wie ihr Wirt den Galaktosyl- $\alpha$ -(1,3)-Galaktose-Rest auf ihrer Hülle, der für die hyperakute Abstoßungsreaktion verantwortlich ist, und sind daher für das menschliche Immunsystem sofort erkennbar. Wenn also in einem Schwein die  $\alpha$ 1,3-Galaktosyltransferase ausgeschaltet wird, verlieren auch seine Viren das fragliche Antigen. Ebenso würde wohl jede andere Strategie, die hyperakute Abstoßung zu unterdrücken, dazu führen, daß membranumhüllte Viren vom menschlichen Immunsystem nicht mehr oder zumindest nicht mehr so schnell beseitigt werden können (Weiss 1998).

Bei der möglichen Gefährdung durch Pathogene aus Xenotransplantaten können zwei Arten von Risiken unterschieden werden: das *individuelle Risiko* und das für die *Allgemeinheit*. Beispielsweise betrifft das onkogene Potential verschiedener Retroviren, Adeno- oder Polyomaviren, oder auch die Gefährdung durch Prione zunächst nur die Pa-

tienten selbst. Die Hoffnung einzelner auf eine Lebensverlängerung kann jedoch überdies zur Gefährdung ihrer Mitmenschen führen, wenn es zur Entwicklung neuer Viren oder zur Ausbreitung von Xenozoonosen kommt. Besonders Herpes- und Retroviren können, begünstigt durch die Immunsuppression im Wirt, an Pathogenität gewinnen, außerdem ist eine Aktivierung latenter Formen zu befürchten (Chapman & Fishman 1997). Eine der entscheidenden Gefahren der Xenotransplantation ist zudem der unter Retroviren verbreitete Mechanismus der Rekombination (Katz & Skalka 1990, McClure et al. 1988), der zur Entstehung neuer Pathogene führen kann. Rekombinierte Viren könnten besser an das Überleben angepaßt sein, eine erhöhte Replikationsrate oder Pathogenität aufweisen (Kollek 1986; Chapman et al. 1995).

Obwohl anzunehmen ist, daß die Übertragung von Pathogenen von Schweinen auf den Menschen weniger wahrscheinlich ist als zwischen näher verwandten Arten, verdienen besonders die endogenen Retroviren des Schweins erhöhte Beachtung (Chapman et al. 1995). Endogene Retroviren wurden im Laufe der Evolution permanent in die Keimbahn-DNA integriert und werden vertikal, d.h. von Eltern auf ihre Nachkommen, weitergegeben (Patience et al. 1997a). Ihre Fähigkeit, sich zu replizieren, geht im Laufe der Zeit durch Mutationen verloren. Oft findet man zahlreiche Kopien der Sequenzen im Genom, einige von ihnen in allen Individuen einer Spezies an derselben Stelle (Allan 1997). Ihre Infektiösität für immunsupprimierte Patienten, ihre Rekombinationsfähigkeit mit latenten Viren oder die Fähigkeit, replikationsdefiziente Viren zu komplementieren, sind näher zu untersuchen. Im natürlichen Wirt sind endogene Retroviren nicht krankheitserregend, ihre Transkription ist selten, kann aber vorkommen. Die Expression endogener Retroviren in Schweinen wurde mit der Entwicklung von Leukämien und Lymphomen in Verbindung gebracht (Frazier 1985; siehe auch Abschnitt 2.4).

Obwohl endogene Retroviren Zellen des natürlichen Wirts oft nicht mehr infizieren können, sind einige von ihnen xenotrop, d.h. Zellen anderer Spezies können infiziert werden. Von endogenen Retroviren des Pavians, der Katze, von Mäusen und auch von endogenen Retroviren einer bestimmten Schweinezelllinie wurde gezeigt, daß es zur Infektion menschlicher Zellen und zur Replikation der Viren kommen kann (Levy 1978, Coffin 1985, Patience et al. 1997b). Auch in den der Transplantation zugänglichen Schweineorganen wie Niere oder Herz sind in relativ großer Anzahl Sequenzen nachweisbar, die den PERV(*porcine endogenous retrovirus*)-Sequenzen ähneln. Nicht untersucht wurde bislang, inwieweit die PERV-Kopien aus normalem Gewebe replikationskompetent sind.

Beim Menschen ist eine Resistenz diesen Viren gegenüber durch das Komplementsystem gewährleistet, welches die Galaktosyl- $\alpha$ -(1,3)-Galaktose erkennt (Rother et al.

1995, Takeuchi et al. 1996). Dies verändert sich jedoch, wenn es in menschlichen Zellen kultiviert wird. Bereits nach einer Passage durch diese Zellen ist es für das Komplementsystem nicht mehr erkennbar, da es sich nun mit einer Hülle aus menschlichen Zellmembranen umgeben hat, in der diese Kohlenhydratreste aufgrund des in menschlichen Zellen fehlenden Enzyms nicht synthetisiert werden. Freigesetzte Retroviren aus Schweinen können, wie schon angesprochen, auch dann nicht mehr durch das menschliche Komplementsystem erkannt werden, wenn die angestrebte Veränderung des Schweinengenoms erfolgt und die Synthese dieses Zuckers verdrängt oder das Komplementsystem inhibiert wird. Obwohl wahrscheinlich die meisten der ca. 50 PERV-Kopien in Schweinezellen replikationsdefekt sind, sollte die Züchtung von Spenderschweinen dennoch selektiv durch Auswahl von Tieren mit weniger retroviralen Sequenzen erfolgen, oder diese mit Hilfe der Knockout-Technik inaktiviert werden (Patience et al. 1997b). Das Screening nach und die Entfernung aller für menschliche Zellen infektiösen Retroviren des Spendertiers ist allerdings eine große Herausforderung. Diskutiert wird deshalb auch die Erzeugung transgener Tiere mit virus-inaktivierenden Determinanten, deren Expression die Transkription viraler Gene verhindern soll oder die Entwicklung von Impfstoffen (Onions 1997).

Anders als bei endogenen Retroviren kann das Risiko einer Krankheitsübertragung durch exogene, sich horizontal verbreitende Erreger, durch die Züchtung der Schweine in sogenannten SPF-Kolonien (spezifisch pathogenfrei) minimiert werden (Gustafsson 1984). In diesen Tieren sind bestimmte Erreger nicht vorhanden. Zwar ist die Mikroflora undefiniert, die Eliminierung bekannter Erreger bedeutet aber auch eine Minimierung des Risikos, fremde Pathogene in der Kolonie zu beherbergen (Allan 1996).

Im Gegensatz zu den Infektionsrisiken, die durch die Xenotransplantation entstehen, ist der Einsatz tierischer Organe grundsätzlich sogar denkbar, um bestimmten Viruserkrankungen wie Hepatitis oder Aids zu begegnen, indem man tierische Organe (Leber bzw. Knochenmark) transplantiert, die von humanpathogenen Viren nicht reinfiziert werden können (Starzl et al. 1993, Ildstad 1996).

### **3.2.4 Fazit und Ausblick**

Bis zu dem oben skizzierten „perfekten Organspenderschwein“ ist also ein weiter Weg zurückzulegen, und auch mit ihm wären Probleme der chronischen Abstoßung, des Infektionsrisikos und der Organfunktion noch nicht gelöst. Die involvierten Firmen sehen in der Kerntransfertechnik eine Möglichkeit, die Vielzahl der Probleme etwas schneller anzugehen. Trotzdem bleiben sie gewaltig. Doch der Markt ist es auch: Nach einer Schätzung von Börsenanalysten zur Zukunft der Sandoz AG (heute Novartis) kann sich

die Zahl durchgeführter Transplantationen bis zum Jahr 2010 verzehnfachen. (Wie ich erst jetzt weiß, wehrt sich Novartis heftig gegen "im Auftrag", das ist wohl ein allgemein verbreitetes Mißverständnis.) Mit einem jährlichen Umsatz von rund fünf Milliarden US-Dollar wird allein durch die Bereitstellung der Organe gerechnet (Laing 1996). Die beteiligten Firmen, besonders der Marktführer Novartis, könnten darüber hinaus große Gewinne durch die aufwendige Immunsuppression nach der Transplantation erzielen – es sei denn, das kerntransferbasierte Klonen ermöglicht die Anfertigung individuell angepaßter Organe oder Gewebe, die keinerlei Immunsuppression mehr erfordern. Dies ist auf absehbare Zeit allerdings kaum zu erreichen.

### **3.3 Zelltherapie, autologe Transplantation und Gentherapie**

#### **3.3.1 Zelltherapie und autologe Transplantation**

Allerdings zeichnen sich andere Wege ab, zu denen das Klonen zumindest technisch einen erheblichen Beitrag leisten könnte. Das optimale Transplantationsgewebe ist einfach zu kennzeichnen: seine Zellen sollten mit denen des Empfängers genetisch identisch sein. Das Immunsystem des Patienten erkennt es dann nicht mehr als fremd, und jedes Problem der Abstoßung, gleichgültig nach welchem Mechanismus, entfiel.<sup>46</sup> Dementsprechend sind eineiige Zwillingsgeschwister untereinander ideale Organspenden. Kaum ein Transplantationspatient hat jedoch das Glück, Teil eines solchen Zwillingspaars zu sein. Und anders als etwa bei Niere oder Knochenmark würde ihm das, wenn er ein neues Herz bräuchte, auch nichts nützen.

Nach Dolly kamen Befürchtungen auf, Menschen könnten sich klonen lassen, um sich gleichsam einen verspäteten Zwilling als perfektes Organlager zu schaffen. Bestärkt wurden diese Befürchtungen durch Meldungen über Experimente in der Grundlagenforschung an der Universität von Bath in England, bei denen Kaulquappen ohne Kopf entstanden waren<sup>47</sup>. Es sei nunmehr denkbar, daß gezielt anenzephal gemachte menschliche Feten für Transplantationszwecke geklont würden. Diese Idee rief besonders aufgrund der Tatsache, daß dadurch menschliches Lebes zum medizinischen Ersatzteil degradiert und Frauen für seine Produktion instrumentalisiert würden, Abscheu und große öffentliche Ablehnung hervor. Von daher ist nicht anzunehmen, daß sie bei Menschen realisiert wird. Auch gehen die Versuche, kompatibles Ersatzgewebe zu Transplantationszwecken herzustellen, in andere Richtungen.

Zur Erzeugung autologen Ersatzgewebes sind mittel- bis langfristig zwei Wege denkbar:

---

<sup>46</sup> Vielleicht abgesehen von Autoimmunreaktionen, die sich gegen körpereigenes Gewebe richten.

<sup>47</sup> Morton & Williams 1997; siehe dazu auch im Internet unter [www.bath.ac.uk/Slack/](http://www.bath.ac.uk/Slack/)

- Der *erste*, wohl schneller erreichbare, würde über die Kerntransfermethode gehen und *die Erzeugung eines frühen Embryos (Morula oder Blastozyste) einschließen*. Aus diesem müßten embryonale Stammzellen gewonnen und in Kultur zur gerichteten Differenzierung in das gewünschte Ersatzgewebe veranlaßt werden. Der betreffende Embryo müßte dazu nicht in eine Gebärmutter implantiert, sondern könnte ebenfalls in Kultur gehalten werden. Nicht zuletzt um dem ethischen Problem einer solchen Instrumentalisierung früher menschlicher Embryonen auszuweichen, wird auch daran geforscht, ob Eizellen von Tieren als Empfänger von Zellkernen anderer Spezies geeignet sind (Pennisi 1998b, Cohen 1998, Schuh 1998).<sup>48</sup> Das Szenario sähe dann so aus, daß der Zellkern einer somatischen Zelle des Patienten zum Beispiel in die Eizelle einer Kuh transferiert wird, wo er dann die Entwicklung bis zur Blastozyste steuern soll, aus der dann schließlich das „körpereigene“ Ersatzgewebe gewonnen wird. Doch dazu gibt es noch eine ganze Reihe ungeklärter wissenschaftlicher Fragen (s.u.), so daß Zweifel an der Realisierbarkeit dieser Vorstellung angebracht sind.
- Der *zweite* Weg liegt noch in ferner Zukunft, und würde auf die *Etablierung eines in vitro-Systems zur Dedifferenzierung und Redifferenzierung von somatischen Zellen* hinauslaufen. Kerntransferexperimente könnten dazu beitragen, daß er gangbar wird. Voraussetzung dafür ist, daß im Detail bekannt sein wird, welche molekularen Faktoren des Eizell-Zytoplasmas dafür verantwortlich sind, daß ein Zellkern in den unspezialisierten Embryonalzustand zurückgesetzt, und zur erneuten Entwicklung und Differenzierung angeregt werden kann. Dann könnte das Zurücksetzen der Spezialisierung somatischer Zellen und ihre gezielte erneute Differenzierung vielleicht auch direkt durch die Zugabe entsprechender Faktoren und ohne Kerntransfer in eine Eizelle und ohne das Erzeugen eines Embryos erreicht werden. Ian Wilmut und Alan Colman sahen dies im Gespräch mit uns als ein nicht mehr unrealistisches Ziel an, das bei der Entwicklung von Strategien zur Herstellung von Ersatzgewebe verstärkt zu verfolgen sei. Die einschlägigen Forschungen stehen allerdings noch ganz am Anfang.

Der Schlüssel liegt bei beiden Wegen in zwei Schritten, und zwar in grundsätzlich denselben, die auch beim kerntransferbasierten Klonen stattfinden:

- Zunächst gilt es, geeignete Zellen des jeweiligen Patienten (beziehungsweise deren Kerne) in den unspezialisierten „Embryonalzustand“ rückzusetzen.

---

<sup>48</sup> Eine ganz andere Anwendung des Transspezies-Kerntransfers könnte das Klonen bedrohter Tierarten sein. So planen chinesische Wissenschaftler, mit Hilfe artfremder Eizellen, etwa solcher aus anderen Bärenarten, den Großen Panda zu klonen, um ihn vor dem Aussterben zu bewahren. Sie hoffen, bis zum Jahr 2003 damit Erfolg zu haben (Saegusa 1998b). Die Kerntransfermethode scheint in China übrigens recht weit fortgeschritten zu sein; bei unseren Recherchen stießen wir immer wieder auf chinesische Publikationen zum Thema, die zum großen Teil in dortigen Zeitschriften erschienen und gar nicht übersetzt sind. Daher dürfte westlichen Fachleuten kaum bekannt sein, woran dort im einzelnen geforscht wird.

- Danach müssen sie durch spezifische Faktoren dazu gebracht werden, sich in die Richtung zu entwickeln, die zur Entstehung des benötigten Ersatzgewebes führt.

Beim kerntransferbasierten Klonen geschehen beide Schritte, wenn alles funktioniert, gleichsam von selbst: Die entkernte Eizelle übernimmt die Reprogrammierung des eingebrachten Spenderkerns, und die Differenzierung in die einzelnen Gewebe erfolgt dann im Zuge einer mehr oder weniger normalen Embryonalentwicklung (siehe Abschnitt 2.2). Will man jedoch gezielt Ersatzgewebe gewinnen und dabei die *Entwicklung* eines Embryos oder Fetus vermeiden, muß der zweite Schritt künstlich gesteuert werden. Und wenn die *Erzeugung* eines Embryos gänzlich umgangen werden soll, muß auch der erste Schritt *in vitro* erfolgen, d.h., ohne daß die Spenderzelle zuvor in eine Eizelle transplantiert wird.

Diese Steuerung des ersten Schrittes ist derzeit nicht machbar. Wenn diese Strategie weiter verfolgt werden soll, wird man noch geraume Zeit auf den Kerntransfer in entkernte Eizellen angewiesen bleiben und mithin zumindest frühe Embryonen erzeugen müssen. Der zweite Schritt dagegen läßt sich in Zellkulturen untersuchen und sogar jetzt schon begrenzt beeinflussen.

Erwähnt wurden bereits die nahezu totipotenten embryonalen Stammzelllinien (ES-Zellen) der Maus. Es herrscht immer wieder Verwirrung darüber, wie der Begriff „embryonale Stammzellen“ zu definieren ist. Die meisten Fachleute möchten darunter nur solche Stammzellen verstanden wissen, die nahezu totipotent sind und auch nachweislich an der Keimbahn partizipieren können. Solche gibt es bisher nur von der Maus. Alle anderen Stammzellen mit zumindest pluripotenten Eigenschaften seien hier daher als „ES-ähnlich“ bezeichnet.

Embryonale Stammzellen der Maus sind zwar nicht in der Lage, eigenständig Embryonen zu bilden. In eine Blastozyste injiziert sind sie jedoch in der Lage, zu Bildung aller Gewebe des späteren Fetus beizutragen, also sich in verschiedene Richtungen zu differenzieren. Da sie wie erwähnt auch primordiale Keimzellen bilden, können sie zur Gewinnung von Knockout-Mäusen benutzt werden (Capecchi 1989, 1994). Solche und ähnliche Zellen durchlaufen auch in Zellkultur Differenzierungsvorgänge, die in gewissen Grenzen steuerbar sind.

Zellkulturlinien mit ES-ähnlichen Eigenschaften lassen sich auch von Primaten gewinnen (Thomson et al. 1995, Thomson & Marshall 1998), und im letzten Jahr berichtete der amerikanische Embryologe John Gearhart auf dem 13. Internationalen Kongreß für Entwicklungsbiologie in Snowbird, Utah, über die erstmalige Isolierung einer solchen Stammzelllinie aus menschlichem Embryonalgewebe (Dickman 1997, Travis 1997, Lewis 1997). Wenn sich die gesteuerte Differenzierung solcher humaner ES- oder ES-ähnlicher Zellen weiter perfektionieren ließe, könnten sie in Kultur durch Zugabe ge-

eigneter Steuerungsfaktoren u.U. verschiedenartig spezialisierte Zellen oder Gewebe nachbilden und in Patienten Gewebe ersetzen, die durch Verletzungen zerstört worden sind oder ihre Funktion anderweitig verloren haben. Beispiele wären etwa Hautersatz nach Verbrennungen, neues Inselgewebe im Pankreas zur Produktion von Insulin bei Diabetes-Patienten oder ein Ausgleich für die absterbenden dopaminproduzierender Nervenzellen im Mittelhirn von Parkinson-Patienten. Ganze Organe auf diesem Weg nachzubilden ist freilich derzeit kaum vorstellbar<sup>49</sup>, doch auf lange Sicht ist selbst das nicht auszuschließen.

Etablierte humane ES-Zelllinien könnten also vielleicht künftig nach entsprechender Differenzierung als Ersatzgewebe für Patienten herangezogen werden, doch damit wird das Problem der Abstoßung nicht umgangen. Zelllinien, die aus abgetriebenen Embryonen gewonnen würden, hätten dessen Genotyp und bestimmte antigene Eigenschaften, die mit einem potentiellen Empfänger nicht unbedingt kompatibel sind. Vermutlich wären die Abstoßungsprobleme weniger gravierend nach einer Xenotransplantation, doch würden immer noch dieselben Probleme auftreten wie nach einer Allotransplantation zwischen zwei verschiedenen Menschen.

Die optimale Lösung wäre die Schaffung genetisch identischen Ersatzgewebes. Ein wichtiger Schritt dahin ist die Gewinnung ES-ähnlicher Zellen mit dem Genotyp des zukünftigen Empfängers. Neueste Forschungsergebnisse zeigen, daß dies nun mittels des kerntransferbasierten Klonens erreichbar erscheint. Jose Cibelli, Stice, Robl und Mitarbeitern gelang es kürzlich, durch Kerntransfer aus fetalen Rinderfibroblasten ES-ähnliche Zellen zu erzeugen, die nach Injektion in frühe Rinderembryonen an der Bildung von Geweben aus allen drei Keimblättern (Ektoderm, Mesoderm und Entoderm) mitwirkten (Cibelli et al. 1998, Kommentar: First & Thomson 1998). Demnach wäre der oben skizzierte erste Weg der Gewinnung nahezu totipotenter embryonaler Stammzellen auch in anderen Säugern als der Maus nicht mehr unrealistisch.

Die Realisierung einer solchen Strategie beim Menschen wirft allerdings nicht nur wissenschaftlich-technische Probleme auf. Um eine ES-ähnliche, autologe Stammzellen herzustellen, müßte zunächst mithilfe der Kerntransfer-Technik ein Embryo erzeugt werden. Sofern nicht selber weiblichen Geschlechts und im reproduktiven Alter, bräuchte die Patientin oder der Patient dafür zunächst eine gespendete Eizelle. Im nächsten Schritt müßte ein somatischer Zellkern der Patientin oder des Patienten in eine zuvor entkernte eigene oder gespendete Eizelle transferiert werden. Dann entstünde im günstigen Fall bereits in Kultur, ohne Beteiligung einer Leihmutter ein Präimplantations-Embryo, aus dem sich Stammzellen gewinnen ließen, die sich schließlich durch

---

<sup>49</sup> Kommentar Alex Kind: „To grow a whole liver in a petri dish? How shall that be done?!“

gezielte Behandlung mit Wachstums- und Differenzierungsfaktoren in das erstrebte Transplantationsgewebe entwickeln würden.

Aufgrund des Embryonenschutzgesetzes ist dieser Weg in Deutschland allerdings nicht gangbar, da bei diesem Verfahren Embryonen zu einem anderem Zweck als zur Herstellung einer Schwangerschaft erzeugt (§1, Absatz 1, Nr. 2) und verwendet (§ 2, Absatz 1 ESchG) werden, ganz abgesehen von der ethischen Problematik der Herstellung und des Verbrauchs von Embryonen, die nicht Thema dieser Untersuchung ist<sup>50</sup>.

Es wurde vorgeschlagen, die in verschiedenen Ländern diskutierte ethische und rechtliche Problematik der Erzeugung und Verwendung von Embryonen zu Therapie Zwecken durch die Verwendung von tierischen Eizellen als Empfänger menschlicher somatischer Zellkerne zu umgehen. Die daraus entstehenden menschlichen Embryonen seien nicht entwicklungsfähig, und deshalb trete die ethische und rechtliche Problematik, die den Transfer in menschliche Eizellen verbiete, bei diesem Verfahren nicht auf.

