

Ei und Kern: ein Kampf um die Vormacht (Nobelaufsatz)**

John B. Gurdon*

Embryonale Stammzellen · Oocyten ·
Reprogrammierung · Transkription · Zellen

Hintergrund

Als ich im Oktober 1956 mit meiner Promotion begann, schlug mir mein Betreuer Michail Fischberg, Lecturer am Institut für Zoologie in Oxford, als Thema vor, Zellkerne somatischer Zellen des südafrikanischen Krallenfroschs *Xenopus laevis* zu transplantieren. Es gab gute Gründe, dies tun zu wollen (siehe unten). Die sehr wichtige Frage, die alle damals beschäftigte, war, ob alle Zelltypen des Körpers den gleichen Satz von Genen besitzen. Diese Frage hatten Embryologen seit