Der deutschen Rechtssituation zufolge macht sich nach § 7 (Chimären- und Hybridbildung), Absatz 1, Nr. 3 des Embryonenschutzgesetzes nur strafbar wer es unternimmt, durch „Befruchtung einer tierischen Eizelle mit dem Samen eines Menschen einen differenzierungsfähigen Embryo zu erzeugen“. Der Transfer somatischer Zellkerne ist dadurch nicht abgedeckt. Allerdings vertritt die Bundesregierung in einem „Bericht zur Frage des gesetzgeberischen Handlungsbedarfs beim Embryonenschutzgesetz aufgrund der beim Klonen angewandten Techniken und der sich abzeichnenden weiteren Entwicklung“ die Auffassung, daß es „bei dem Verbot der Herstellung von Hybridwesen nach § 7 Abs. 1 Nr. 3 ESchG (...) letztlich um den ethisch begründeten Respekt vor der Schöpfungsordnung (geht), die der Mensch durch die Konjunktion humaner und tierischer Gameten nicht sprengen darf.“<sup>51</sup> Von daher wird empfohlen sicherzustellen, daß das Verfahren der Transplantation menschlicher somatischer Zellkerne in tierische Eizellen von den Vorschriften des § 7 Absatz 1, Nr. 3 miterfaßt wird (ebd.).

Die wissenschaftlichen Erfahrungen mit solchen Hybridembryonen sind bislang noch gering. Experimente dieser Art sind zwar gemacht worden, wenngleich auch nicht mit humanen Zellkernen (Pennisi 1998a, Cohen 1998, Mei et al. 1993; siehe auch Abschnitt 2.2.4). Bislang ließen sich maximal Blastozysten erzeugen und noch keine lebensfähigen Tiere. Es ist daher unklar, ob ein auf diese Weise erzeugtes Transplantationsgewebe

---

<sup>50</sup> Zur Diskussion des Zusammenhangs zwischen Embryonenschutzgesetz und Embryonenerzeugung bzw. Verbrauch vgl. u.a. Kollek 1998b, sowie zur Problematik Klonen der Erzeugung von Embryonen durch Klonen Kollek 1998a.

<sup>51</sup> Die Autoren des Berichts beziehen sich dabei auf eine Auslegung von Laufs (Fortpflanzungsmedizin und Arztrecht, 1992, S. 75). Deutscher Bundestag, 13. Wahlperiode, Drucksache 13/11263 (26.06.98), Absatz 8.1, S. 21.

im menschlichen Körper seine Funktion erfüllen kann. Hier stellen sich im wesentlichen zwei Fragen:

- Wie gut können die Reprogrammierungsfaktoren der Eizelle ihre Funktion an einem artfremden Zellkern erfüllen? Etwas konkreter und zweckorientierter ausgedrückt:
  - \* Kann das Zytoplasma einer tierischen Eizelle einen menschlichen somatischen Zellkern so reprogrammieren, daß ein früher Hybridembryo entsteht, aus dem sich ES-ähnliche Zellen gewinnen lassen?
  - \* Lassen sich diese dann tatsächlich in das Gewebe differenzieren, das der Patient auch benötigt?
  - \* Arbeitet es nach der Implantation gemäß seiner gewünschten Funktion?

Die letzteren beiden Aspekte sind auch für rein humane ES-ähnliche Zellen noch gar nicht geklärt. Bei artfremden Empfängeroozyten für den Kerntransfer könnten noch zusätzliche Probleme auftreten.

Ein naheliegendes wird von der zweiten wesentlichen Frage umschrieben:

- Wie gut kann der eingebrachte Zellkern mit dem mitochondrialen Genom (Chondrom) des Empfängerzytoplasmas zusammenarbeiten? Das Genom einer Zelle beschränkt sich nicht nur auf den Zellkern, es gibt weitere Gene in den Mitochondrien, membranumhüllten Organellen im Zytoplasma, die der Zelle verwertbare Energie bereitstellen. Das Genom der Mitochondrien ist zwar klein, und die meisten ihrer Funktionen werden genetisch vom Zellkern gelenkt, gleichwohl steuert auch die mitochondrieneigene DNA wesentliche Funktionen (siehe unten). Wenn man davon ausgeht, daß die Kooperation zwischen Zellkern und mitochondrialem Genom sich je nach Spezies anders entwickelt hat, dürften beim Transspezies-Klonen Probleme auftreten, denn die Mitochondrien eines Hybridembryos steuert die Empfängeroozyte bei. Der transferierte Zellkern muß also mit einem Chondrom zusammenarbeiten, an das er nicht angepaßt ist; und je größer die phylogenetische Entfernung zwischen eingebrachtem Zellkern und empfangendem Eizytoplasma, desto stärker könnten Kooperationsprobleme zwischen beiden Genomen ins Gewicht fallen.

Beide der zu Beginn dieses Abschnitts beschriebenen Wege der Herstellung von Ersatzgewebe weisen also erhebliche Probleme wissenschaftliche und technische Probleme auf, wenn auch die Realisierbarkeit des ersten beim heutigen Stand der Entwicklung näher zu liegen scheint als die des zweiten. Angesichts der ethischen Probleme, die mit der Erzeugung von Embryonen und ihrem Verbrauch für medizinische Zwecke verbunden sind, halten wir dennoch die Verfolgung der Entwicklung eines *in vitro*-Systems für erstrebenswerter. Dies hätte desweiteren den Vorteil, daß die entscheidenden Grundfragen der Umprogrammierung somatischer Zellen in der der Maus untersucht werden könnten, da in diesem System bereits viele der Faktoren, die die Zelldifferenzierung beeinflussen, bekannt sind, und man auf diesem Wissen aufbauen könnte.

### 3.3.2 Gentherapie

Auch im Hinblick auf den in therapeutischer Absicht durchgeführten Gentransfer, gemeinhin Gentherapie genannt, erhofft man sich Verbesserungsmöglichkeiten durch die Kerntransfertechnik. Strategien zur Gentherapie scheitern derzeit in der Regel daran, daß kaum geeignete Einschleusungsmittel (Vektoren) zur Verfügung stehen, um ein therapeutisch wirksames Gen an den gewünschten Zielort im Körper zu bringen. Abgeschwächte Viren und andere Überbringungsvehikel sind in Erprobung, doch alle haben sie ihre Nachteile (Friedmann 1997, Felgner 1997). Alan Trounson (1997), Reproduktionsmediziner an der Monash-Universität in Melbourne, erwägt, von Gentherapie-Patienten mit Hilfe des Kerntransfers autologe ES-ähnliche Zellen zu gewinnen, diese in Kultur gentherapeutisch zu behandeln und sie dann in den Körper des Patienten „rückzuführen“. Das hätte dreierlei Vorteile:

- Erstens ließe sich noch in Kultur überprüfen, ob das therapeutische Gen effektiv eingebaut worden ist.
- Zweitens könnten solche Zellen vor der Implantation einer gesteuerten Differenzierung unterworfen werden, was ihre Integration ins Zielgewebe erleichtern würde. Dazu wäre jedoch - wie oben ausgeführt - noch viel Grundlagenforschung notwendig.
- Drittens entfielen wahrscheinlich das Problem der Immunabwehr, an dem virusbasierte Vektorsysteme häufig scheitern.

Lee Silver von der Princeton-Universität, dem interessierten Publikum bekannt geworden durch seine provokanten Visionen zum Thema Klonen (Silver 1998), hält das kerntransferbasierte Klonen zudem für die beste Strategie, um Keimbahntherapien durchzuführen: „For the first time, germ-line therapy becomes realistic“<sup>52</sup>. Seine Vorstellung dazu ist, aus einem genetisch defekten frühen Embryo Zellen zu gewinnen, diese in Kultur genetisch zu korrigieren und daraus mittels Kerntransfer einen neuen Embryo zu klonen, der gleichsam der gesündere Zwilling des ursprünglichen Embryos wäre – und die künstliche Genkorrektur weitervererben würde.

Relativ einfach durch Kerntransfer korrigierbar wären mitochondriale Gendefekte. Dazu bedürfte es prinzipiell keiner Anzucht von ES-Zellen in Kultur und keinerlei gentechnischer Eingriffe – der Kerntransfer an sich wäre bereits die Therapie. Mitochondrien werden ausschließlich maternal vererbt, das heißt, alle Mitochondrien eines Menschen stammen von denen aus dem Zytoplasma der mütterlichen Eizelle ab. Das einzige Mitochondrium der Spermienzelle degeneriert nach der Befruchtung. Das bedeutet aber

---

<sup>52</sup> Zitat nach Mirsky & Rennie 1997.

auch, daß eine Frau mit einer mitochondrial bedingten Erbkrankheit<sup>53</sup> diese an alle ihre Kinder weitergibt – sie kann keine gesunden Kinder bekommen. Die Therapie mitochondrialer Defekte bestünde darin, einem betroffenen frühen Embryo einen Zellkern zu entnehmen und diesen in die entkernte Eizelle einer gesunden Spenderin zu transfieren. Der daraus entstehende Embryo besäße nunmehr das Kerngenom, das die Eltern dem ursprünglichen Embryo mitgaben, und das intakte mitochondriale Genom aus dem Eizytoplasma der Spenderin.

Ein solches Verfahren entspräche nicht der Gentherapie im „klassischen“ Sinne: Es werden keine neuen therapiewirksamen Gene eingebracht. Vielmehr wird ein grundsätzlich gesunder, unveränderter Zellkern aus einem defekten Zytoplasma in ein prinzipiell unverändertes intaktes überführt. Man könnte ein solches Vorgehen auch als Zytoplasmathherapie bezeichnen. Gleichwohl wäre es strenggenommen eine Keimbahntherapie, wenn aus dem so erzeugten Embryo eine Frau entsteht: Sie würde das (genetisch unveränderte) mitochondriale Genom aus dem Zytoplasma der Oozytenspenderin an ihre Kinder weitergeben. Entsteht ein Mann, ist die Sachlage anders – er kann seine Mitochondrien nicht an seine Nachkommenschaft weitervererben.

Eine tiefere Erörterung der Problematiken, die sich aus einer Kombination des kerntransferbasierten Klonens mit der Gentherapie ergeben könnten, würde den Rahmen dieses Gutachtens sprengen. Mit den erwähnten Beispielen sollte jedoch zumindest angedeutet werden, welche Möglichkeiten einer Verknüpfung der beiden Techniken bestehen, und welche Vorstellungen diskutiert werden. Sie beinhalten unterschiedliche technische Schwierigkeitsgrade, und unterschiedliche ethische Probleme. Eines davon ist, ob eine Therapie akzeptabel ist, bei der ein früher Embryo geopfert wird, um aus ihm einen „gesünderen Zwilling“ zu klonen. Ob die Vorstellungen zu verwirklichen sind, sei dahingestellt. Angesichts der raschen Fortschritte in den Biowissenschaften erscheint dies aber als durchaus wahrscheinlich.

### **3.4 Präklinische Forschung**

Tieruntersuchungen und Tierversuche haben in der Medizin eine lange Geschichte. Sie reichen von der vergleichenden Anatomie des Aristoteles über die Erprobung von Arzneimitteln bis zur Herstellung transgener Mäuse zur Untersuchung der Entstehungsmechanismen von Krebs. Spätestens seit der Mitte des 19. Jahrhunderts werden sie in der medizinischen Grundlagenforschung als unverzichtbar angesehen. Zum einen geht man

---

<sup>53</sup> Beispiele dafür sind etwa das Kearns-Sayre-Syndrom (mit Augenmuskellähmungen, Pigmentdegeneration der Netzhaut, Muskelschwäche, Kardiomyopathie) und die Lebersche hereditäre Opticus-Neuropathie (Absterben des Sehnervs bis hin zur Blindheit im zweiten Lebensjahrzehnt).

davon aus, daß die biochemischen und physiologischen Grundprozesse bei Säugetieren, zu denen auch die Menschen gehören, im Prinzip ähnlich sind, und daß das Studium dieser Prozesse im Tier wertvolle Hinweise zu ihrem Verständnis auch beim Menschen liefern kann. Zum anderen lassen sich aus wissenschaftlich-technischen und ethischen Gründen nicht alle Aspekte menschlicher Krankheiten ohne weiteres am Menschen erforschen. Auch gegen eine direkte Prüfung neuer Substanzen auf ihre Toxizität und pharmakologische Wirkung am Menschen sind ethische Vorbehalte geltend zu machen. Solche Untersuchungen und Versuche werden deshalb an Tieren vorgenommen. Obwohl viele menschliche Krankheiten bei anderen Säugetieren keine Entsprechungen finden, ist es im Laufe der Zeit auch gelungen, Tierstämme zu isolieren oder zu züchten, die vergleichbare physiologische oder genetische Störungen bzw. Krankheiten aufweisen.

Ebenso alt wie die Experimente mit Tieren zur Untersuchung von Pathomechanismen oder zur Erprobung neuer Medikamente ist die Kritik an solchen Versuchen. Sie basiert zum einen auf ethischen Vorbehalten die wissenschaftliche Instrumentalisierung von Tieren. Sie haben sich heute in vielen Ländern in Tierschutzgesetzen niederschlagen. Zum anderen wurden jedoch immer wieder Zweifel daran artikuliert, ob sich Krankheiten des Menschen im Tier simulieren lassen, und ob bzw. wie weitgehend sich an Tieren erhobene Befunde (z.B. solche aus Versuchen mit Arzneimitteln) auf Menschen übertragen lassen. Der an zweiter Stelle genannte Vorbehalt verweist einerseits auf die großen biologischen Unterschiede, die trotz vieler Gemeinsamkeiten bei Säugetieren zwischen Menschen und beispielsweise Ratten oder Mäusen bestehen, die in der medizinischen Forschung am häufigsten eingesetzt werden. Zum anderen werden medizintheoretische Vorbehalte geltend gemacht die darauf verweisen, daß Krankheiten des Menschen nicht nur eine körperliche, sondern auch seelische und soziale Komponenten haben, die sich bei Tieren nicht simulieren lassen<sup>54</sup>.

Trotz dieser andauernden ethischen und medizintheoretischen Kontroversen sind Untersuchungen an Tieren aus der modernen biomedizinischen Forschung aus praktischen und konzeptionellen Gründen (vgl. auch Abschnitt 5.2) kaum wegzudenken. Die Möglichkeit des Klonens hat den Überlegungen, wie Tiere in der medizinischen Forschung erkenntnisfördernd eingesetzt werden können, neue Impulse verliehen. Der Einsatz geklonter Tiere und des Kerntransferverfahrens wird im Hinblick auf zwei Anwendungsfelder diskutiert:

- zur Entwicklung von Tiermodellen für menschliche Krankheiten;

---

<sup>54</sup> Vgl. hierzu die neueren Diskussionen zur Theorie der Medizin, u.a. Üexküll, Wesiak (1988).

- zum Wirkungsvergleich von Arzneimitteln und zur Untersuchung toxikologischer, ernährungsbiologischer und anderer Fragestellungen.

Im ersten Fall steht die Erleichterung der Transgenesis durch das Kerntransferverfahren im Vordergrund, im zweiten die Möglichkeit, durch das Klonieren eine größere Zahl genetisch identischer Tiere zur Verfügung zu haben.

### 3.4.1 Tiermodelle für menschliche Krankheiten

Tiere, die für menschliche Krankheiten typische Symptome entwickeln oder die entsprechende pathologische Störungen zeigen, werden in der biomedizinischen Forschung auch als „Tiermodelle“ bezeichnet. Von der Untersuchung so konstruierter Krankheitsmodelle erhofft man sich Erkenntnisse über die Ursachen und Entstehungsmechanismen einer Krankheit, ihren Verlauf, die Ausprägung der jeweiligen Symptome und über mögliche Behandlungsformen. Früher wurden entsprechende Tiere hauptsächlich durch Zufall gefunden. Sie basierten auf spontanen oder induzierten Mutationen, die in den Tieren zu ähnlichen Symptomen führen, wie sie bei entsprechenden menschlichen Erbkrankheiten auftreten. Die Möglichkeiten, menschliche Krankheiten am Tier studieren zu können, waren folglich auf die Analyse solcher Leiden beschränkt (Petters 1994, Bedell et al. 1997a).

Heute lassen sich mit Hilfe genetisch manipulierter embryonaler Stammzellen transgene Mäuse erzeugen, in denen gezielt bestimmte Gene ausgeschaltet („Gen-Knockout“) oder durch eine mutierte Version („Gen-Targeting“) ersetzt sind (Capecchi 1989, 1994, Melton 1990). Dadurch wird es möglich, die Funktion einzelner Gene und ihre Beteiligung an der Entstehung von Krankheiten zu untersuchen. Erkenntnisse erhofft man sich dabei nicht nur in Bezug auf die „klassischen“ monogenen Erbkrankheiten, sondern auch in Hinblick auf andere Leiden, bei deren Entstehung oder Ausprägung genetische Einflüsse vermutet werden (Bedell et al. 1997b). So wurden transgene Mäuse eingesetzt, um die Beteiligung von Onkogenen an der Krebsentstehung zu untersuchen (Melton 1990). Sie trugen wesentlich zur Entwicklung heutiger Konzepte zum Krebsgeschehen bei, wonach Krebs zum Beispiel nicht nur eine Folge übermäßiger Zellteilung ist, sondern auch durch eine eingeschränkte Fähigkeit der Krebszellen, ihren physiologisch notwendigen programmierten Zelltod (die Apoptose) herbeizuführen, mitbedingt sein kann (Kappel et al. 1994).

Inzwischen wird versucht, Tiermodelle zur Untersuchung einer Vielzahl menschlicher Pathologien heranzuziehen (Bedell et al. 1997b), darunter neurodegenerative Erkrankungen wie die Alzheimer-Krankheit (Theuring et al. 1997), Gefäßkrankheiten wie

Atherosklerose (Rubin & Smith 1994, Breslow 1996), Brustkrebs (Wolman et al. 1997) und selbst Substanzmißbrauch und Suchtverhalten (Crabbe et al. 1994) oder psychosomatische Erkrankungen (Crnic 1996).

In der Regel basieren diese Modelle auf der Maus, da bislang nur bei ihr mittels der ES-Zell-Technik Gene gezielt ausgeschaltet oder ersetzt werden konnten.<sup>55</sup> Wie schon beschrieben, eröffnet das Kerntransferverfahren nunmehr die Möglichkeit, Gen-Targeting und Gen-Knockout auch bei anderen Säugern durchzuführen, ohne Zuhilfenahme von Stammzellen und somit rascher als bei der ES-Zell-Technik.<sup>56</sup> Damit erweitert sich das Instrumentarium zur Erzeugung transgener Tiere, und die gezielte Erzeugung von Krankheitsmodellen in Großtieren, die heute äußerst selten und schwierig zu erzeugen sind, wird denkbar.

Wie Eingangs bereits erwähnt, hat die Simulation menschlicher Krankheiten in Tieren ihre Grenzen. Sie bestehen darin, daß sich zumeist nur Teilaspekte nachahmen lassen und nicht das ganze Krankheitsbild. Zudem sind die gewonnenen Erkenntnisse aufgrund der jeweiligen physiologischen Besonderheiten des Modelltieres nur bedingt auf den Menschen übertragbar. Die Maus eignet sich zwar zur Gewinnung von grundlegenden Erkenntnissen über viele Krankheiten, doch die Simulation des ganzen Spektrums von Symptomen, wie sie bei Menschen auftreten, ist nicht immer oder nur unter Schwierigkeiten möglich. Um Therapien an Tiermodellen zu erproben, wäre jedoch eine Simulation möglichst aller Symptome wünschenswert, zumindest derjenigen, die beim Menschen das Krankheitsbild wesentlich bestimmen.

So gibt es zwar Mausmodelle für neurodegenerative Krankheiten wie die Alzheimer-Krankheit oder die amyotrophe Lateralsklerose (ALS)<sup>57</sup>, aber in keinem ließ sich ein derart massives Neuronensterben beobachten, wie man es vom Menschen kennt. Ein Grund dafür könnte sein, daß die Lebensspanne der Maus schlicht zu kurz ist, um Schäden zu entwickeln, die sich beim Menschen erst über Jahrzehnte anhäufen (Kappel et al.

---

<sup>55</sup> Es sei vermerkt, daß viele Knockout-Mäuse, in denen vermeintlich lebenswichtige Gene ausgeschaltet wurden, quicklebendig sind und keinerlei Symptome zeigen. In Abschnitt 2.2.2 wurden diesbezüglich die Mäuse ohne Telomerase erwähnt. Offenbar existieren für viele biologische Funktionen redundante Systeme, so daß beim Ausfall eines Systems ein anderes dessen Aufgabe übernehmen kann. Das könnte unter Umständen den Nutzen von Tiermodellen menschlicher Krankheiten einschränken, dann nämlich, wenn das gewählte Modelltier über einen Ersatzmechanismus verfügt, den der Mensch nicht besitzt: Das Tier würde in diesem Fall im Gegensatz zum Menschen bei Ausfall des fraglichen Gens nicht krank werden. Siehe auch die Diskussion zur Zystischen Fibrose im weiteren Text.

<sup>56</sup> Bei der ES-Zell-Technik zum Gen-Targeting entstehen zunächst Chimären, also genetische Mosaik, deren Zellen teils von den manipulierten ES-Zellen abstammen, die in die Empfängerblastozyste injiziert werden, und teils von der Empfängerblastozyste selbst. Um ein genetisch einheitliches Tier zu erhalten, muß man kreuzen und eine weitere Generation abwarten, was bei Großtieren mit einem erheblichen Zeitverzug einherginge, siehe Einleitung zu Abschnitt 3.

<sup>57</sup> Auch als *Lou Gehrig's disease* bezeichnet, nach einem amerikanischen Baseball-Star, der daran litt. Der bekannte britische Astrophysiker und Kosmologe Steven Hawking ist ebenfalls von dieser Krankheit betroffen.

1994, Theuring et al. 1997). Gleiches könnte für die Atherosklerose (Arteriosklerose) gelten, eine Gefäßkrankheit, die zu Herzinfarkt und Schlaganfall führen kann und als Haupttodesursache in westlichen Ländern angesehen wird (Rubin & Smith 1994). Mäuse sind natürlicherweise sehr resistent gegenüber dieser Krankheit (Breslow 1996), und man muß allerlei Kunstgriffe anwenden, um atherosklerotische Mäuse zu erzeugen. Hier wäre etwa das Schwein wahrscheinlich das bessere Modell, da Schweine spontan atherosklerotische Läsionen in ihren Blutgefäßen entwickeln können. Darüber hinaus ähneln sie dem Menschen in der Anatomie ihres Herzens und es läßt sich bei ihnen zum Beispiel der Einfluß der Ernährung auf die Entwicklung der Atherosklerose wohl besser untersuchen (Petters 1994).

Auch anatomische Unterschiede zwischen Mensch und Modelltier sind bei der Analyse einzelner Symptome einer Krankheit von Belang. So ist etwa die Niere des Menschen im Vergleich zu anderen Säugern von recht ungewöhnlichem Bau, der sich zwar auch beim Schwein findet, nicht aber bei der Maus (Petters 1994). Ebenso gibt es Unterschiede in der Lungenanatomie zwischen Maus und Mensch, die eine Simulation der Zystischen Fibrose (Mukoviszidose)<sup>58</sup> in der Maus bislang schwierig machte. Die ersten Mukoviszidose-Mäuse zeigten nur die Darmsymptome und starben, ohne das oder bevor die beim Menschen so typischen Lungenkomplikationen auftraten. Inzwischen gibt es zwar auch Mäuse, die Lungensymptome entwickeln (Bedell et al. 1997b). Ihre Interpretation ist jedoch schwierig, da die Verteilung und Häufigkeit submuköser Drüsen in den Atemwegen der Maus anders ist als beim Menschen: Die Maus besitzt nur wenige davon, zudem sind sie auf die Trachea beschränkt, der Mensch hingegen hat sehr viele dieser Drüsen, und sie verteilen sich auch über die Bronchien (Harris 1997). Ferner zeigen Mäuse keine Pankreassymptome, da sie das für die Krankheit verantwortliche Gen (es codiert einen Chloridionenkanal mit der Kurzbezeichnung CFTR) dort in viel geringerem Maße exprimieren als der Mensch und zudem einen weiteren Chloridkanal im Pankreas besitzen, der offenbar den Funktionsverlust von CFTR kompensieren kann (Harris 1997). Zur Modellierung der Zystischen Fibrose halten viele Fachleute daher das Schaf für geeigneter (Ian Wilmut und Alan Colman, persönliche Mitteilung), weil es in Lungenanatomie, gewebespezifischer Expression von CFTR und nicht zuletzt auch in der Zusammensetzung des CFTR-Proteins dem Menschen mehr ähnelt als die Maus (Harris 1997).

---

<sup>58</sup> Eine monogene, autosomal rezessive Erbkrankheit mit einer Dysfunktion exokriner Drüsen (vermehrte Produktion und erhöhte Viskosität des Drüsensekrets) unter Beeinträchtigung der Funktion von Lunge, Verdauungstrakt, Pankreas und anderer Organe, Häufigkeit in Europa etwa 1:2000 (Pschyrembel 1994). Betroffene Patienten benötigen intensive lebenslange Behandlung, ihre Lebensqualität ist stark eingeschränkt, und ihre durchschnittliche Lebenserwartung beträgt 30 bis 40 Jahre, viele sterben früher (Harris 1997).

Überdies wies Ian Wilmut im Gespräch mit uns darauf hin, daß man bei langlebigen Großtieren die Entwicklung einer Krankheit sowie den Erfolg einer zu erprobenden Behandlung besser analysieren könne als bei der Maus. Mäuse müsse man in der Regel töten, um sie zu untersuchen, bei Großtieren ließen sich dagegen einfacher Gewebeproben entnehmen oder Bronchoskopien und andere Untersuchungen durchführen, was eine Langzeitbeobachtung am selben Tier ermögliche.

Das kerntransferbasierte Klonen schafft somit zumindest prinzipiell und erstmalig die Möglichkeit, gezielt Modelle für menschliche Krankheiten in Großtieren zu erzeugen. Dies relativiert nicht die Stellung der Maus als Modellorganismus für die Forschung. In manchen Fällen scheinen jedoch - wie oben geschildert - andere Tiere besser geeignet, um menschliche Krankheiten zu untersuchen. Gleichwohl gibt es dabei einiges zu bedenken:

- Bei Großtieren muß - wie bei der Maus - jeweils geprüft werden, inwieweit die gewonnenen Erkenntnisse auf Menschen übertragbar sind.
- Über die Genetik von Großtieren ist wenig bekannt. Gen-Targeting und Gen-Knockout in Schafen, Rindern oder Schweinen wäre daher erheblich schwieriger als in der Maus (Solter 1996).
- Großtiere haben lange Generationszeiten, in der Regel kleine Wurfgrößen und sind in der Haltung ungleich viel aufwendiger als Mäuse. Ann Harris (1997) von der Universität Oxford in England schätzt die Kosten für die Erzeugung eines Schafes als etwa zwanzigmal so hoch ein wie die zur Erzeugung einer Maus, und die Haltungskosten bei Schafen beziffert sie auf das Sechsfache dessen, was die Haltung von Mäusen kostet.
- Viele Laborleiter scheuen davor zurück, Forschung an Großtieren zu betreiben, denn Ergebnisse, die der Veröffentlichung würdig sind, lassen sich an ihnen nur sehr viel langsamer erzielen als an Mäusen<sup>59</sup>. Nach dem derzeitigen System der Forschungsförderung kann dies den Verlust von Drittmitteln bedeuten („*publish or perish*“).
- In der Forschung herrscht nach Aussagen von Ian Wilmut nicht selten ein gewisser Konservatismus: Wissenschaftler verfahren häufig nach dem Motto, was gut klappt, daran wird festgehalten. Insofern wird kaum jemand, der über eine gut geführte Mäusekolonie verfügt, sich auf Großtiere umstellen wollen. Zudem gehören zum Umgang mit Großtieren besondere Qualifikationen, die in normalen molekularbiologisch orientierten Instituten selten zu finden sind.

Aus dieser Situation ergeben sich für uns folgende Schlußfolgerungen:

1. Auf der Grundlage des kerntransferbasierten Klonens als Hilfsmittel zur Transgenesis lassen sich Krankheitsmodelle in Großtieren schaffen, die je nach zu untersuchender Krankheit im Hinblick auf anatomische, physiologische oder genetische

---

<sup>59</sup> Siehe auch das Zitat von Alex Kind in Abschnitt 2.2.5.

Charakteristika bisherigen Mausmodellen überlegen sein können. Sie könnten von daher zumindest im Prinzip dazu beitragen, aussagekräftigere Ergebnisse in der präklinischen Forschung gewinnen.

2. Inwieweit dies tatsächlich verwirklicht werden wird, hängt aller Wahrscheinlichkeit nach eher von den praktischen Gegebenheiten des Forschungssettings und den dort vorhandenen Voraussetzungen für den Umgang mit Großtieren ab als von den eventuell vorhandenen biologischen Vorteilen solcher Tiere.
3. Ob sich durch solche mit Hilfe des Klonens möglicherweise erzeugbaren neuen Tiermodelle auch die Zahl von Tierversuchen reduzieren läßt - auf diesen Aspekt wies uns die Firma Boehringer Ingelheim in einer schriftlichen Stellungnahme zum Thema hin - kann zumindest zur Zeit nicht verifiziert werden. Angesichts der vieler neuen Möglichkeiten für Krankheitsmodelle könnte zumindest in den ersten Phasen einer solchen Entwicklung auch das Gegenteil der Fall sein.

Darüber hinaus stellt sich auch die Frage, wie eine derartige Instrumentalisierung von Tieren zu bewerten ist. Die bewußte Erzeugung von Krankheiten in Tieren bedeutet zwangsläufig, daß die betroffenen Tiere leiden müssen. Ob der Erkenntnisgewinn und der eventuelle später daraus resultierende, aber nicht sichere Nutzen für Patienten dieses Leiden rechtfertigt, ist strittig. Mitunter sind Tiermodelle für menschliche Krankheiten nur wenig nützlich. Alan Colman umschrieb im Gespräch mit uns dieses Dilemma mit dem Satz: „You don't know if a disease model is useful unless you make it“.

Es erscheint paradox, daß beim Gen-Pharming (Abschnitt 3.1) so viel Wert auf die Gesundheit und das Wohlbefinden der Produzententiere gelegt, beim Erzeugen von Krankheitsmodellen das Leiden von Tieren dagegen billigend in Kauf genommen wird. Der Unterschied liegt darin, daß es zum Teil möglich ist, therapeutische Proteine ohne Beeinträchtigung des Wohlbefindens der dazu instrumentalisierten Tiere zu gewinnen, kaum möglich ist jedoch, Krankheiten an Tieren zu studieren, ohne diese Tiere auch tatsächlich krank zu machen. Hinzu kommt eine Inkonsequenz bei der gesellschaftlichen Wertschätzung unterschiedlicher Tiere: An Mäuse als Versuchstiere hat sich die Gesellschaft inzwischen weitgehend gewöhnt. Sie gelten als Schädlinge und werden, wenn man sie im Haus hat, vernichtet. Nicht von ungefähr testet PPL Projekte des Gen-Pharmings zuerst in Mäusen und läßt davon ab, transgene Produktionstiere herzustellen, wenn gesundheitliche Beeinträchtigungen der Mäuse festgestellt werden (siehe Abschnitt 3.1). Alan Colman war sich dieser Problematik bewußt und warf die Frage auf, ob Mäuse weniger wert seien als Schafe. Jedenfalls sind sie kostengünstiger und als Versuchstiere eher akzeptiert als Nutztiere.

Offen ist also nach wie vor, wieviel Leiden von Tieren in Kauf genommen werden kann, um Untersuchungen durchzuführen, von denen man hofft aber lange nicht sicher ist, daß sie kranken Menschen eines Tages helfen könnten. Jenseits aller grundsätzliche-

ren Überlegungen, die nicht Aufgabe dieser Untersuchung sind, ist an dieser Stelle zumindest eine Forderung zu artikulieren:

- \* Bei der Konzeption von Tiermodellen muß sehr gründlich geprüft werden, ob das Krankheitsmodell, das unter den bei dem betreffenden Tier gegebenen biologischen Voraussetzungen nach genetischen Eingriffen und Klonierung erreicht werden kann, tatsächlich weitgehend mit der beim Menschen vorfindbaren Krankheit identisch ist.

Dies wäre aus unserer Sicht eine entscheidende, wenngleich nicht die einzige Voraussetzung für die Legitimität der Herstellung solcher Tiere für und ihres Einsatzes in der Forschung. Weitergehende Forderungen, beispielsweise im Hinblick auf die Vermeidung von Schmerzen und Leiden, sowie im Hinblick auf Aspekte der artgerechten Züchtung und Haltung sind in der Debatte um die Tierethik artikuliert worden, und müssen auch bei der Erzeugung transgener, mithilfe des Kerntransfers erzeugter Tiere als Krankheitsmodelle berücksichtigt werden<sup>60</sup>.

### **3.4.2 Genetisch identische Tiere zu Versuchszwecken**

Durch Klonen lassen sich nicht nur Zwillinge oder Drillinge, sondern im Prinzip auch größere Gruppen genetisch identischer Tiere erzeugen. Grundsätzlich eignen sich solche Tiere zur Untersuchung biologischer und medizinischer Fragestellungen, in denen der genetische Hintergrund der Versuchstiere von Belang ist. Sie sind dafür besser geeignet als ingezüchtete Mausstämme und entsprächen der Forschung an eineiigen Zwillingen beim Menschen (Meng et al. 1997). Um aussagekräftige Ergebnisse zu erhalten, müßte man bei Verwendung einer genetisch einheitlichen Population weniger Tiere einsetzen als bei Verwendung von Inzuchtstämmen oder gar genetisch heterogener Tiere.

So könnten genetisch identische Tiere wertvolle Aufschlüsse liefern über pharmakologische, toxikologische, ernährungsbiologische und metabolische Fragen (Stellungnahme der Firma Boehringer Ingelheim an uns; Meng et al. 1997). Manche Wissenschaftler halten geklonte Tiere auch zur Untersuchung verhaltensbiologischer und -genetischer Fragestellungen für interessant (Katrin Mooslehner, Cambridge, UK, persönliche Mitteilung).

Zur Prüfung pharmakologisch wirksamer Substanzen sind geklonte genetisch identische Tiere insofern von Interesse, als sich an ihnen ein genaues Bild darüber erhalten ließe, welches Wirkungsspektrum ein Pharmakon vor einem genetisch einheitlichen Hintergrund entfaltet. Besonders beim Vergleich zweier zu untersuchender Wirkstoffe

---

<sup>60</sup> Zu den neueren Diskussionen um das Klonen vgl. u.a. Altner 1998.

ließen sich aus den Ergebnissen Rückschlüsse auf den Einfluß des genetischen Hintergrundes auf die Arzneimittelwirkung ziehen. Insofern könnten geklonte Tiere ggf. einen Beitrag zur Pharmakogenetik leisten, die genetische Einflüsse bei der Wirkung von Arzneimitteln untersucht.

Grundsätzlich ist jedoch zu bedenken, daß die Patienten, bei denen die Wirkstoffe angewendet werden sollen, genetisch und physiologisch heterogen sind. Von daher ist fraglich, welchen Wert Aussagen haben, die an Tieren mit einem einheitlichen oder sehr homogenen genetischen Hintergrund gemacht worden sind. Auch wäre der Aufwand für solche Untersuchungen angesichts der geringen Effizienz des Klonens enorm, und weder Alan Colman noch Boehringer Ingelheim halten diesen Aspekt der Nutzenanwendung des Klonens in der näheren Zukunft für praktikabel.

#### 4 **Biologische Risiken und technische Grenzen des kerntransferbasierten Klonens**

Die Erzeugung von Tieren mithilfe eines technischen Verfahrens, das in radikaler Weise die natürlichen Gesetzmäßigkeiten der Reproduktion und Embryonalentwicklung außer Kraft setzt, provoziert weitreichende Fragen nach seinen Unsicherheiten, Risiken und Grenzen. Unmittelbarer Anlaß dazu ist die Tatsache, daß die Chance eines durch Kerntransfer geklonten Embryos, lebend geboren zu werden, ziemlich gering ist. Und wie sich in den bislang publizierten Experimenten gezeigt hat, ist auch eine Lebendgeburt keine Garantie dafür, daß das Tier normal heranwächst.

Nach einer Meldung von *Agence France-Press* vom 23. August 1998 ist eines der in Japan aus adulten Zellen geklonten Kälber drei Tage nach seiner Geburt gestorben. Es habe Atemprobleme gehabt und sei inzwischen das fünfte von zehn geklonten Kälbern, das in den vergangenen beiden Monaten in Japan starb. Auch eines der französischen Klonkälber, Marguerite, erzeugt aus einer fetalen Muskelzelle, verendete knapp fünf Wochen nach seiner Geburt unter etwas unglücklichen Umständen an massiver Infektion.<sup>61</sup> Jean-Paul Renard, der Leiter der Forschergruppe, die Marguerite geklont hatte, schloß nicht aus, daß sie möglicherweise an einer Immunschwäche litt, die eine Folge der Klonprozedur gewesen sein könnte (Cohen 1998a).

Ferner starben von den ersten fünf Lämmern, die aus kultivierten embryonalen Zellen geklont wurden, zwei innerhalb von Minuten nach der Geburt und das dritte zehn Tage danach. Die verstorbenen Tiere zeigten Abnormitäten im Urogenitaltrakt, und zwei wiesen zusätzliche Abweichungen im Blutgefäßsystem auf (Campbell et al. 1996b). Und von den 14 Feten, die zusammen mit dem transgenen Schaf Polly (Abschnitt 3.1) entstanden, überlebten neben Polly selbst nur vier weitere die ersten zwei Wochen nach der Geburt (Schnieke et al. 1997). Ein Fetus wurde vor Tag 80 resorbiert, einer wurde nach 130 Tagen spontan abortiert. Von den verbliebenen zwölf waren vier Totgeburten, ein Lamm hatte zwar nach der Geburt noch Herzschlag, doch setzte die Atmung nicht ein, ein weiteres starb anderthalb Stunden nach der Geburt, eines hatte einen Herzfehler und wurde nach 14 Tagen notgeschlachtet. Zudem mußten die meisten Geburten eingeleitet werden und per Kaiserschnitt erfolgen. Schaut man sich die Ergebnisse von Yanagimachis Gruppe bei Mäusen an, ist die Sachlage kaum anders: Viele

---

<sup>61</sup> Das Tier bekam zunächst eine Nabelinfektion und wurde deswegen mit Antibiotika behandelt und isoliert gehalten. Doch fühlte es sich offenbar einsam, zwängte sich unter der Absperrung seines Pferches zu einer benachbart gehaltenen Herde durch und zog sich dabei Verletzungen zu, infolge derer sich die Infektion ausbreitete und nicht mehr eindämmen ließ.

der erzeugten frühen Embryonen entwickelten sich nicht weiter, ein Großteil der doch entstandenen Feten starb ab, und die Mortalität der schließlich geborenen Mäuse war ebenfalls recht hoch (Wakayama et al. 1998). Wilmut faßte dieses allgemein beobachtete Phänomen im Gespräch mit uns in dem knappen Satz zusammen: „They die all the time“.

Die Effizienz des Klonens liegt nach den Arbeiten von Wilmut et al. (1997), Schnieke et al. (1997) und Wakayama et al. (1998) im Bereich von einem bis drei, manchmal auch fünf Prozent, bezogen auf die Zahl der in Ersatztragetiere transferierten frühen Embryonen. Das heißt, von hundert Morulae oder Blastozysten, die in den Uterus eines Tragetierts eingebracht werden, entwickeln sich höchstens drei bis fünf bis zur Geburt.<sup>62</sup> Gemessen an der Zahl der durchgeführten Kerntransfers liegt die Erfolgsrate noch um gut die Hälfte bis ein Zehntel niedriger: Nur 10 bis 40 Prozent der mit einem neuen Zellkern bestückten Oozyten entwickelten sich in den Fusionsexperimenten von Wilmut et al. (1997) bis zum Morula- oder Blastozystenstadium<sup>63</sup>, bei der Injektionsmethode von Wakayama et al. (1998) waren es dann immerhin 30 bis gut 60 Prozent.

Auf diesen statistischen Charakter des kerntransferbasierten Klonens hatten wir bereits hingewiesen (Abschnitt 2.2). Auch mögliche Gründe dafür wurden intensiv diskutiert, so eventuelle Veränderungen von Imprintingmustern, weitere epigenetische Effekte, Fragen der Telomerlänge und anderes mehr (Abschnitte 2.2 und 2.3). Das Problem des „large calf syndromes“, also die Entwicklung übergroßer Tiere nach Embryomanipulationen (nicht nur nach Kerntransfer), wurde ebenfalls angesprochen (Abschnitt 2.3). In Abschnitt 2.5 hatten wir zudem auf die Problematik somatischer Mutationen verwiesen. Dies sei im folgenden etwas näher erörtert.

Daß Zellen zufällige Mutationen anhäufen können, ist bekannt. Meist sind Mutationen nachteilig, so wie ein zufälliger Druckfehler in einem Buch dessen Inhalt kaum verbessern kann, sondern eher Irritationen beim Lesen hervorruft. Zur „Druckfehlerbeseitigung“ gibt es in Zellen eine Reihe von Mechanismen. Wenn sie alle fehlschlagen, wird entweder, in ganz seltenen Fällen, die Evolution vorangetrieben – das Individuum hat dann einen Reproduktionsvorteil. Oder, was häufiger ist, das Individuum kann sich schlechter fortpflanzen, weil es beispielsweise früh stirbt oder andere genetische Benachteiligungen erleidet, die dem Fortpflanzungserfolg im Wege stehen.

Zu unterscheiden ist dabei zwischen vererbbaeren Mutationen, also solchen, die die Keimbahn betreffen, und somatischen, solchen, die sich nur auf einige Zellen des Trä-

---

<sup>62</sup> Bei einer Versuchsreihe mit fetalen Fibroblasten als Kernspender hatten Wilmut et al. (1997) allerdings eine Erfolgsrate von über 16 Prozent, doch das war wahrscheinlich ein „statistischer Ausreißer“, ein Glücksfall: Von sechs eingespülten Embryonen in dieser Serie kam einer bis zur Geburt.

<sup>63</sup> In der „Ausreißerserie“ aus voriger Fußnote waren es 54 Prozent.

gers auswirken. Erstere können an die nächste Generation weitergegeben werden, letztere nicht. Somatische Mutationen bleiben mit großer Wahrscheinlichkeit neutral: Man schätzt, daß der Mensch etwa 100 000 Gene besitzt und daß rund 10.000 davon in einer gegebenen differenzierten Zelle exprimiert werden. Wenn eines der nicht exprimierten 90.000 anderen Gene mutiert, hat das meist keinen Einfluß auf die Funktionsfähigkeit der Zelle.<sup>64</sup> Es besteht daher kaum ein Selektionsdruck, daß eine beliebige somatische Zelle alle ihre Gene, auch die nicht exprimierten, intakt hält. Wenn in einer Leberzelle ein Gen mutiert, das für die Funktion des Gehirns gebraucht wird, hat das keine Konsequenzen für das betroffene Individuum. Und wenn in einer kultivierten Zelle irgendein Gen mutiert, das zum Zusammenhalt oder zur Entwicklung eines kompletten Organismus beiträgt, sind die Folgen dieses Ausfalls irrelevant: Die Zelle kann sich weiterhin völlig unbeeinträchtigt in Zellkultur teilen.

Anders ist die Situation einzuschätzen, wenn aus besagter Leberzelle oder aus der kultivierten Zelle mittels Kerntransfer in eine entkernte Eizelle ein Tier geklont werden soll. Dann können solche Mutationen erhebliche Folgen haben und dazu beitragen, daß das geklonte Tier frühzeitig abstirbt oder irgendwelche Abnormitäten entwickelt. Man mag argumentieren, daß dies in gleicher Weise auch für natürlich gezeugte Embryonen gelten kann, da sich Mutationen schließlich auch in Keimzellen ereignen können. Das stimmt zweifellos, dennoch gibt es hier einen wichtigen Unterschied – nicht von ungefähr sind im Zuge der Evolution Mechanismen entstanden, die die Mutationshäufigkeit in Keimzellen reduzieren. Bei Säugern sind diesbezüglich zwei Dinge auffallend: Im weiblichen Geschlecht werden Hunderttausende künftiger Keimzellen bereits vor der Geburt angelegt und bis zur jeweiligen Bereitstellung nach der Pubertät gleichsam im Vorreifezustand eingefroren – diese primären Oozyten verharren über Jahre bis Jahrzehnte in einer bestimmten Phase der meiotischen Zellteilung, sind also in dieser Zeit teilungsinaktiv, was die Wahrscheinlichkeit für Replikationsfehler<sup>65</sup> herabsetzt. Bei Säugermännchen ist der Mechanismus anders: Hier werden zwar nach der Geschlechtsreife unablässig neue Keimzellen produziert, doch das Organ dazu, der Hoden, ist aus der Bauchhöhle ausgelagert und wird dadurch buchstäblich luftgekühlt, was die Mutationshäufigkeit in der Spermatogenese verringert.

Geklonte Tiere könnten daher einem höheren Risiko ausgesetzt sein, schadhafte Gene mitzubekommen, als natürlich gezeugte. Das Risiko ließe sich vielleicht herabsetzen,

---

<sup>64</sup> Eine zusätzliche Sicherheitsvorkehrung ist die schon erwähnte Diploidie: Fast alle höheren Organismen besitzen von fast jedem Gen zwei Exemplare, so daß der Ausfall eines Exemplars vom anderen meist kompensiert werden kann.

<sup>65</sup> Die Tatsache, daß sich auch in vivo gezeugte Embryonen häufig nicht weiterentwickeln wird darauf zurückgeführt, daß es in den Oozyten bei der Reifeteilung zu einer Fehlverteilung der Chromosomen (numerische Aneuploidie) kommen kann, oder dies während der ersten Furchungsteilungen im Embryo passiert. Aneuploide Embryonen sind in vielen Fällen nicht entwicklungsfähig.

wenn Zellen für die Klonierung verwendet werden, die möglichst wenige Zellteilungen durchlaufen haben<sup>66</sup>. Diese Vorgabe dürfte allerdings schwierig einzuhalten sein, wenn man etwa mittels Kerntransfer vielfach transgene Schweine für die Xenotransplantation erzeugen will.

Vor dem Hintergrund der bisherigen Erfahrungen mit klonierten Tieren und der Erkenntnisse aus der embryologischen Grundlagenforschung ist also festzuhalten, daß nach derzeitiger Ergebnislage für einen gegebenen durch Kerntransfer geklonten Embryo nur eine geringe Chance besteht, sich bis zur Geburt zu entwickeln. Auch nach der Geburt wird eine erhöhte Sterblichkeitsrate beobachtet. Verantwortlich für diese hohe Mortalität vor und nach der Geburt könnten unter anderem transferbedingte epigenetische Veränderungen im Genom des Spenderzellkerns sein oder eine unerkannte Anhäufung somatischer Mutationen. Beides könnte auch dazu führen, daß selbst Tiere, die das Erwachsenenalter erreichen, noch Spätschäden entwickeln – dann nämlich, wenn Gene betroffen sind, die erst in späteren Lebensphasen gebraucht werden (siehe dazu Abschnitte 2.2 und 2.3).

Zu fragen ist ferner, ob geklonte Tiere aufgrund der postulierten Mechanismen eine geringere Lebenserwartung, eine höhere Krebsanfälligkeit und/oder einer erhöhte Anfälligkeit für bestimmte Mißbildungen oder Pathologien zeigen. Ob dem so ist, und wenn ja, mit welcher Häufigkeit und unter welchen Umständen, ist unbekannt und bedarf für den Fall, daß das Klonen grundsätzlich für förderungswürdig erachtet wird, näherer Untersuchung. Da nunmehr das Klonen von Mäusen möglich geworden ist, müßten sich diese Fragen zumindest im Hinblick auf kurzfristig erkennbare Probleme relativ zügig klären lassen. Erst dann wäre zumindest in der Maus eine genauere Einschätzung möglich, welche tatsächlichen Grenzen und Risiken das kerntransferbasierte Klonen in sich birgt.

Die obigen Erörterungen beziehen sich auf das individuelle Risiko eines geklonten Tieres infolge der Klonprozedur selbst. Darüber hinaus stellen sich mindestens drei weitere Fragen zu möglichen über das Individuum hinausreichenden Risiken:

---

<sup>66</sup> Einer anderen Hypothese zufolge könnte das Risiko von Mutationen eventuell auch verringert werden, wenn man als Kernspenderzellen gleichfalls „luftgekühlte“ Zellen verwendet werden, etwa Hautzellen aus dem Ohr, wie bei besagtem japanischen Klonkalb (*aff*-Meldung vom 21. August 1998), was ihm allerdings auch nichts genützt hat. Im Falle kultivierter Zellen als Kernspender sollten diese eventuell auch nicht bei 37 Grad Celsius, sondern eher bei 35 oder 30 Grad gehalten werden.

- *Können sich eventuelle epigenetische Veränderungen auf die Nachkommen des geklonten Tieres vererben, und: Können zusätzliche Risiken beim sequentiellen Klonen auftreten, also beim Klonen aus bereits geklonten Tieren?*

Daß eine Vererbung epigenetischer Veränderungen auf die nächste Generation möglich ist, zeigen die bereits diskutierten Ergebnisse von Wolf Reik, Irmgard Roemer und Mitarbeitern. Auch können sich epigenetische Veränderungen bei der Vererbung auf nachfolgende Generationen unter Umständen sogar verschärfen (Abschnitt 2.2.3). Es ist vorstellbar, daß sich im Zuge sequentieller Klonprozeduren epigenetischen Veränderungen akkumulieren können, bislang gibt es freilich keine Untersuchungen dazu. Steven Stice und Carol Keefer (1993) dokumentierten immerhin eine Untersuchung über die Effizienz des sequentiellen Klonens beim Rind. Dabei wurde der (aus dem Kern einer Embryonalzelle) geklonte Embryo schon im frühen Stadium wieder als Spender von Zellkernen für die nächste Klongeneration verwendet (*multiple generational embryo cloning* oder *recloning*). Nach den Ergebnissen von Stice und Keefer nahm die Effizienz ab: Die Rate der erfolgreichen Fusionen von Spenderzellen mit entkernten Eizellen verringerte sich mit jeder Generation. Entwicklungsraten (bis zur Morula) sanken von 20 Prozent in der ersten Klongeneration auf zehn Prozent in der zweiten, stiegen in der dritten Generation auf 19 Prozent an (möglicherweise kam hier eine Art Selektionsdruck zum Tragen), gingen jedoch in der vierten Generation wieder auf zwölf Prozent zurück (hier war allerdings die Zahl an Versuchen kleiner). Die Rate der Entwicklung der Morulae bis zur Geburt betrug in der ersten Generation zehn Prozent (8/80), in der zweiten zwei (1/48) und in der dritten drei Prozent (1/29). Die Autoren halten eine Akkumulation von Schäden durch suboptimale Embryokulturbedingungen, als Folge der Mikromanipulationen und/oder aufgrund unvollständiger Reprogrammierung der Spenderzellkerne für möglich. Wakayama et al. (1998) hingegen fanden beim Klonen von Mäusen durch Kerninjektion (statt Zellfusion) keine signifikanten Unterschiede zwischen der Effizienz bei der Erzeugung von Klonen der ersten Generation und der bei der Erzeugung von „geklonten Klonen“.

- *Existieren besondere Risiken bei bestimmten Anwendungen des kerntransferbasierten Klonens?*

Diese Frage ist positiv zu beantworten. Zusätzliche Risiken für das betroffene Tier bestehen je nach Anwendungsbereich des Klonens durchaus, so etwa beim Gen-Pharming (vgl. Abschnitt 3.1). Daß Tiere, die als Modelle für menschliche Krankheiten erzeugt werden, zwangsläufig leiden müssen, wurde ebenfalls angesprochen (Abschnitt 3.4). Welche Risiken etwa für Tiere auftreten können, die zum Zweck der Xenotransplantati-

on (Abschnitt 3.2) gewonnen werden, ist derzeit noch völlig unklar. Ein besonderes Risiko mag für Tiere einer komplett geklonten Herde bestehen, wie sie Alan Colman vorschwebt (Abschnitt 3.1): Solche Tiere hätten alle denselben MHC-Typ, und MHC-Moleküle sind für die spezifische Präsentation intrazellulärer Antigene (etwa Bruchstücke von Virusproteinen) an das Immunsystem verantwortlich. Bei identischem MHC würden immer dieselben Antigenbruchstücke präsentiert, und die Gefahr ist groß, daß das Immunsystem sie gar nicht als fremd erkennt, etwa weil sie körpereigenen Proteinbruchstücken ähneln, an die das Immunsystem gewöhnt ist. In einem solchen Fall könnte das Immunsystem der Tiere keine zellvermittelte Gegenwehr in Gang setzen, und die Virusinfektion würde rasch die gesamte geklonte Herde befallen.

- *Bestehen Risiken für die Umwelt oder für den Genpool einer geklonten Tierart oder Rasse?*

Ob durch das Klonen an sich Gefahren für die Umwelt bestehen, ist schwer einzuschätzen. In Frage kämen diesbezüglich die Aktivierung endogener Retroviren (Abschnitte 2.2.4 und 3.2.3) und deren möglicher Übertritt auf nicht geklonte Tiere, doch dazu gibt es unseres Wissens bislang keine Untersuchungen. Eine konkrete Gefahr der Entstehung neuer pathogener Keime und des Übertritts von Keimen in andere Individuen ist bei der Xenotransplantation erkennbar (Abschnitt 3.2.3), doch ist dies keine Gefahr des Klonens an sich, sondern vielmehr eine mögliche Folge der entsprechenden Nutzung des Klonens.

Eine Verarmung des Genpools von Nutztierassen durch das Klonen wäre zwar möglich, unserer Einschätzung nach derzeit aber kaum zu befürchten, jedenfalls nicht mehr als durch konventionelle Züchtungsmethoden und Hochleistungsselektion, die schon genug zur Verminderung der Rassenvielfalt bei Nutztieren beigetragen haben. Klonen ist zumindest beim derzeitigen und in absehbarer Zukunft zu erwartenden Stand der Technik zu aufwendig und somit zu teuer, um Hochleistungstiere zu vervielfältigen; kaum ein Landwirt kann sich den Kauf solcher Embryonen leisten, und Firmen, die auf dieses Marktsegment setzten, mußten in der Regel aufgeben (Pennisi 1998b, Kolata 1997a).

Eher könnte das Klonen dazu beitragen, daß die Kerntransfermethode zur Erhaltung bedrohter Tierarten und -rassen beitragen kann. Hier sei auf die Bestrebungen chinesischer Forscher hingewiesen, Pandabären zu klonen. Ob die Methode allerdings erfolgreich auf bei dieser Tierart angewandt werden kann, bleibt abzuwarten. Inzwischen hat zudem eine neuseeländische Forschergruppe aus der letzten überlebenden Kuh einer besonders kälteresistenten Rinderrasse (Enderby-Rinder) ein Kalb geklont und hofft,

diese Rasse mittels des geklonten weiblichen Kalbes und eingefrorener Samen von Enderby-Bullen erhalten zu können<sup>67</sup>.

Die technischen Grenzen des kerntransferbasierten Klonens sind nach wie vor sehr hoch, und es bleibt offen, ob sie alle überwindbar sind und ob sich die dabei jeweils angestrebten Ziele und Anwendungen verwirklichen lassen. Nach dem Erfolg von Yanagimachis Gruppe bei Mäusen (Wakayama et al. 1998) ist jedoch zu vermuten, daß viele der noch ungeklärten Aspekte des Klonens schneller gelöst werden können als bisher angenommen.

---

<sup>67</sup> Nach einer Meldung im Deutschlandradio-Newsletter vom 14. August 1998. Siehe im Internet unter <http://www.dlf.de>

## 5 Methodische und konzeptionelle Alternativen

Die Bewertung einer neuen Technologie ist kaum möglich, ohne daß andere Wege, die zur Bearbeitung einer Fragestellung oder eines Problems vorgeschlagen werden, mit in die Evaluierung und Bewertung einbezogen werden (vgl. hierzu u.a. Paschen u.a. 1990:52). In dem hier vorgegebenen Rahmen ist dies allerdings nur ansatzweise möglich. Zunächst ist jedoch zu klären, um welche Alternativen es geht. Wie bei vielen neuen methodischen Entwicklungen in der Bio- und Gentechnologie gibt es darauf keine einfache Antwort. Denn beim Klonen handelt es sich um ein Verfahren, das in vielen Bereichen der grundlagen- und anwendungsorientierten Forschung, in der Pharmaproduktion und auch im Zusammenhang mit der Entwicklung von Zelltherapien eingesetzt werden kann bzw. könnte. Angesichts der Vielzahl potentieller Anwendungsfelder erscheint es kaum möglich, *eine* technische Alternative zum Verfahren des kerntransferbasierten Klonens zu benennen. Daraus können für die folgende Diskussion zwei Schlußfolgerungen abgeleitet werden.

- Zum einen müßten *verschiedene Techniken und Verfahren* berücksichtigt werden, die anstelle des Klonens in verschiedenen Anwendungsfeldern mit ähnlicher Zielsetzung eingesetzt werden können.
- Zum anderen stellt sich die Frage, in welchen *konzeptionellen Rahmen* das Klonen eingebettet ist und welche Alternativen dazu formuliert werden können. Vor diesem Hintergrund wären Alternativen zum Klonen nicht im Bereich anderer Techniken zu suchen, sondern im Bereich konkurrierender biologischer oder medizinischer Konzepte zum Erkennen oder Beeinflussen von Entwicklungs- oder Krankheitsprozessen.

Im folgenden wird skizziert, ob - und wenn ja welche - Methoden oder Verfahren heute existieren, durch die ähnliche Ziele erreicht werden könnten wie mit Hilfe des Klonens (Abschnitt 5.1). Im nächsten Schritt soll dann diskutiert werden, ob sich im konzeptionellen Bereich Alternativen - beispielsweise zu dem in der molekular orientierten Medizin dominierenden Verständnis von Krankheiten und ihrer Therapie - formulieren lassen, die das Klonen zumindest in bestimmten Bereichen obsolet machen könnten (Abschnitt 5.2).

## 5.1 Methodische Alternativen

Wenn eine Methode wie die des kerntransferbasierten Klonens mit Unsicherheiten oder erkennbaren Risiken behaftet, und zudem mit ethischen und kulturellen Vorbehalten konfrontiert ist, stellt sich die Frage, ob die angestrebten Ziele nicht mit anderen Methoden erreicht werden können. Unseres Wissens existiert allerdings kein Verfahren, das als einzelnes das Potential des kerntransferbasierten Klonens ersetzen könnte. Insofern sind verschiedene Einsatzbereiche des Klonens im Hinblick auf verfügbare oder sich in der Entwicklung befindliche Alternativen zu prüfen. Dabei ist auch zu untersuchen, wie effektiv diese Methoden sind und welche Risiken sie selber beinhalten.

In der Grundlagenforschung hält zumindest Wolf Reik das kerntransferbasierte Klonen für unverzichtbar und sieht keine Alternativen dazu. Andere Wissenschaftler teilen diese Einschätzung. Reik geht davon aus, daß sich mit diesem Verfahren, bei Mäusen angewandt, wertvolle Erkenntnisse über Differenzierungsvorgänge und über die Frage, was etwa Totipotenz von Zellen bedeutet, gewinnen lassen. Ferner erwarten er wie auch Alan Colman und Ian Wilmut neue Einsichten in Alterungsprozesse, in das Krebsgeschehen und in die Entstehung von Krankheiten. Ob sich diese Erwartungen erfüllen werden, bleibt abzuwarten; Grundlagenforscher im biomedizinischen Bereich neigen gerne dazu, auf die Erforschung von Krebs oder anderen verbreiteten Leiden zu verweisen, um damit ihren wissenschaftlichen Ansatz und die dabei verfolgten Teilziele zu legitimieren. Gleichwohl sollte aus Abschnitt 2 klar geworden sein, daß die Methode nicht nur Spemanns Frage nach dem genetischen Potential von differenzierten Zellkernen beantwortet, sondern gleichzeitig eine Fülle neuer grundlegender Fragen aufgeworfen hat, von denen sich einige möglicherweise nur mit weiteren Klonexperimenten klären lassen werden.

Im angewandten Bereich existieren allerdings durchaus Alternativen zum Klonen. Beispielsweise lassen sich zur Produktion menschlicher Proteine für therapeutische Zwecke auch Bakterien, Hefen oder kultivierte Säugerzellen heranziehen. Allerdings haben auch diese Nachteile, die entweder im biologischen oder im ökonomischen Bereich liegen. Sie wurden in Abschnitt 3.1 bereits diskutiert. Neben manchen biologischen Vorteilen erscheinen vor allem die ökonomischen Vorteile der Produktion humanidentischer Wirkstoffe in transgenen Tieren attraktiv zu sein, denn in vielen Fällen bedarf es nur weniger solcher Tiere, um hinreichend viel von dem gewünschten Produkt zur Befriedigung des globalen Bedarfs zu erzeugen. Dabei ist jedoch die Erzeugung transgener Tiere nicht notwendigerweise auf das kerntransferbasierte Klonen angewiesen; alternativ stehen ES-Zell-Verfahren und die Injektion des Fremdgens in einen Vorkern der befruchteten Eizelle zur Verfügung. Das ES-Zell-Verfahren ist bislang jedoch nur bei Mäusen möglich, und seine Effizienz ist immer noch nicht nicht sonderlich hoch

(Katrín Mooslehner, Cambridge, UK, persönliche Mitteilung). Darüber hinaus sind Mäuse ihrer geringen Milchleistung wegen auch nicht gerade ideale Produktionstiere - zumindest dann nicht, wenn größere Mengen eines Wirkstoffes erzeugt werden sollen. Dabei ist jedoch zu bedenken, daß solche Wirkstoffe in transgenen Tieren durchaus in größeren Konzentrationen erzeugt werden können, so daß es in bestimmten Fällen ausreichen könnte, Mäuse als Produktionstiere zu verwenden. Dies sollte vor dem Einsatz von größeren Nutztieren geprüft werden.

Die Injektion von DNA in Vorkerne zur Schaffung transgener Tiere ist jedoch ebenfalls mit Unsicherheiten und Risiken verbunden, auch sie wurden bereits erörtert. Abhilfe schaffen könnte hier etwa die Verwendung künstlicher Chromosomen (Lamb & Gearhart 1995, Harrington et al. 1997). Solche blieben als selbständig replizierende Einheiten stabil erhalten, sie müßten nicht in ein Chromosom des Wirtsorganismus integrieren, so daß das Problem der Insertionsmutagenese und des unerwünschten regulatorischen Einflusses benachbarter Wirtssequenzen am zufälligen Integrationsort wegfiel. Auch hier wäre jedoch zu untersuchen, welche Risiken sich wiederum aus der Verwendung dieser Methoden ergäben. Zumindest die Gefahr epigenetischer Veränderungen scheint nicht nur beim Klonen, sondern bei jedweder Art von Embryomanipulation zu bestehen (Abschnitt 2.3).

Zusammenfassend ist festzuhalten, daß das Klonen im Bereich der Erforschung grundlegender biologischer Prozesse eine methodische Innovation darstellt, für die im Rahmen des dominierenden molekular- und zellbiologischen Paradigmas (s.u.) Alternativen nur schwer vorstellbar sind. Im angewandten Bereich sieht dies allerdings anders aus, hier sind durchaus andere Optionen vorhanden, um die mithilfe des Klonens angestrebten Ziele zu erreichen. Allerdings kann an dieser Stelle keine umfassende Einschätzung des jeweiligen Verhältnisses von Potentialen, Risiken und Kosten gegeben werden. Dies bedarf einer detaillierteren Untersuchung.

Erinnert werden soll jedoch an dieser Stelle noch einmal daran, daß Dolly nicht geschaffen wurde, um mit ihr zell- oder entwicklungsbiologische Fragen zu klären. Vielmehr ist sie das Produkt einer anwendungsorientierten Forschung, die primär auf die möglichst effektive Erzeugung von für die Pharmaproduktion geeigneten Tieren abzielt. Das Interesse an biologischen Grundlagenfragen ist in diesem Zusammenhang sekundär. Solange also das kerntransferbasierte Klonen im Kontext einer an industriellen Nutzungszielen orientierten Biotechnologie steht und von daher auch seine Zielbestimmung bekommt, wird es kaum möglich sein, Alternativen dazu zu etablieren, denn das Klonen ergänzt das Repertoire an Techniken, die zur Manipulation von Tieren als Produktionsorganismen eingesetzt werden, in idealer Weise. Die Erzeugung von identi-

schen Klontieren aus zuvor genetisch maßgeschneiderten Zellen ist insofern ein konsequentes Ergebnis der Zusammenführung von Zellbiologie, molekularer Genetik und Reproduktionstechnologie zu kommerziellen Zwecken, und innerhalb der Logik dieser Entwicklung nahezu alternativlos und kaum infrage zu stellen - zumindest solange es sich effektiver und kostengünstiger erweist als vorhandene Alternativen und die Risiken kontrollierbar bleiben.

## 5.2 Konzeptionelle Alternativen

Dennoch setzt die Wahl von Methoden bereits bestimmte Vorstellungen darüber voraus, wie die zu untersuchenden oder zu verändernden Organismen oder Krankheitsphänomene strukturiert sind, und welche Prozesse ihnen zugrunde liegen; anders könnte man beim Einsatz einer Methode kaum interpretierbare Ergebnisse erwarten. In der biomedizinischen Forschung dominieren heute zell- und molekularbiologische Ansätze, die davon ausgehen, daß Untersuchungen auf der zellulären und molekularen Ebene nicht nur relevante Erkenntnisse beispielsweise über die Prozesse der Zelldifferenzierung und Dedifferenzierung erbringen, sondern sie auch (vollständig?) erklären können. Inzwischen liegen in der Tat auch viele Befunde über Gene, Proteine und Reaktionen vor, die an diesen Prozessen beteiligt sind. Insofern hat die moderne molekularbiologische Forschung bereits zur Klärung spezifischer entwicklungsbiologischer Fragestellungen beigetragen. Offen ist dabei, wie weit diese Befunde tatsächlich schon in die Konzepte der molekular orientierten Biologie integriert sind

Diese Befunde der Entwicklungsbiologie, vor allem aber auch das Voranschreiten des Humangenomprojektes haben ein neues Interesse an theoretischen und konzeptionellen Diskussionen in Teilen der Biologie provoziert. Im Zentrum stehen dabei häufig neuere Erkenntnisse zur Funktionsweise von Genen und Genomen, die vom Standpunkt dominierender Konzepte von Entwicklung und Vererbung nur schwer integriert werden können. Zu diesen neuen Erkenntnissen gehören zweifelsohne auch diejenigen, die in den Abschnitten 2.2 und 2.3 unter dem Stichwort der Epigenese diskutiert worden sind. Sie führen u.a. zu der Frage, wieweit Entwicklungsprozesse genetisch determiniert sind, und welche Rolle dabei Prozesse spielen, die zumindest nicht unmittelbar durch einzelne Gene gesteuert werden. In den letzten Jahren sind dazu eine Reihe wichtiger Publikationen entstanden<sup>68</sup>.

Im folgenden soll diskutiert werden, wie das Klonen im Kontext neuerer konzeptioneller Ansätze in der biologischen Grundlagenforschung und der biomedizinischen For-

---

<sup>68</sup> Vgl. hierzu u.a. Oyama 1985; Ho 1988, Gray 1992, Goodwin 1994.

schung eingeordnet werden kann. Denn wenn die Frage nach konkurrierenden Konzeptualisierungen der Gegenstände biologischer und biomedizinischer Forschung nicht gestellt wird, muß die Suche nach Alternativen notwendigerweise auf die Konzepte und Methoden beschränkt bleiben, die in den dominierenden Ansätzen der biomedizinischen Forschung verankert sind; außerhalb davon liegende Zugänge kommen so nicht in den Blick.

### 5.2.1 Biomedizinische Forschung

Mithilfe des Klonens sollen zum einen die Prozesse untersucht werden, die zum Zurücksetzen der Differenzierung des somatischen Zellkerns führen, wodurch das Klonen überhaupt erst möglich wird. Das kerntransferbasierte Klonen und die Regeneration von Embryonen aus adulten Zellkernen ist jedoch ein experimentell induzierter Vorgang, der in der natürlichen Reproduktion keinerlei Entsprechung findet. Aus diesem Grunde ist weitgehend unklar, welche Relevanz das Beobachtete für die Erklärung biologischer Phänomene haben kann; ob die Prozesse, die zur Entwicklung maligner Zellen bei der Krebsentstehung führen, damit vergleichbar sind, ist fraglich.

Ein Vorteil des Klonens ist jedoch, daß mit seiner Hilfe identische Embryonen erzeugt werden können, die sich zur Untersuchung der ersten Entwicklungsstadien eines Keims eignen. Eine der in diesem Zusammenhang zentralen Fragestellungen in der heutigen Forschung ist, welche Gene wann in der frühen Embryonalentwicklung aktiviert werden. Darüber hofft man, Erkenntnisse über die Steuerung von Entwicklungsprozessen zu gewinnen.

Entsprechenden Forschungsansätzen liegt die Vorstellung zugrunde, daß die embryonale Entwicklung durch eine differentielle Genaktivierung vorangetrieben wird. Dabei wird davon ausgegangen, daß sich der Prozeß der frühen präimplantativen Embryonalentwicklung als eine Abfolge identifizierbarer und rekonstruierbarer Schritte beschreiben läßt, die durch die zuvor aktivierten Gene vorangetrieben werden. Entsprechendes gilt für den Prozeß des Zurücksetzens des differenzierten Zustands des Genoms. Ein Ausdruck dieser Vorstellungen ist die Hoffnung, eines Tages die Faktoren, die an diesen für die Klonierung notwendigen Prozessen beteiligt sind, zu identifizieren und zu isolieren, um sie in einem *in vitro*-System der Embryonalentwicklung einsetzen zu können.

Diese Ansätze stehen jedoch in einem gewissen Spannungsverhältnis zu der Auffassung von Entwicklungsbiologen wie beispielsweise H. F. Nijhout, der davon ausgeht, daß Entwicklungsphänomene nicht auf die Interaktionen auf der molekularen Ebene redu-

ziert werden können. Anhand einer Fülle empirischer Daten aus entwicklungsbiologischen Untersuchungen weist er die Auffassung zurück, daß Gene die Entwicklung kontrollieren, denn „in einem System, in dem jede Komponente, und die vergangene Geschichte dieses Individuums zu der richtigen Zeit und in den richtigen Proportionen zusammen kommen müssen, ist es schwierig, irgendeiner Variable eine Kontrollfunktion zuzuschreiben, auch wenn einige von ihnen überproportional große Effekte haben mögen.“ (Nijhout 1990, S. 442). Er setzt sich weiterhin mit der Behauptung auseinander, daß die DNS in ihrer Struktur ein Entwicklungsprogramm enthält. Zwei Bedingungen müssen zum Beweis der Existenz eines solchen Programms erfüllt sein. Zum einen muß der Weg vom Gen zum Prozeß kausal sein, d.h. das Gen oder sein Produkt muß für die Durchführung des Prozesses notwendig und ausreichend sein. Dies ist jedoch bei den meisten Entwicklungsprozessen - wie auch bei denen, die beim Klonen ablaufen - nicht der Fall. Genprodukte ermöglichen Entwicklung, sind aber nicht ihre Ursache. Zwar können die benötigten Determinanten Genprodukte sein, aber ihr richtiger Effekt hängt mindestens ebenso sehr von ihrer zeitlich geregelten Expression wie von ihrer korrekten räumlichen Verteilung und chemischen Konstitution ab. Deshalb ist die Kontrolle von Entwicklungsprozessen zwischen Genprodukten und strukturellen Elementen diffus verteilt, und keineswegs eine emergente Eigenschaft des Genoms alleine (ebd., S. 443).

Als zweites muß ein Programm die Information über den sequentiellen Ablauf der einzelnen Schritte enthalten. Auch dieses Kriterium sieht Nijhout nicht erfüllt. Vielmehr ist Entwicklung eine Folge von komplexen zeitlichen und räumlichen Interaktionen, die auch von ihrer Umgebung abhängig sind. Entscheidend dabei ist: Die im Zusammenhang von Entwicklungsprozessen zu beobachtende Sequenz von Genaktivierungen ist ein Resultat dieser Interaktion, und nicht ihre Ursache. Nach dieser Analyse enthält also das Genom kein Programm<sup>69</sup>, und die Gene keine Informationen über Organisationsstufen, die höher sind als die Primärstruktur von Proteinen.

Eine Untersuchung von Entwicklungsvorgängen, die sich auf molekulare Phänomene konzentriert, tendiert dazu, regulativ eingreifende Faktoren, die außerhalb davon oder auf anderen Komplexitätsebenen lokalisiert sind, zu vernachlässigen<sup>70</sup>. Die genetische

---

<sup>69</sup> Von daher wären auch die in diesem Gutachten teilweise verwendeten Begriffe der „Programmierung“ und „Reprogrammierung“ kritisch zu reflektieren.

<sup>70</sup> Schon in den frühen Diskussionen um das Problem des methodischen Reduktionismus wurde ein solches Vorgehen problematisiert, wie in den Aussagen von Pantin: „Our method tends to cut us off from the investigation of complex phenomena and from the examination of systems of a higher order. It is not certain that the remarkable emergent properties of such systems can ever be wholly deduced from the study of elementary systems alone, and we certainly cannot wait for this to be determined. If we wish to gain a maximum of knowledge we must study all systems of all grades of complexity all the time.“ (Pantin 1986, 102).

Information wird oft zur alleinigen Steuerinstanz stilisiert, und die Strukturinformation, die durch Entwicklungsprozesse erzeugt wird, vernachlässigt (Oyama 1985).

Vor dem Hintergrund dieser Analyse nimmt Nijhout eine Neubestimmung der Rolle der Gene während der Entwicklung vor. Seiner Meinung nach sind sie „sowohl passive Materialquellen, die eine Zelle bei Bedarf nutzen kann, als auch Teil eines evolvierten Mechanismus. Dieser Mechanismus erlaubt es den Organismen, ihre Gewebe und Organe von der Umwelt unabhängig zu machen. Dabei ist die Funktion regulativer Gene nicht grundsätzlich anders als die von Strukturgenen, denn auch sie stellen nur sicher, daß die benötigten Materialien zur rechten Zeit und am rechten Ort zur Verfügung stehen.“ (vgl. Nijhout 1990, S. 444)

Angesichts dieser konkurrierenden Interpretationen des Zusammenhangs zwischen genetischen Faktoren und Strukturinformationen und ihrer Rolle bei Entwicklungsprozessen, stellt sich die Frage, welchen Beitrag das Klonen - eine extrem artifizielle Methode, die den strukturellen, genetischen und biochemischen Zusammenhang zwischen Zellkern und Cytoplasma auflöst und neukonstituiert, - letztlich zur Erkenntnis grundlegender biologischer Prozesse beitragen kann. Was mit dieser Methode sicher besser erreicht werden kann, ist die Manipulation von Zellen und Genomen. Die Tatsache, daß dieser Prozeß so ineffizient ist mag zum einen ein Hinweis darauf sein, daß er noch nicht hinreichend verstanden und aus diesem Grunde (noch) nicht kontrollierbar ist. Zum anderen - und dies würde dem konzeptionellen Denken von Nijhout recht geben - könnten Entwicklungsprozesse bei Säugern sich als derart komplex erweisen, daß sie einer *kontrollierten* Manipulation auf molekularer Ebene kaum zugänglich sind.

### 5.2.2 Krankheitsmodelle

Wie in Abschnitt 3.4.1 ausgeführt, soll das Klonen auch dabei helfen, bessere Modelle für menschliche Krankheiten u.a. in Großtieren zu entwickeln, um so das Verständnis dieser Krankheiten zu fördern und wirksamere Behandlungsmethoden entwickeln zu können. Krankheitsmodelle sind jedoch nicht nur Hilfsmittel für die Forschung, sondern auch Voraussetzung ärztlichen Denkens und Handelns (Wieland 1975:viii), und von daher auch eine entscheidende Voraussetzung für die gewählten Behandlungsstrategien. Denn ohne Modell, ohne Vorstellungen über die Zusammenhänge zwischen Ursache - Symptom - Heilung können zumindest wissenschaftlich orientierte Ärzte und Ärztinnen kaum arbeiten.

Die Entwicklung von transgenen Tieren als Krankheitsmodelle setzt im Hinblick auf das Verständnis von Krankheiten und das ihnen zugrunde liegende Verursachungs- und Wirkungsmodell eine Entwicklungslinie fort, die sich in den letzten Jahren als so ge-

nannte „Molekulare Medizin“ herausgebildet hat<sup>71</sup>. Die molekulare Medizin geht davon aus, daß pathologische Prozesse in vielen Fällen auf Fehlfunktionen von Genen bzw. deren Produkte zurückzuführen sind. Als Behandlungskonzept wird angestrebt, die diesen Fehlfunktionen zugrunde liegenden genetischen Strukturen zu identifizieren und durch intakte Gene oder Genprodukte zu ersetzen. Dieses Konzept war im Fall der monogenen Erbkrankheiten in einer Reihe von Fällen auch erfolgreich: Beispielsweise kann der bei Bluterkranken fehlende Gerinnungsfaktor aus dem Blut Gesunder, oder heute aus gentechnisch manipulierten Zellen oder bald eventuell auch transgenen Tieren isoliert und damit ein guter therapeutischer Effekt erzielt werden.

Monogen bedingte Krankheiten, bei denen veränderte Genstrukturen und Krankheit mit hoher Wahrscheinlichkeit einander zugeordnet werden können, und ein relativ<sup>72</sup> eindeutiges Kausalverhältnis zwischen ihnen existiert, machen jedoch nur etwa zwei bis drei Prozent der gesamten Krankheitslast aus. Auch handelt es sich dabei in der Regel um sehr seltene Krankheiten. In Tieren gibt es in einigen Fällen entsprechende Gene, die vergleichbare Funktionen erfüllen. Nicht immer führt aber die Mutation eines solchen Gens mithilfe der Knockout-Technik zu einem vergleichbaren Krankheitsphänomen. Entweder besitzt das betreffende Tier unterschiedliche Gene, die die gleiche Funktion erfüllen können, oder andere Kompensationsmechanismen, die eine Krankheitsentwicklung verhindern. Nicht nur das Gen selber spielt also eine Rolle, sondern auch der genetische Hintergrund des betroffenen Tieres. Nur dort, wo keine solche strukturelle oder funktionelle Redundanz vorliegt, kommt es beim Ausfall eines Gens zur Krankheit.

Das „genetische Paradigma“ (Strohman 1993) der modernen molekularen Medizin erstreckt sich aber nicht nur auf die klassischen monogenen Erbkrankheiten, sondern auch auf weiter verbreitete Krankheiten wie Krebs, Allergien, Herz-Kreislaufkrankungen oder Demenzerkrankungen. Für den Zell- und Molekularbiologen Richard Strohmman behindert dieses leitende - genetische - Paradigma und die dominierende mechanistische Sichtweise das Verständnis von Zellen oder Organismen als Ganzes, und ist somit Ursache der grundlegenden Krise, die er im Verständnis von Krankheitsprozessen ausmacht. Strohmans Kritik an dieser Entwicklung setzt - wie bei anderen Autoren - bei der Konzeptualisierung der Ursache-Wirkungsverhältnisse zwischen Genen und Phänotypen an. Er geht davon aus, daß im Organismus drei verschiedene Modalitäten wirksam sind, durch die komplexe Phänotypen determiniert werden. Die erste ist monogenetisch (ein Gen - ein Phän, Beispiel: Sichelzellanämie oder Duchenne'sche Muskeldys-

---

<sup>71</sup> Vgl. hierzu u.a. Hohlfeld 1997.

<sup>72</sup> Selbst bei den klassischen Erbkrankheiten wie z.B. der Chorea Huntington ist die Erkrankungswahrscheinlichkeit bei Vorliegen einer pathologischen Genkonstellation kleiner als 100%.

trophie). Der zweite Ursache-Wirkungsmechanismus ist polygenetisch, was bedeutet, daß der Phänotyp von vielen verschiedenen Genen beeinflusst wird, und der dritte epigenetisch, bei dem viele Gene mit Umweltfaktoren interagieren. Der Begriff der Epigenese verweist auf eine Komplexitätsebene, die jenseits von unmittelbaren Gen-Gen-Interaktionen liegt. Grundsätzlich sind für ihn die Begriffe polygenetisch und epigenetisch synonym zu setzen, weil bei komplexen Interaktionen von Genen Umwelt- bzw. Umgebungsfaktoren praktisch immer auch eine Rolle spielen.

Für Strohman widersprechen die Ergebnisse vieler Forschungsfelder dem leitenden medizinischen Paradigma. Dazu gehören Ergebnisse der Populationsgenetik, der Epidemiologie, der Molekular- und Entwicklungsbiologie psychiatrischer Erkrankungen, sowie der Zell- und Molekularbiologie von Krankheitsprozessen. Für ihn weisen viele der in diesen Feldern erhobenen Befunde darauf hin, daß der überwiegende Anteil der heute wichtigsten Krankheiten wie Herz-Kreislaufkrankungen oder Krebs nicht genetisch, sondern epigenetisch bedingt sind, und von daher von einer genetischen Analyse auch keine wesentlichen Fortschritte bei der Aufklärung ihrer Pathogenese zu erwarten sind. Aufgrund der starken Dominanz dieser Vorstellungen befürchtet Strohman, daß neue Konzepte in der Gesundheitsversorgung nicht formuliert werden können, bevor die akademische Medizin eine grundsätzliche epistemische Neuorientierung vollzogen hat.

In Fortsetzung dieser Argumentation könnte behauptet werden, daß auch von der Entwicklung von transgenen Tiermodellen, unabhängig davon, ob Groß- oder Keintiere dafür verwendet werden, keine relevanten Erkenntnisse über menschliche Krankheiten zu gewinnen sind, und auch das Klonen somit nicht viel dazu beitragen kann. Diese Schlußfolgerung steht jedoch in deutlichem Kontrast zu der dominierenden genetischen Leitvorstellung in der biomedizinischen Forschung, derzufolge viele nicht-infektiösen Erkrankungen zumindest durch genetische Faktoren mitbedingt sind<sup>73</sup>, und die Analyse dieser Faktoren nicht nur zusätzlich, sondern entscheidende Aufschlüsse über das Krankheitsgeschehen vermitteln kann. Das nicht zuletzt im Rahmen des Humangenomprojektes erzeugte, zunehmende Wissen über die Komplexität der Wechselwirkungen zwischen genetischen und anderen Faktoren unterminiert jedoch zunehmend die Vorstellung, der Zusammenhang zwischen genetischen Strukturveränderungen und Krankheitsentwicklung könne bei komplexen Erkrankungen durch die Analyse einzelner Genwirkungen geklärt werden. Von daher ist in der Tat auch im Hinblick auf die Her-

---

<sup>73</sup> Die Humangenetiker Scholl und Schmidke gehen sogar von Folgendem aus: „Die meisten chronischen Erkrankungen, darunter angeborene Fehlbildungen, Herzerkrankungen und Krebs, werden genetisch codeterminiert und betreffen ca. 60 % der Bevölkerung in den Industrieländern.“ (Scholl, Schmidke 1995, 9)

stellung neuer, transgener Tiermodelle zu fragen, inwieweit die an ihnen gewonnenen Erkenntnisse die Situation im menschlichen Organismus tatsächlich widerspiegeln, auch wenn hier nicht in Abrede gestellt werden soll, daß die Untersuchung von spontanen oder induzierten Tiermutanten wichtige Einsichten in die pathologischen Prozesse im Tier vermitteln kann.

Auch wenn man Strohmaier nicht in allem zustimmen will, zeigt diese Diskussion jedoch ebenso wie die von Nijhout vorgebrachten Argumente, daß in der heutigen biomedizinischen Forschung konzeptionelle Alternativen zum dominierenden genetischen Paradigma von Wissenschaftlern artikuliert werden. Ob und wie weitgehend sie zu einer Veränderung des Methodenspektrums in der biomedizinischen Forschung oder gar dazu führen würden, daß das Klonen zwar als Methode zur Herstellung von Klonen, nicht aber als Methode zur Gewinnung relevanter Erkenntnisse angesehen wird, muß offen bleiben, denn der Forschungsprozeß wird zumindest ebenso sehr von methodischen, wie von konzeptionellen Innovationen vorangetrieben.

## 6 Fazit

Als Fazit ist festzuhalten, daß das kerntransferbasierte Klonen im Bereich der Grundlagenforschung Untersuchungsmöglichkeiten für alte, bisher nur schwer zu bearbeitende Fragestellungen eröffnet, und selber auch eine Fülle neuer Fragestellungen generiert. Insofern hat sich das Verfahren für die Forschung bislang bereits als außerordentlich fruchtbar erwiesen. Auch in der angewandten Forschung zeigt das Klonen neue Wege zur Herstellung transgener Tiere auf oder macht zumindest Abkürzungen möglich. Hans Spemanns Idee von einem „phantastischem Experiment“ ist nun mehrfach verwirklicht worden: an Schafen, Rindern und Mäusen. Da Menschen ebenfalls zu den Säugetieren gehören, dürfte es auch bei einer Klonierung von Menschen zumindest prinzipiell keine unüberwindbaren Hindernisse geben. Ob dies jedoch geschehen soll - diese Frage zu beantworten ist nicht Aufgabe dieses Gutachtens. Verwiesen sei allerdings auf Lee Silvers Buch „Das geklonte Paradies“ (Silver 1998), das eine Utopie entwirft, in der das Klonen gang und gäbe sein könnte. Der Autor geht davon aus, daß Menschen sich klonen lassen werden und daß Klonen mit Gentherapie und „Genverbesserung“ verbunden wird. Ferner entfaltet er das Szenario, daß es dadurch in einigen hundert Jahren zur Aufspaltung der menschlichen Art kommen kann: in gentechnisch verbesserte („genreiche“) und in „naturbelassene“ Menschen, die nicht das Geld haben, sich klonen und genetisch optimieren zu lassen. Die genetischen Unterschiede zwischen beiden Gruppen könnten so groß werden, daß sie keinen gemeinsamen Nachwuchs mehr zeugen können, de facto hätten sich dann aus der Spezies *Homo sapiens* zwei Arten entwickelt. In der Tat scheint dieses Szenario nach den erfolgreich geklonten Mäusen nicht mehr unmöglich. Mit Hilfe von Mäusen lassen sich, wie angesprochen, die Bedingungen des Klonens relativ rasch optimieren, und es ist zu erwarten, daß die Technik schnelle Fortschritte machen wird.

Freilich sind dies Zukunftsszenarien, derzeit geht es um andere Dinge. Das Klonen kann dazu beitragen, grundlegende Fragen zur Differenzierung und Totipotenz von Zellen zu beantworten. Auch kann es helfen, einige therapeutisch wirksame Proteine kostengünstig herzustellen. Ob sich dagegen eine risikofreie oder zumindest risikoarme Xenotransplantation verwirklichen läßt, ist derzeit mehr als fraglich. Die technischen Hürden zur Erzeugung vielfach transgener „idealer“ Organspenderschweine sind gewaltig, und selbst wenn es solche dereinst geben sollte, bleiben Probleme wie die chronische Abstoßung oder die Gefahr der Infektion mit Xenopathogenen und deren mögliche Ausbreitung auf andere Menschen ungelöst. Vielversprechender erscheint hier die Ge-

winnung von autologem Ersatzgewebe. Insbesondere der langfristig denkbare Weg einer künstlich gesteuerten Dedifferenzierung und Neudifferenzierung patienteneigener Zellen – ohne den Umweg über einen Embryo – würde viele Vorteile bieten, sowohl aus medizinischer als auch aus ethischer Sicht.

Gesichert ist ebenfalls noch nicht ob es gelingt, bessere Untersuchungsmodelle für menschliche Krankheiten in Nutztieren zu schaffen. Entsprechende Entwicklungen haben gerade erst begonnen. Bislange ist noch kein Krankheitsmodell mit Hilfe des kerntransferbasierten Klonens erzeugt worden, und noch kein aus geklonten Tieren gewonnenes Medikament befindet sich in der klinischen Prüfung. Bis zur Gewinnung von Transplantationsgewebe, ob autolog oder von Tieren, ist es noch ein langer Weg.

Eine wesentliche Problem beim kerntransferbasierten Klonen sind die offensichtlich sehr häufig auftretenden „Reprogrammierungsfehler“, die zu den vielen abnormen und frühzeitig absterbenden Embryonen führen und auch noch nach der Geburt eines geklonten Tieres sich auf dieses auswirken können. Als Ursache dafür kommen wohl in erster Linie epigenetisch bedingte Veränderungen der Genexpression in Frage, und es ist zu untersuchen, wie häufig und unter welchen Bedingungen solche epigenetischen Veränderungen auftreten und welchen Einfluß sie auf die weitere Entwicklung eines erfolgreich geklonten Tieres haben können. Über eventuelle Spätfolgen der Prozedur bei den betroffenen Tieren ist so gut wie nichts bekannt, doch sind sie durchaus wahrscheinlich. Wie Wilmut sagte: „They die all the time“, und wie beschrieben, sterben viele auch noch kurz nach der Geburt, daher ist nicht auszuschließen, daß selbst diejenigen Tiere, welche die ersten Wochen, Monate oder Jahre nach der Geburt überstehen, irgendwann doch noch einen Schaden entwickeln – dann nämlich, wenn ein Gen eingeschaltet werden soll, das erst im Erwachsenenleben gebraucht wird, und dies aufgrund einer kerntransferbedingten fehlerhaften Reprogrammierung nicht gelingt.

Epigenetische Effekte könnten zudem angestrebte Nutzenanwendungen des Klonens konterkarieren. Sie verändern zwar nicht den Inhalt, wohl aber die Ablesbarkeit von Genen. Wenn etwa das Transgen für ein zu gewinnendes therapeutisches Protein wegen epigenetischer Effekte nicht abgelesen wird, wäre das betreffende Tier für das Gen-Pharming nicht zu gebrauchen. Bei Polly scheint das zwar nicht der Fall, und es wäre auch ein enormer Zufall, wenn ausgerechnet das Transgen betroffen wäre, doch denkbar sind solche Fälle durchaus. Von größerer Bedeutung könnten epigenetische Effekte bei Modelltieren für menschliche Krankheiten sein. Wenn in einem geklonten Tier, an dem eine menschliche Krankheit analysiert werden soll, – etwa einem Mukoviszidose-Schaf – epigenetisch bedingte Veränderungen der Genexpression auftreten, könnten zusätzliche Pathologien entstehen, die mit der zu untersuchenden Krankheit nichts zu tun haben, jedoch die Interpretation der Ergebnisse erschweren würden. Dabei bräuchte nicht

einmal das eingebrachte „Krankheitsgen“ betroffen sein; jedes beliebige endogene Gen, das infolge epigenetischer Expressionsveränderungen „Störsymptome“ hervorruft, würde den Wert des Krankheitsmodells mindern. Die Wahrscheinlichkeit dafür dürfte um einiges höher liegen als für die Expressionsbeeinträchtigung eines Transgens zum Gen-Pharming.

Insgesamt erscheint uns der potentielle Nutzen des kerntransferbasierten Klonens in der Grundlagenforschung aus der Sicht dominierender Konzepte als hoch. Allerdings ist es praktisch nicht möglich, diesen Nutzen zu quantifizieren, und ihn nicht nur gegen die konkreten, technikbezogenen Risiken abzuwägen, sondern auch gegen mögliche langfristige Probleme, und mehr noch gegen die moralischen Risiken, die die Entwicklung als Ganze für die Gesellschaft mit sich bringen könnte. Diese Situation erfordert in jedem Einzelfall eine separate Abwägung, ob der erwartete Nutzen Aufwand und Risiken rechtfertigt, und wie sie im einzelnen verteilt sind.

Beim Gen-Pharming, dem wohl am weitesten vorangeschrittenen Anwendungsfeld, erscheint der Nutzen dann groß, wenn es sich dabei um Proteine handelt, die anders als durch transgene Tiere kaum herzustellen wären. Er läßt sich allerdings nur dann verifizieren, wenn die möglichen, kurz und langfristigen Risiken für die Tiere und die Umwelt konkreter benannt und letztlich kontrolliert werden können. Von daher besteht dann, wenn das Klonen von Tieren in der Gesellschaft grundsätzlich befürwortet wird, dringend die Notwendigkeit diese Risiken genauer zu erforschen, zu beschreiben und Möglichkeiten zu ihrer Vermeidung zu entwickeln. An Mäusen ließe sich das nunmehr relativ rasch und in praktikabler Weise durchführen.

## Anhang 1: Methodisches Vorgehen

Die Ergebnisse dieses Gutachtens basieren auf folgenden Vorgehensweisen:

- Kontinuierlich verfolgt wurden Artikel und Kommentare zum Thema in den Fachzeitschriften *Nature* und *Science*, ferner in der *ZEIT*, zudem auf den Internet-Seiten der genannten Zeitschriften ([www.nature.com](http://www.nature.com), [www.sciencemag.org](http://www.sciencemag.org), [www.zeit.de](http://www.zeit.de)). Des Weiteren wurden in regelmäßigen Abständen die Internet-Seiten der Zeitschrift *New Scientist* ([www.newscientist.com](http://www.newscientist.com)), des Deutschlandradio-Newsletters ([www.dlf.de](http://www.dlf.de)) und der Zeitschrift *Spektrum der Wissenschaft* ([www.spektrum.de](http://www.spektrum.de)) abgerufen. Zusätzlich wurde der Spektrum-Ticker-Dienst genutzt, ein kostenpflichtiger Internet-Nachrichtendienst mit einstellbarem Suchprofil und täglichen Meldungen aus der Wissenschaft per E-mail.
- Wertvolle Dienste als Ausgangspunkt für weitere Recherchen leisteten die Bücher „Das geklonte Leben“ von der für die *New York Times* schreibenden renommierten Wissenschaftsjournalistin Gina Kolata (1997a) und „Das geklonte Paradies“ von dem an der Princeton-Universität beschäftigten Molekularbiologen Lee M. Silver (1998).
- Mit Hilfe von Suchmaschinen, vornehmlich Altavista ([www.altavista.telia.com](http://www.altavista.telia.com)) und Metacrawler ([www.metacrawler.com](http://www.metacrawler.com)), letzteres eine Meta-Suchmaschine, die eine Reihe weiterer Suchmaschinen aktiviert, wurde zudem das gesamte Internet in regelmäßigen Abständen nach Materialien zum Thema durchstöbert. Dabei kam eine Menge Unsinn zutage, jedoch auch allerhand Brauchbares.
- Genutzt wurde überdies der Genios Websearch-Dienst ([www.genios.de](http://www.genios.de)), eine kostenpflichtige Datenbank, in der Volltexte einer Vielzahl deutschsprachiger Tageszeitungen, Wochen- und Monatszeitschriften sowie Meldungen von Presseagenturen hinterlegt und nach Suchstichworten abrufbar sind.
- Am hilfreichsten war die Medline-Datenbank der amerikanischen National Library of Medicine ([www.nlm.nih.gov](http://www.nlm.nih.gov)), in der praktisch sämtliche medizinisch relevanten Fachartikel der Welt in Form von Zitaten und meist auch mit einer Zusammenfassung gespeichert sind. In Medline läßt sich mit Suchstichwörtern (zum Beispiel

„nuclear transfer“, „cloning of mammals“, „disease models“, „transgenic animals“, „xenotransplantation“ etc.) und sinnvollen Verknüpfungen daraus oder nach Autornamen (Wilmut, Willadsen, Stice, First, Robl, Illmensee, Solter etc.) recherchieren, beides wurde gemacht, wobei für die Recherche nach Autornamen besonders das erwähnte Buch von Gina Kolata sehr hilfreich war. Wenn relevante Artikel gefunden wurden und die in der Medline-Datenbank vorhandene Zusammenfassung nicht ausreichend erschien, wurde der komplette Artikel in örtlichen Fachbibliotheken besorgt oder über Ferndienste angefordert.

- Zudem wurden deutsche Pharmafirmen beziehungsweise deutsche Töchter multinationaler Pharmakonzerne per Fax um Stellungnahmen zum Thema gebeten. Der Rücklauf war freilich spärlich, meist sehr allgemein gehalten und erbrachte kaum neue Informationen. Die Industrie ist also zurückhaltend bis mißtrauisch solchen Anfragen gegenüber. Am hilfreichsten waren die Informationen von Boehringer Ingelheim, was wohl daran liegt, daß einer der Autoren dieses Gutachtens (S. H.) früher in den Genuß eines Stipendiums des Firmenfonds kam und von daher ein gewisses Vertrauensverhältnis bestand. Viele Firmen verlangten ausführliche Legitimation, was als Hinweis auf die gesellschaftliche Sensibilität des Themas gedeutet wurde.
- Zur Vertiefung, Bestätigung und/oder Richtigstellung der gewonnenen Erkenntnisse wurden Interviews mit Experten durchgeführt, und zwar persönlich mit Ian Wilmut (Roslin Institute, Roslin bei Edinburgh, Schottland), dem „Schöpfer“ von Dolly, ferner mit Alan Colman, dem Forschungsleiter von PPL Therapeutics (ebenfalls in Roslin bei Edinburgh) und telefonisch mit Wolf Reik vom Babraham Institute in Cambridge, England. (Reik ist Experte für Imprinting und epigenetische Effekte.) Alle Interviews wurden mit Einverständnis der Interviewpartner auf Band aufgezeichnet, die Bänder stehen auf Nachfrage zur Verfügung.
- Des weiteren wurden informelle Gespräche mit Angelika Schnieke und Alexander Kind (beide PPL Therapeutics, Roslin, Schottland, und sowohl an Dolly als auch an Polly wesentlich beteiligt) geführt sowie mit Katrin Mooslehner (Babraham Institute, Cambridge, England), die an der Erzeugung von Knockout-Mäusen mit dem ES-Zell-Verfahren arbeitet. Über diese Gespräche liegen allerdings keine Aufzeichnungen vor. Ferner wurde zur Klärung spezieller Fragen mit Davor Solter (Max-Planck-Institut für Immunbiologie, Freiburg) und mit Ann Harris (Universität von Oxford, England) per e-mail Kontakt aufgenommen.

## Anhang 2: Quellen

- Akhter S. A., Skaer C. A., Kypson A. P., McDonald P. H., Peppel K. C., Glower D. D., Lefkowitz R. J., Koch W. J. (1997). Restoration of b-adrenergic signaling in failing cardiac ventricular myocytes via adenoviral-mediated gene transfer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 12100-05.
- Albrecht J. (1998). Ist Dolly eine Ente? *DIE ZEIT*, 15. Januar 1998.
- Albrecht J., Schuh H., Solter D. (1998). „An Dolly gibt es keinen Zweifel“. *DIE ZEIT*, 29. Januar 1998.
- Alexandre G. P., Squifflet J. P., De Bruyere M., Latinne D., Reding R., Gianello P., Carlier M., Pirson Y. (1987). Present experience in a series of 26 ABO-incompatible living donor renal allografts. *Transplant. Proc.* 19, 4538-42.
- Allan J. (1997). Silk purse or sow's ear. *Nat. Med.* 3, 275-76.
- Allan J. S. (1996). Xenotransplantation at a crossroads: prevention versus progress. *Nat. Med.* 2, 18-21.
- Allen N. D., Norris M. L., Surani M. A. (1990). Epigenetic control of transgene expression and imprinting by genotype-specific modifiers. *Cell* 61, 583-61.
- Altner, G. (1998). *Leben in der Hand des Menschen. Die Brisanz des biotechnischen Fortschritts.* Darmstadt (Primus).
- Ashworth D., Bishop M., Campbell K., Colman A., Kind A., Schnieke A., Blott S., Griffin H., Haley C., McWhir J., Wilmut I. (1998). DNA microsatellite analysis of Dolly. *Nature* 394, 329.
- Auchincloss H. (1995). Why is cell-mediated xenograft rejection so strong? *Xenotransplantation* 3, 19.
- Bach F. H. (1997). Genetic engineering as an approach to xenotransplantation. *World J. Surg.* 21, 913-16.
- Bach F. H., Turman M. A., Verceletti G. M., Platt J. L., Dalmaso A. P. (1991). Accomodation: a working paradigm for progressing toward clinical discordant xenografting. *Transplant. Proc.* 23, 205-07.
- Bach F. H., et al. (1994). Endothelial cell activation and thromboregulation during xenograft rejection. *Immunol. Rev.* 141, 5-30.
- Bach F. H., Robson S. C., Winkler H., Ferran C., Stuhlmeier K. M., Wrighton C. J., Hancock W. W. (1995). Barriers to xenotransplantation. *Nat. Med.* 1, 869-73.
- Bach F. H., Winkler H., Ferran C., Hancock W. W., Robson S. (1996). Delayed xenograft rejection. *Immunol. Today* 17, 379-84.
- Bach F. H., Ferran C., Hechenleitner P., Mark W., Koyamada N., Miyatake T., Winkler H., Badrichani A., Candinas D., Hancock W. W. (1997a). Accomodation of vascularized xenografts: expression of „protective genes“ by donor endothelial cells in a host Th2 cytokine environment. *Nat. Med.* 3, 196-204.
- Bach F. H., Ferran C., Soares M., Wrighton C. J., Anrather J., Winkler H., Robson S. C., Hancock W. W. (1997b). Modification of vascular responses in xenotransplantation: inflammation and apoptosis. *Nat. Med.* 3, 944-48.
- Baeuerle P. A., Henkel T. (1994). Function and activation of NF-kB transcription factor. *Annu. Rev. Immunol.* 12, 141-79.
- Baron M. H., Maniatis T. (1986). Rapid reprogramming of globin gene expression in transient heterokaryons. *Cell* 46, 591-602.
- Barr M. L. (1959). Sex chromatin and phenotype in man. *Science* 130, 679-85.
- Bedell M. A., Jenkins N. A., Copeland N. G. (1997a). Mouse models of human disease. Part I: techniques and resources for genetic analysis in mice. *Genes Dev.* 11, 1-10.
- Bedell M. A., Largaespada D. A., Jenkins N. A., Copeland N. G. (1997b). Mouse models of human disease. Part II: recent progress and future directions. *Genes Dev.* 11, 11-43.
- Beier, H. M. (1996). Embryonale Frühentwicklung: Die Totipotenz menschlicher Blastomeren ist zeitlich eng begrenzt. *Gynaecology*, 17, 233-242.
- Bergelson J. M., Mohanty J. G., Crowell R. L., St. John N. F., Lublin D. M., Finberg R. W. (1995). Coxsackievirus B3 adapted to growth in RD cells binds to decay-accelerating factor (CD55). *J. Virol.* 69, 1903-06.
- Blakely M. L., Van der Werf W. J., Berndt M. C., Dalmaso A. P., Bach F. H., Hancock W. W. (1994). Activation of intragraft endothelial and mononuclear cells during discordant xenograft rejection. *Transplantation* 58, 1059-66.

- Blasco M. A., Lee H. W., Hande M. P., Samper E., Lansdorp P. M., DePinho R. A., Greider C. W. (1997). Telomere shortening and tumor formation by mouse cells lacking telomerase RNA. *Cell* 91, 25-34.
- Blau H. M., Pavlath G. K., Hardeman E. C., Chiu C. P., Silberstein L., Webster S. G., Miller S. C., Webster C. (1985). Plasticity of the differentiated state. *Science* 230, 758-66.
- Bodnar A. G., Ouellette M., Frolkis M., Holt S. E., Chiu C. P., Morin G. B., Harley C. B., Shay J. W., Lichtsteiner S., Wright W. E. (1998). Extension of life span by introduction of telomerase into normal human cells. *Science* 279, 349-52.
- Bondioli K. R., Westhusin M. E., Looney C. R. (1990). Production of identical bovine offspring by nuclear transfer. *Theriogenology* 33, 165-74.
- Braude P., Bolton V., Moore S. (1988). Human gene expression first occurs between the four- and eight-cell stages of preimplantation development. *Nature* 332, 459-61.
- Bravery C. A., Rose M. L., Yacoub M. H. (1994). Proliferative responses of highly purified human CD4+ T cells to porcine endothelial cells. *Transplant. Proc.* 26, 1157-58.
- Breslow J. L. (1996). Mouse models of atherosclerosis. *Science* 272, 685-88.
- Briggs R., King T. J. (1952). Transplantation of living nuclei from blastula cells into enucleated frogs' eggs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 38, 455-63.
- Buiakova O. I., Baker H., Scott J. W., Farbman A., Kream R., Grillo M., Franzen L., Richman M., Davis L. M., Abbondanzo S., Stewart C. L., Margolis F. L. (1996). Olfactory marker protein (OMP) gene deletion causes altered physiological activity of olfactory sensory neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 9858-63.
- Butler D. (1998a). Dolly researcher plans further experiments after challenges. *Nature* 391, 825-26.
- Butler D. (1998b). French clone provides support for Dolly. *Nature* 392, 113.
- Byrne G. W., McCurry K. R., Martin M. J., McClellan S. M., Platt J. L., Logan J. S. (1997). Transgenic pigs expressing human CD59 and decay-accelerating factor produce an intrinsic barrier to complement-mediated damage. *Transplantation* 63, 149-55.
- Calne R. Y. (1969). Induction of immunological tolerance by porcine liver allografts. *Nature* 223, 472-76.
- Calne R. Y. (1970). Organ transplantation between widely disparate species. *Transplant. Proc.* 2, 550.
- Campbell K. H. S. (1998). Look on the bright side of cloning. *Nat. Med.* 4, 557-58.
- Campbell K. H. S., Ritchie W. A., Wilmut I. (1993). Nuclear-cytoplasmic interactions during the first cell cycle of nuclear transfer reconstructed bovine embryos: implications for deoxyribonucleic acid replication and development. *Biol. Reprod.* 49, 933-42.
- Campbell K. H. S., McWhir J., Ritchie W. A., Wilmut I. (1996a). Sheep cloned by nuclear transfer from a cultured cell line. *Nature* 380, 64-66.
- Campbell K. H. S., McWhir J., Ritchie W. A., Wilmut I. (1996b). Implications of cloning. *Nature* 380, 383.
- Capecchi M. R. (1989). The new mouse genetics: altering the genome by gene targeting. *Trends Genet.* 5, 70-76.
- Capecchi M. R. (1994). Gezielter Austausch von Genen. *Spektrum der Wissenschaft* 5/94, 44-52.
- Cassidy S. B., Schwartz S. (1998). Prader-Willi and Angelman syndromes. Disorders of genomic imprinting. *Medicine* 77, 140-51.
- Chapman L. E., Fishman J. A. (1997). Xenotransplantation and infectious diseases. In: Cooper D. K. C., Kemp E., Platt J. L., White D. J. G. (Hrsg.): Xenotransplantation: the transplantation of organs and tissues between species (2. Aufl., S. 736-48). Berlin, Heidelberg, New York (Springer).
- Chapman L. E., Folks T. M., Salomon D. R., Patterson A. P., Eggerman T. E., Noguchi P. D. (1995). Xenotransplantation and xenogeneic infections. *N. Engl. J. Med.* 333, 1498-1501.
- Chapman L. E., Khabbaz R. F. (1994). Etiology and epidemiology of the Four Corners hantavirus outbreak. *Infect. Agents Dis.* 3, 234-44.
- Chastant S., Christians E., Campion E., Renard J.-P. (1996). Quantitative control of gene expression by nucleocytoplasmic interactions in early mouse embryos: consequence for reprogramming by nuclear transfer. *Mol. Reprod. Dev.* 44, 423-32.
- Cheong H.-T., Takahashi Y., Kanagawa H. (1993). Birth of mice after transplantation of early cell-cycle-stage embryonic nuclei into enucleated oocytes. *Biol. Reprod.* 48, 958-63.
- Cibelli J. B., Stice S. L., Golueke P. J., Kane J. J., Jerry J., Blackwell C., Ponce de León F. A., Robl J. M. (1998). Transgenic bovine chimeric offspring produced from somatic cell-derived stem-like cells. *Nat. Biotechnol.* 16, 642-46.
- Clarke H. J. (1992). Nuclear and chromatin composition of mammalian gametes and early embryos. *Biochem. Cell. Biol.* 70, 856-66.

- Clarke H. J., Oblin C., Bustin M. (1992). Developmental regulation of chromatin composition during mouse embryogenesis: somatic histon H1 is first detectable at the 4-cell stage. *Development* 115, 791-99.
- Clarke H. J., McLay D. W., Mohamed O. A. (1998). Linker histone transitions during mammalian oogenesis and embryogenesis. *Dev. Genet.* 22, 17-30.
- Clayton-Smith J., Read A. P., Donnai D. (1992). Monozygotic twinning and Wiedemann-Beckwith syndrome. *Am. J. Med. Genet.* 42, 633-37.
- Coffin J. M. (1985). Endogenous retroviruses. In: Weiss R. A., Varmus H. E., Teich N. M., Coffin J. M. (Hrsg.): RNA Tumor Viruses. Cold Spring Harbor, New York (Cold Spring Harbor Laboratory Press).
- Cohen P. (1998). Organs without donors. *New Scientist*, 11. Juli 1998.
- Cohen P. (1998a). Le clone est morte. *New Scientist*, 18. April 1998.
- Collas P., Barnes F. L. (1994). Nuclear transplantation by microinjection of inner cell mass and granulosa cell nuclei. *Mol. Reprod. Dev.* 38, 264-67.
- Collas P., Balise J. B., Robl J. M. (1992a). Influence of cell cycle stage of the donor nucleus on development of nuclear transplant embryos. *Biol. Reprod.* 46, 492-500.
- Collas P., Pinto-Correia C., Ponce de León F. A., Robl J. M. (1992b). Effect of donor cell cycle stage on chromatin and spindle morphology in nuclear transplant rabbit embryos. *Biol. Reprod.* 46, 501-11.
- Collas P., Robl J. M. (1991). Relationship between nuclear remodeling and development in nuclear transplant rabbit embryos. *Biol. Reprod.* 45, 455-65.
- Collins B. H., Cotterell A. H., McCurry K. R., Alvarado C. G., Magee J. C., Parker W., Platt J. L. (1995). Cardiac xenografts between primate species provide evidence for the importance of the  $\alpha$ -galactosyl determinant in hyperacute rejection. *J. Immunol.* 154, 5500-10.
- Cooper D. K. C., Ye Y., Rolf L. L. jr., Zuhdi N. (1991). The pig as potential organ donor for man. In: Cooper D. K. C., Kemp E., Reemtsma K., White D. J. G. (Hrsg.): Xenotransplantation: the transplantation of organs and tissues between species (1. Aufl., S. 481-500). Berlin, Heidelberg, New York (Springer).
- Crabbe J. C., Belknap J. K., Buck K. J. (1994). Genetic animal models of alcohol and drug abuse. *Science* 264, 1715-23.
- Crnic L. S. (1996). Transgenic and null mutant animals for psychosomatic research. *Psychosom. Med.* 58, 622-32.
- Dalmaso A. P., Verceletti G. M., Platt J. L., Bach F. H. (1991). Inhibition of complement-mediated endothelial cell cytotoxicity by decay-accelerating factor: potential for prevention of xenograft hyperacute rejection. *Transplantation* 52, 530.
- Dickman S. (1997). Menschen nach Maß? Über die Laborzucht von Embryozellen. *DIE ZEIT*, 25. Juli 1997.
- Dimitrov S., Wolffe A. P. (1996). Remodeling somatic nuclei in *Xenopus laevis* egg extracts: molecular mechanisms for the selective release of histones H1 and H1(0) from chromatin and the acquisition of transcriptional competence. *EMBO J.* 15, 5897-5906.
- Doenecke D., Drabent B., Bode C., Bramlage B., Franke K., Gavenis K., Kosciessa U., Witt O. (1997). Histone gene expression and chromatin structure during spermatogenesis. *Adv. Exp. Med. Biol.* 424, 37-38.
- Doerig R. E., Marciel A., Chopra A., Richardson C. D. (1993). The human CD46 molecule is a receptor for measles virus. *Cell* 75, 295-305.
- Doyle P., Beral V., Maconochie N. (1992). Preterm delivery, low birthweight and small-for-gestational-age in liveborn singleton babies resulting from in-vitro fertilization. *Hum. Reprod.* 7, 425-28.
- Dulouost E., Toyama K., Busnel M. C., Moutier R., Carlier M., Marchaland C., Ducot B., Roubertoux P., Auroux M. (1995). Long-term effects of embryo freezing in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 589-93.
- Eisenhauer K. M., Gerstein R. M., Chiu C. P., Conti M., Hsueh A. J. (1997). Telomerase activity in female and male rat germ cells undergoing meiosis and in early embryos. *Biol. Reprod.* 56, 1120-25.
- Engler P., Haasch D., Pinkert C. A., Doglio L., Glymour M., Brinster R., Storb U. (1991). A strain-specific modifier on mouse chromosome 4 controls the methylation of independent transgene loci. *Cell* 65, 939-47.
- Eurotransplant, [www.transplant.org/eur/WWW/FactFigures/index.html](http://www.transplant.org/eur/WWW/FactFigures/index.html).
- Fengler P. L. (1997). Gentherapie: nicht-virale Strategien. *Spektrum der Wissenschaft* 11/97, 50-55.
- First N. L., Prather R. S. (1991). Production of embryos by oocyte cytoplasm-blastomere fusion in domestic animals. *J. Reprod. Fert., Suppl.* 43, 245-54.
- First N. L., Thomson J. (1998). From cows stem therapies? *Nat. Biotechnol.* 16, 620.

- Fishman J. A. (1994). Miniature swine as organ donors for man: strategies for prevention of xenotransplant-associated infections. *Xenotransplantation* 1, 47-57.
- Fodor W. L., Williams B. L., Matis L. A., Madri J. A., Rollins S. A., Knight J. W., Velander W., Squinto S. P. (1994). Expression of a functional human complement inhibitor in a transgenic pig as a model for the prevention of xenogeneic hyperacute organ rejection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 11153-57.
- Frazier M. E. (1985). Evidence for retrovirus in miniature swine with radiation-induced leukemia or metaplasia. *Arch. Virol.* 83, 83-97.
- Friedmann T. (1997). Gentherapie: Viren als Vehikel. *Spektrum der Wissenschaft* 10/97, 50-56.
- Fulka J., First N. L., Moor R. M. (1996). Nuclear transplantation in mammals: remodelling of transplanted nuclei under the influence of maturation promoting factor. *BioEssays* 18, 835-40.
- Galili U., Clark M. R., Shohet S. B., Buehler J., Macher B. A. (1987). Evolutionary relationship between the natural anti-gal antibody and the gal-alpha-1,3-epitope in primates. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84, 1369-73.
- Gianello P. (1997). Is there a place for gene therapy in organ transplantation? *Ann. Chir.* 51, 593-604.
- Good A. H., Cooper D. K., Malcolm A. J., Ippolito R. M., Koren E., Neethling F. A., Ye Y., Zuhdi N., Lamontagne L. R. (1992). Identification of carbohydrate structures that bind human anti-porcine antibodies: implications for discordant xenografting in humans. *Transplant. Proc.* 24, 559-62.
- Goodwin, B.C. (1994). How the Leopard changed its spots. The evolution of complexity. London (Weidenfeld & Nicholson).
- Gray, R. (1992). Death of the gene. Developmental systems strike back, in: Griffith, P. (ed.) *Trees of life*, Dordrecht, S. 165-209.
- Gritsch H. A., Glaser R. M., Emery D. W., Lee L. A., Smith C. V., Sablinski T., Arn J. S., Sachs D. H., Sykes M. (1994). The importance of nonimmune factors in reconstitution by discordant xenogeneic hematopoietic cells. *Transplantation* 57, 906-17.
- Gurdon J. B. (1962). Adult frogs derived from the nuclei of single somatic cells. *Dev. Biol.* 4, 256-73.
- Gurdon J. B. (1986). Nuclear transplantation in eggs and oocytes. *J. Cell Sci. Suppl.* 4, 287-318.
- Gustafsson B. E. (1984). The germ-free animal: its potential and its problems. In: Coates M. E., Gustafsson B. E. (Hrsg.): *The germ-free animal in biomedical research*. London (Laboratory Animals Ltd.).
- Hammer C. (1993). Medical scientists must vigorously develop xenografting as a viable clinical alternative. *J. Heart Lung Transplant.* 12(1)Part 2, Suppl., S360-S364.
- Hammer C. (1994). Fundamental problems of xenotransplantation. *Pathol. Biol.* 42, 203-07.
- Hammer C. (1995). Xenotransplantation. Kann sie halten, was sie verspricht? *Deutsches Ärzteblatt* 92(3), B-99-103.
- Harrington J. J., Van Bokkelen G., Mays R. W., Gustashaw K., Willard H. F. (1997). Formation of de novo centromeres and construction of first-generation human artificial microchromosomes. *Nat. Genet.* 15, 345-55.
- Harris A. (1997). Towards an ovine model of cystic fibrosis. *Hum. Mol. Genet.* 6, 2191-93.
- Hasse A., Schulz W. A. (1994). Enhancement of reporter gene de novo methylation by DNA fragments from the alpha-fetoprotein control region. *J. Biol. Chem.* 269, 1821-26.
- Hävry P. (1996). Pathophysiology of chronic rejection. *Transplant. Proc.* 28(6) Suppl. 1, 7-10.
- Hayashi S. (1997). Xenotransplantation with special reference to genetic engineering. *Microbiol. Immunol.* 41, 751-56.
- Ho, M.-W. (1988). „On not holding nature still: Evolution by process, not by consequence, in: Ho, M.-W. /Fox, S.W. (eds.) *Evolutionary Processes and Metaphors*. Chichester etc., S. 17-33.
- Hohlfeld, R. (1997). Wissenschaftliche Leitvorstellungen für die Medizin. In: Kaiser, G., Rosenfeld, E., Wetzel-Vandai, K. (Hrg.): *Bio- und Gentechnologie. Anwendungsfelder und Perspektiven*. Frankfurt (Campus), S. 45-59.
- Holliday R. (1987). The inheritance of epigenetic defects. *Science* 238, 163-70.
- Holmes G. P., Chapman L. E., Stewart J. A., Straus S. E., Hilliard J. K., Davenport D. S. (1995). Guidelines for the prevention and treatment of B-virus infections in exposed persons. The B virus Working Group. *Clin. Infect. Dis.* 20, 421-39.
- Holzknicht Z. E., Platt J. L. (1995). Identification of porcine endothelial cell membrane antigens recognized by human xenoreactive antibodies. *J. Immunol.* 154, 4565-75.
- Ildstad S. T. (1996). Xenotransplantation for AIDS. *Lancet* 347, 761.
- Illmensee K., Hoppe P. C. (1981). Nuclear transplantation in *Mus musculus*: developmental potential of nuclei from preimplantation embryos. *Cell* 23, 9-18.

- Inverardi L., Samaja M., Marelli F., Bender J. R., Pardi R. (1992). Cellular early immune recognition of xenogeneic vascular endothelium. *Transplant. Proc.* 24, 459-61.
- Itescu S., et al. (1997) Lysis of pig endothelium by IL-2 activated human natural killer cells is inhibited by swine and human major histocompatibility complex class I gene products. *Fourth International Congress on Xenotransplantation* (O56).
- Jähner D., Jaenisch R. (1985). Retrovirus-induced de novo methylation of flanking host sequences correlates with gene inactivity. *Nature* 315, 594-97.
- Jenkins N. A., Copeland N. G. (1985). High frequency germline acquisition of ecotropic MuLV proviruses in SWR/J-RF/J hybrid mice. *Cell* 43, 811-19.
- Kanka J., Hozak P., Heyman Y., Chesne P., Degrolard J., Renard J. P., Flechon J. E. (1996). Transcriptional activity and nucleolar ultrastructure of embryonic rabbit nuclei after transplantation to enucleated oocytes. *Mol. Reprod. Dev.* 43, 135-44.
- Kappel C. A., Bieberich C. J., Jay G. (1994). Evolving concepts in molecular pathology. *FASEB J.* 8, 583-92.
- Karatzas C. N., Turner J. D. (1997). Toward altering milk composition by genetic manipulation: current status and challenges. *J. Dairy Sci.* 80, 2225-32.
- Katz R. A., Skalka A. M. (1990). Generation of diversity in retroviruses. *Annu. Rev. Genet.* 24, 409-45.
- Keefer C. L., Stice S. L., Matthews D. L. (1994). Bovine inner cell mass cells as donor nuclei in the production of nuclear transfer embryos and calves. *Biol. Reprod.* 50, 935-39.
- Klein C. B., Costa M. (1997). DNA methylation, heterochromatin and epigenetic carcinogens. *Mutat. Res.* 386, 163-80.
- Kobayashi T., Kemp E., Cooper D. K. C. (1997). Prolongation of discordant xenograft survival by cobra venom factor. In: Cooper D. K. C., Kemp E., Platt J. L., White D. J. G. (Hrsg.): *Xenotransplantation: the transplantation of organs and tissues between species* (2. Aufl., S. 425-36). Berlin, Heidelberg, New York (Springer).
- Kolata G. (1997a). Das geklonte Leben. München und Zürich (Diana Verlag).
- Kolata G. (1997b). Lab yields lamb with human gene. *The New York Times*, 25. Juli 1997.
- Kono T. (1997). Nuclear transfer and reprogramming. *Rev. Reprod.* 2, 74-80.
- Kollek, R. (1986). Sicherheitsaspekte der experimentellen Arbeit mit Retroviren. In: Die ungeklärten Gefahrenpotentiale der Gentechnologie. Hrg: Kollek, Tappeser, Altner. München (Schweitzer Verlag), S. 49-69.
- Kollek, R. (unter Mitarbeit von K. Held) (1997). Voraussetzungen und Implikationen der Präimplantationsdiagnostik. Gutachten im Auftrag der Freien und Hansestadt Hamburg, vertreten durch die Behörde für Arbeit, Gesundheit und Soziales. Dezember 1997, 117 Seiten.
- Kollek, R. (1998a). Klonen ist Klonen - oder nicht? Warum der erste Menschenklon nicht die Gestalt ist, an der sich die Urteilsfindung orientieren muß. In: Ach, J.S.; Brudermüller, G.; Runtenberg (Hrg.): *Hello Dolly? Klonierung von Menschen und Tieren*. Frankfurt (Edition Suhrkamp), S. 21-47 (im Druck).
- Kollek, R. (1998b). Präimplantationsdiagnostik. Embryonenselektion, weibliche Autonomie und Recht. Tübingen (Francke) (Erscheint Spätherbst 1998).
- Kono T., Kwon O. Y., Watanabe T., Nakahara T. (1992). Development of mouse enucleated oocytes receiving a nucleus from different stages of the second cell cycle. *J. Reprod. Fertil.* 94, 481-87.
- Koren E., Milotic F., Neethling F. A., Cooper D. K. C. (1997). Neutralization of the cytotoxic effect of anti-alpha-gal antibodies with monoclonal anti-idiotypic antibodies. In: Cooper D. K. C., Kemp E., Platt J. L., White D. J. G. (Hrsg.): *Xenotransplantation: the transplantation of organs and tissues between species* (2. Aufl., S. 377-86). Berlin, Heidelberg, New York (Springer).
- Kroshus T. J., Rollins S. A., Dalmasso A. P., Elliott E. A., Matis L. A., Squinto S. P., Bolman R. M. (1995). Complement inhibition with an anti-CD5 monoclonal antibody prevents acute cardiac tissue injury in an ex vivo model of pig-to-human xenotransplantation. *Transplantation* 60, 1194-202.
- Kypson A. P., Peppel K., Akhter S. A., Lilly R. E., Glower D. D., Lefkowitz R. J., Koch W. J. (1998). Ex vivo adenovirus-mediated gene transfer to the adult rat heart. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 115, 623-30.
- Laing P. (1996). *Sandoz: The unrecognized potential of xenotransplantation*. London.
- Lalande M. (1996). Parental imprinting and human disease. *Annu. Rev. Genet.* 30, 173-95.
- Lamb B. T., Gearhart J. D. (1995). YAC transgenics and the study of genetics and human disease. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 5, 342-48.
- Lanier L. L., Phillips J. H. (1996). Inhibitory MHC class I receptors on NK cells and T cells. *Immunol. Today* 17, 86-91.

- Latham K. E. (1994). Strain-specific differences in mouse oocytes and their contributions to epigenetic inheritance. *Development* 120, 3419-26.
- Latham K. E., Garrels J. I., Solter D. (1994). Alterations in protein synthesis following transplantation of mouse 8-cell stage nuclei to enucleated 1-cell embryos. *Dev. Biol.* 163, 341-50.
- Latham K. E., McGrath J., Solter D. (1995). Mechanistic and developmental aspects of genetic imprinting in mammals. *Int. Rev. Cytol.* 160, 53-98.
- Latham K. E., Solter D. (1991). Effect of egg composition on the developmental capacity of androgenetic mouse embryos. *Development* 113, 561-68.
- Latham K. E., Solter D., Schultz R. M. (1991). Activation of a two-cell stage-specific gene following transfer of heterologous nuclei into enucleated mouse embryos. *Mol. Reprod. Dev.* 30, 182-86.
- Lawson J. H., Platt J. L. (1996). Molecular barriers to xenotransplantation. *Transplantation* 62, 303-10.
- Lawson J. L., Daniels L., Platt J. L. (1997). The evaluation of thrombomodulin activity in porcine to human xenotransplantation. *Transplant. Proc.* 29, 884-85.
- Lechler R. (1997). T-cell and NK-cell recognition of xenoantigens. Fourth International Congress on Xenotransplantation.
- Leventhal J. R. (1997). Removal of natural antibodies by immunoabsorption: results of experimental studies. In: Cooper D. K. C., Kemp E., Platt J. L., White D. J. G. (Hrsg.): Xenotransplantation: the transplantation of organs and tissues between species (2. Aufl., S. 360-76). Berlin, Heidelberg, New York (Springer).
- Leventhal J. R., Dalmaso A. P., Cromwell J. W., Platt J. L., Manivel C. J., Bolman R. M., Matas A. J. (1993). Prolongation of cardiac survival by depletion of complement. *Transplantation* 55, 857-65.
- Levy J. A. (1978). Xenotropic type C viruses. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 79, 111-13.
- Lewin B. (1998a). Molekularbiologie der Gene. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg und Berlin.
- Lewin B. (1998b). The mystique of epigenetics. *Cell* 93, 301-03.
- Lewis R. (1997). Embryonic stem cells debut amid little media attention. *The Scientist* 11 (19), 1-4 ([www.the-scientist.library.upem.edu/yr1997/sept/lewis\\_p1\\_970929.html](http://www.the-scientist.library.upem.edu/yr1997/sept/lewis_p1_970929.html)).
- Li E., Beard C., Jaenisch R. (1993). Role for DNA methylation in genomic imprinting. *Nature* 366, 362-65.
- Liu L., An M., Zhu J., Chen Y., Dai Y., Sun T. Z. (1995). Englische Zusammenfassung eines chinesischen Artikel in der Medline-Datenbank der amerikanischen National Library of Medicine (<http://www.nlm.nih.gov>): „Electrophoretic analysis of the protein patterns of the nuclear transplant rabbit embryos“. Original erschienen in: *I Chuan Hsueh Pao* 22, 258-63.
- Ljunggren H. G., Kärre K. (1985). Host resistance directed selectively against H-2-deficient lymphoma variants. Analysis of the mechanism. *J. Exp. Med.* 162, 1745-59.
- MacLeod M. C. (1996). A possible role in chemical carcinogenesis for epigenetic, heritable changes in gene expression. *Mol. Carcinog.* 15, 241-50.
- Malyguine A. M., Platt J. L., Saadi S., Dawson J. R. (1996). Human natural killer cells induce morphologic changes in porcine endothelial cell monolayers. *Transplantation* 61, 161-64.
- Malyguine A. M., Saadi S., Holzknacht R. A., Patte C. P., Sud N., Platt J. L., Dawson J. R. (1997). Induction of procoagulant function in porcine endothelial cells by human natural killer cells. *J. Immunol.* 159, 4659-64.
- McClure M. A., Johnson M. S., Feng D. F., Doolittle R. F. (1988). Sequence comparisons of retroviral proteins: relative rates of change and general phylogeny. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 2469-73.
- McCurry K. R., Kooyman D. L., Alvarado C. G., Cotterell A. H., Martin M. J., Logan J. S., Platt J. L. (1995). Human complement regulatory proteins protect swine-to-primate cardiac xenografts from humoral injury. *Nat. Med.* 1, 423-27.
- McGrath J., Solter D. (1983). Nuclear transplantation in the mouse embryo by microsurgery and cell fusion. *Science* 220, 1300-02.
- McGrath J., Solter D. (1984a). Inability of mouse blastomere nuclei transferred to enucleated zygotes to support development in vitro. *Science* 226, 1317-19.
- McGrath J., Solter D. (1984b). Completion of mouse embryogenesis requires both the maternal and paternal genomes. *Cell* 37, 179-83.
- Mei Q., Zou X. G., Du M. (1993). Englische Zusammenfassung eines chinesischen Artikel in der Medline-Datenbank der amerikanischen National Library of Medicine (<http://www.nlm.nih.gov>): „Studies on the early development of nucleocytoplasmic hybrid embryos between mouse and rabbit by nuclear transplantation“. Original erschienen in: *Shih Yen Sheng Wu Hsueh Pao* 26, 389-97.
- Melton D. W. (1990) The use of gene targeting to develop animal models for human genetic disease. *Biochem. Soc. Transact.* 18, 1035-39.

- Meng L., Ely J. J., Stouffer R. L., Wolf D. P. (1997). Rhesus monkeys produced by nuclear transfer. *Biol. Reprod.* 57, 454-59.
- Michaels M. G., Simmons R. L. (1994). Xenotransplant-associated zoonoses: strategies for prevention. *Transplantation* 57, 1-7.
- Mirsky S., Rennie J. (1997). What cloning means for gene therapy. *Sci. Am.* 276, 122-23.
- Mitchell A. (1998). Nuclear transplantation - the science of the lambs. *Nature* 391, 21.
- Miyagawa S., Hirose H., Shirakura R., Naka Y., Nakata S., Kawashima Y., Seya T., Matsumoto M., Uenaka A., Kitamura H. (1988). The mechanism of discordant xenograft rejection. *Transplantation* 46, 825-30.
- Monk M. (1992). The X chromosome in development in mouse and man. *J. Inherit. Metab. Dis.* 15, 499-513.
- Monk M., Boubelik M., Lehnert S. (1987). Temporal and regional changes in DNA methylation in the embryonic, extraembryonic and germ cell lineages during mouse embryo development. *Development* 99, 371-82.
- Morton O., Williams N. (1997). First Dolly, now headless tadpoles. *Science* 278, 798.
- Mucignat-Caretta C., Caretta A., Baldini E. (1998). Protein-bound male urinary pheromones: differential responses according to age and gender. *Chem. Senses* 23, 67-70.
- Mucignat-Caretta C., Caretta A., Cavaggioni A. (1995). Acceleration of puberty onset in female mice by male urinary proteins. *J. Physiol.* 486, 517-22.
- Munz C., Holmes N., King A., Loke Y. W., Colonna M., Schild H., Rammensee H. G. (1997). Human histocompatibility leukocyte antigen (HLA)-G molecules inhibit NKAT3 expressing natural killer cells. *J. Exp. Med.* 185, 385-91.
- Neethling F. A., et al. (1997). Roles of anti-a-gal-antibody and oligosaccharide therapy in xenotransplantation. In: Cooper D. K. C., Kemp E., Platt J. L., White D. J. G. (Hrsg.): *Xenotransplantation: the transplantation of organs and tissues between species* (2. Aufl., S. 425-36). Berlin, Heidelberg, New York (Springer).
- Niemann H. (1998) Erstellung transgener Schweine für die Xenotransplantation. Mini-Symposium Xenotransplantation, Paul-Ehrlich-Institut, Langen.
- Nijhout, H.F. (1990) Metaphors and the role of genes in development. In: *BioEssays*, 12(9):441-446.
- Nothias J.-Y., Majumder S., Kaneko K. J., DePamphilis M. L. (1995). Regulation of gene expression at the beginning of mammalian development. *J. Biol. Chem.* 270, 22077-80.
- Ogawa O., Eccles M. R., Szeto J., McNoe L. A., Yun K., Maw M. A., Smith P. J., Reeve A. E. (1993). Relaxation of insulin-like growth factor II gene imprinting implicated in Wilms' tumour. *Nature* 362, 749-51.
- Onions D. (1997) Virus hazard in xenotransplantation. Fourth International Congress on Xenotransplantation.
- Oyama, S. (1985). *The ontogeny of information. Developmental systems and evolution.* Cambridge (Cambridge University Press).
- Pantin, C.F. (1968). *The relations between the sciences.* Oxford.
- Parker W., Saadi S., Lin S. S., Holzknecht Z. E., Bustos M., Platt J. L. (1996). Transplantation of discordant xenografts: a challenge revisited. *Immunol. Today* 17, 373-78.
- Parry T. W., Prather R. S. (1995). Carry-over of mRNA during nuclear transfer in pigs. *Reprod. Nutr. Dev.* 35, 313-18.
- Paschen, H.; Bechmann, G.; Wingert, B. (1990) Funktion und Leistungsfähigkeit des Technology Assessment im Rahmen der Technologiepolitik. In: Ropohl, G.; Schuchardt, W., Wolf, R. (Hrg.) *Schlüsseltecte zur Technikbewertung*, S. 51-62.
- Patience C., Wilkinson D. A., Weiss, R. A. (1997a). Our retroviral heritage. *Trends Genet.* 13, 116-20.
- Patience C., Takeuchi Y., Weiss R. A. (1997b). Infection of human cells by an endogenous retrovirus of pigs. *Nat. Med.* 3, 282-86.
- Pennisi E. (1997). Transgenic lambs from cloning lab. *Science* 277, 631.
- Pennisi E. (1998a). Where's the beef? *Science* 279, 647.
- Pennisi E. (1998b). After Dolly, a pharming frenzy. *Science* 279, 646-48.
- Petters R. M. (1994). Transgenic livestock as genetic models of human disease. *Reprod. Fertil. Dev.* 6, 643-45.
- Piña B., Brüggemeier U., Beato M. (1990). Nucleosome positioning modulates accessibility of regulatory proteins to the mouse mammary tumor virus promoter. *Cell* 60, 719-31.
- Platt J. L. (1998). New directions for organ transplantation. *Nature* 392(Supp) 11-17.
- Platt J. L., Fischel R. J., Matas A. J., Reif S. A., Bolman R. M., Bach F. H. (1991). Immunopathology of hyperacute xenograft rejection in a swine-to-primate model. *Transplantation* 52, 214-20.

- 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. *Biol. Reprod.* 37, 859-66.
- Prather R. S., First N. L. (1990). Nuclear transfer in mammalian embryos. *Int. Rev. Cytol.* 120, 169-90.
- Prather R. S., Sims M. M., First N. L. (1989). Nuclear transplantation in early pig embryos. *Biol. Reprod.* 41, 414-18.
- Pruitt S. K., Baldwin W. M., Marsh H. C. jr., Lin S. S., Yeh C. G., Bollinger R. R. (1991). The effect of soluble complement receptor type 1 on hyperacute xenograft rejection. *Transplantation* 52, 868-73.
- Pruitt S. K., et al. (1994). The effect of soluble complement receptor type 1 on hyperacute rejection of porcine xenografts. *Transplantation* 57, 363-70.
- Pruitt S. K., et al. (1997). Effect of continuous complement inhibition using soluble complement receptor type 1 on survival of pig-to-primate cardiac xenografts. *Transplantation* 63, 900-905.
- Pschyrembel Klinisches Wörterbuch. (1994). De Gruyter, Berlin und New York.
- Rainier S., Johnson L. A., Dobry C. J., Ping A. J., Grundy P. E., Feinberg A. P. (1993). Relaxation of imprinted genes in human cancer. *Nature* 362, 747-49.
- Reemtsma K. (1991). Xenotransplantation - a brief history of clinical experiences: 1900-1965. In: Cooper D. K. C., Kemp E., Reemtsma K., White D. J. G. (Hrsg.): Xenotransplantation: The transplantation of organs and tissues between species (1. Aufl., S. 9-22). Berlin, Heidelberg, New York (Springer).
- Reddel R. R., Bryan T. M., Murnane J. P. (1997). Immortalized cells with no detectable telomerase activity. A review. *Biochemistry* 62, 1254-62.
- Reich J. (1998). Jagd auf ein Phantom - Ein Gesetz gegen das Klonen von Menschen ist genauso sinnvoll wie ein Einwanderungsverbot für Marsbewohner. *DIE ZEIT*, 15. Januar 1998.
- Reik W., Allen N. D. (1994). Genomic imprinting. Imprinting with and without methylation. *Curr. Biol.* 4, 145-47.
- Reik W., Brown K. W., Schneid H., Le Bouc Y., Bickmore W., Maher E. R. (1995). Imprinting mutations in the Beckwith-Wiedemann syndrome suggested by altered imprinting pattern in the IGF2-H19 domain. *Hum. Mol. Genet.* 4, 2379-85.
- Reik W., Roemer I., Barton S. C., Surani M. A., Howlett S. K., Klose J. (1993). Adult phenotype in the mouse can be affected by epigenetic events in the early embryo. *Development* 119, 933-42.
- Robl J. M., Stice S. L. (1989). Prospects for the commercial cloning of animals by nuclear transplantation. *Theriogenology* 31, 75-84.
- Robson S. C., Candinas D., Hancock W. W., Wrighton C., Winkler H., Bach F. H. (1995). Role of endothelial cells in transplantation. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 106, 305-22.
- Roemer I., Reik W., Dean W., Klose J. (1997). Epigenetic inheritance in the mouse. *Curr. Biol.* 7, 277-80.
- Rohdewohld H., Breindl M. (1985). Retrovirusintegration, Chromatinstruktur und Genexpression. *Funkt. Biol. Med.* 4, 71-81.
- Rollins S. A., Kennedy S. P., Chodera A. J., Elliott E. A., Zavoico G. B., Matis L. A. (1994). Evidence that activation of human T cells by porcine endothelium involves direct recognition of porcine SLA and costimulation by porcine ligands for LFA-1 and CD2. *Transplantation* 57, 1709-16.
- Rosengard A. M., Cary N. R., Langford G. A., Tucker A. W., Wallwork J., White D. J. (1995). Tissue expression of human complement inhibitor, decay-accelerating factor, in transgenic pigs. A potential approach for preventing xenograft rejection. *Transplantation* 59, 1325-33.
- Rother R. P., Fodor W. L., Springhorn J. P., Birks C. W., Setter E., Sandrin M. S., Squinto S. P., Rollins S. A. (1995). A novel mechanism of retrovirus inactivation in human serum mediated by anti-galactosyl natural antibody. *J. Exp. Med.* 182, 1345-55.
- Rubin E. M., Smith D. J. (1994). Atherosclerosis in mice: getting to the heart of a polygenic disorder. *Trends Genet.* 10, 199-203.
- Ryan U. S. (1995). Complement inhibitory therapeutics and xenotransplantation. *Nat. Med.* 1, 967-68.
- Sachs D. H., Sykes M., Greenstein J. L., Cosimi A. B. (1995). Tolerance and xenograft survival. *Nat. Med.* 1, 969.
- Saegusa A. (1998a). Japanese fear that new publicity rules could hinder their research. *Nature News*, 30. Juli 1998, [www.nature.com](http://www.nature.com).
- Saegusa A. (1998b). Mother bears could help save giant panda. *Nature News*, 30. Juli 1998, [www.nature.com](http://www.nature.com).
- Sapienza C., Paquette J., Tran T. H., Peterson A. (1989). Epigenetic and genetic factors affect transgene methylation imprinting. *Development* 107, 165-68.

- Schnieke A. E., Kind A. J., Ritchie W. A., Mycock K., Scott A. R., Ritchie M., Wilmut I., Colman A., Campbell K. H. S. (1997). Human factor IX transgenic sheep produced by transfer of nuclei from transfected fetal fibroblasts. *Science* 278, 2130-33.
- Schuh H. (1998). Alles neu macht das Ei. *DIE ZEIT*, 23. Juli 1998.
- Schultz R. M., Worrall D. M. (1995). Role of chromatin structure in zygotic gene activation in the mammalian embryo. *Semin. Cell. Biol.* 6, 201-08.
- Seebach J. D., et al. (1997). HLA class I expression on porcine endothelial cells protects against human NK cytotoxicity. *Fourth International Congress on Xenotransplantation* (O184).
- Sgaramella V., Zinder N. D., Campbell K. H. S., Colman A., Wilmut I. (1998). Dolly confirmation. *Science* 279, 635-637.
- Signer E. N., Dubrova Y. E., Jeffreys A. J., Wilde C., Finch L. M. B., Wells M., Peaker M. (1998). DNA fingerprinting Dolly. *Nature* 394, 329-30.
- Silver L. M. (1998). Das geklonte Paradies. Künstliche Zeugung und Lebensdesign im neuen Jahrtausend. München (Droemer).
- Sims M. M., First N. L. (1994). Production of calves by transfer of nuclei from cultured inner cell mass cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 6143-47.
- Smith L. C., Wilmut I. (1989). Influence of nuclear and cytoplasmic activity on the development in vivo of sheep embryos after nuclear transplantation. *Biol. Reprod.* 40, 1027-35.
- Smith L. C., Meirelles F. V., Bustin M., Clarke H. J. (1995). Assembly of somatic histone H1 onto chromatin during bovine early embryogenesis. *J. Exp. Zool.* 273, 317-26.
- Solter D. (1992). Relevance of genomic imprinting to human diseases. *Curr. Opin. Biotechnol.* 3, 632-36.
- Solter D. (1996). Lambing by nuclear transfer. *Nature* 380, 24-25.
- Solter D. (1998). Dolly is a clone – and no longer alone. *Nature* 394, 315-16.
- Spemann H. (1936). Experimentelle Beiträge zu einer Theorie der Entwicklung. Julius Springer, Berlin.
- Squinto S. (1997). Genetically modified animal organs for human transplantation. *World J. Surg.* 21, 939-42.
- Starzl T. E., Demetris A. J., Murase N., Ildstad S., Ricordi C., Trucco M. (1992). Cell migration, chimerism, and graft acceptance. *Lancet* 339, 1579-82.
- Starzl T. E., et al. (1993). Baboon-to-human liver transplantation. *Lancet* 341, 65-71.
- Starzl T. E., et al. (1994). The biological basis of and strategies for clinical xenotransplantation. *Immunol. Rev.* 141, 213-44.
- Starzl T. E., Murase N., Thomson A., Demetris A. J. (1996). Liver transplants contribute to their own success. *Nat. Med.* 2, 163-65.
- Steele D. J. R., Auchincloss H. jr. (1995). Xenotransplantation. *Annu. Rev. Med.* 46, 345-60.
- van Stekelenburg-Hamers A. E., Rebel H. G., van Inzen W. G., de Loos F. A., Drost M., Mummery C. L., Weima S. M., Trounson A. O. (1994). Stage-specific appearance of the mouse antigen TEC-3 in normal and nuclear transfer bovine embryos: re-expression after nuclear transfer. *Mol. Reprod. Dev.* 37, 27-33.
- Stewart C. (1997). An udder way of making lambs. *Nature* 385, 769-71.
- Stice S. L., Keefer C. L. (1993). Multiple generational bovine embryo cloning. *Biol. Reprod.* 48, 715-719.
- Stice S. L., Robl J. M. (1988). Nuclear reprogramming in nuclear transplant rabbit embryos. *Biol. Reprod.* 39, 657-64.
- Strahan K. M., Gu F., Andersson L., Gustafsson K. (1995). Pig  $\alpha$ -1,3-galactosyltransferase: sequence of a full-length cDNA clone, chromosomal localisation of the corresponding gene, and inhibition of expression in cultured pig endothelial cells. *Transplant. Proc.* 27, 245-46.
- Strohman, R. (1993). Ancient Genomes, wise bodies, unhealthy people: limits of genetic paradigm in biology and medicine. *Perspectives in Biology and Medicine*, 37, 1: 112-145.
- Strohman, R. (1994) Epigenesis: The Missing Beat in Biotechnology, in: *Bio/Technology* 12:156-164.
- Takeuchi Y., Porter C. D., Strahan K. M., Preece A. F., Gustafsson K., Cosset F. L., Weiss R. A., Collins M. K. (1996). Sensitization of cells and retroviruses to human serum by  $\alpha$ -1,3-galactosyltransferase. *Nature* 379, 85-88.
- Theuring F., Thuncke M., Kosciessa U., Turner J. D. (1997). Transgenic animals as models of neurodegenerative diseases in humans. *Trends Biotechnol.* 15, 320-25.
- Thomson J. A., Kalishman J., Golos T. G., Durning M., Harris C. P., Becker R. A., Hearn J. P. (1995). Isolation of a primate embryonic stem cell line. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 7844-48.
- Thomson J. A., Marshall V. S. (1998). Primate embryonic stem cell lines. *Curr. Top. Dev. Biol.* 38, 133-65.

- Thompson E. M., Legouy E., Christians E., Renard J.-P. (1995). Progressive maturation of chromatin structure regulates HSP70.1 gene expression in the preimplantation mouse embryo. *Development* 121, 3425-37.
- Trounson A. O. (1997). Cloning: potential benefits for human medicine. *Med. J. Aust.* 167, 568-69.
- Travis J. (1997). Human embryonic stem cells found? *ScienceNewsOnline*, 19. Juli 1997, www.sciencenews.org.
- Truss M., Bartsch J., Schelbert A., Hache R. J. G., Beato M. (1994). Hormone induces binding of receptors and transcription factors to a rearranged nucleosome on the MMTV promoter in vivo. *EMBO J.* 14, 1737-51.
- Tsunoda Y., Kato Y. (1993). Nuclear transplantation of embryonic stem cells in mice. *J. Reprod. Fertil.* 98, 537-40.
- 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. *J. Exp. Zool.* 242, 147-51.
- Uexküll T., von / Wesiack W. (1988) Theorie der Humanmedizin. Urban und Schwarzenberg, München
- Velander W. H., Lubon H., Drohan W. (1997). Menschliche Proteine aus der Milch transgener Tiere. *Spektrum der Wissenschaft* 3/97, 70-74.
- Wakayama T., Perry A. C. F., Zuccotti M., Johnson K. R., Yanagimachi R. (1998). Full-term development of mice from enucleated oocytes injected with cumulus cell nuclei. *Nature* 394, 369-74.
- Waldmann H., Cobbold S. (1993). Monoclonal antibodies for the induction of transplantation tolerance. *Curr. Opin. Immunol.* 5, 753-58.
- Ward T., Pipkin P. A., Clarkson N. A., Stone D. M., Minor P. D., Almond J. W. (1994). Decay-accelerating factor CD55 is identified as the receptor for echovirus 7 using CELICS, a rapid immuno-focal cloning method. *EMBO J.* 13, 5070-74.
- Watier H., Guillaumin J. M., Vallee I., Thibault G., Gruel Y., Lebranchu Y., Bardos P. (1996). Human NK cell-mediated direct and IgG-dependent cytotoxicity against xenogeneic porcine endothelial cells. *Transpl. Immunol.* 4, 293-99.
- Waugh O'Neill R. J., O'Neill M. J., Marshall Graves J. A. (1998). Undermethylation associated with retroelement activation and chromosome remodelling in an interspecific mammalian hybrid. *Nature* 393, 68-72.
- Weinberg R. A. (1996). Wie Krebs entsteht. *Spektrum der Wissenschaft Spezial 5: Krebsmedizin*, 7-17.
- Weiss R. A. (1998). Transgenic pigs and virus adaptation. *Nature*, 391, 327-328.
- Weksberg R., Shen D. R., Fei Y. L., Song Q. L., Squire J. (1993). Disruption of insulin-like growth factor 2 imprinting in Beckwith-Wiedemann syndrome. *Nat. Genet.* 5, 143-50.
- Wells D. N., Misica P. M., Day T. A., Tervit H. R. (1997). Production of cloned lambs from an established embryonic cell line: a comparison between in vivo- and in vitro-matured cytoplasts. *Biol. Reprod.* 57, 385-93.
- Wiekowski M., Miranda M., Nothias J. Y., DePamphilis M. (1997). Changes in histone synthesis and modification at the beginning of mouse development correlate with the establishment of chromatin mediated repression of transcription. *J. Cell. Sci.* 110, 1147-58.
- Wieland, W. (1975) Diagnose. Gruyer: Berlin.
- Willadsen S. M. (1986). Nuclear transplantation in sheep embryos. *Nature* 320, 63-65.
- Wilmot I., Schnieke A. E., McWhir J., Kind A. J., Campbell K. H. S. (1997). Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature* 385, 810-13. (Erratum in: *Nature* 386, 200.)
- Wilmot I., Whitelaw C. B. A. (1994). Strategies for production of pharmaceutical proteins in the milk. *Reprod. Fert. Dev.* 6, 625-30.
- Wolman S. R., Heppner G. H., Wolman E. (1997). New directions in breast cancer research. *FASEB J.* 11, 535-43.
- Wright W. E., Piatyszek M. A., Rainey W. E., Byrd W., Shay J. W. (1996). Telomerase activity in human germline and embryonic tissues and cells. *Dev. Genet.* 18, 173-79.
- Yamada K., Sachs D. H., Dersimonian H. (1995). Human anti-porcine xenogeneic T cell response. Evidence for allelic specificity of mixed leukocyte reaction and for both direct and indirect pathways of recognition. *J. Immunol.* 155, 5249-54.
- Yang X., Jiang S., Kovacs A., Foote R. H. (1992). Nuclear totipotency of cultured rabbit morulae to support full-term development following nuclear transfer. *Biol. Reprod.* 47, 636-43.
- Yoder J. A., Walsh C. P., Bestor T. H. (1997). Cytosine methylation and the ecology of intragenomic parasites. *Trends Genet.* 13, 335-40.
- Zaidi A., et al. (1998). Kidneys from UDAF transgenic pgs are physiologically compatible with primates. In: *Transplantation proceedings* 30(5), 2465.66,

- Zakhartchenko V., Stojkovic M., Brem G., Wolf E. (1997). Karyoplast-cytoplast volume ratio in bovine nuclear transfer embryos: effect on developmental potential. *Mol. Reprod. Dev.* 48, 332-38.
- Zhang Y., Wang J., Qian J., Hao Z. (1991). Nuclear transplantation in goat embryos. *Sci. Agric. Sin.* 24, 1-6.
- Zhang Y., Li Y. (1998). Nuclear-cytoplasmic interaction and development of goat embryos reconstructed by nuclear transplantation: production of goats by serially cloning embryos. *Biol. Reprod.* 58, 266-69.
- Zhao Y., Swenson K., Sergio J. J., Arn J. S., Sachs D. H., Sykes M. (1996). Skin graft tolerance across a discordant xenogeneic barrier. *Nat. Med.* 2, 1211-16.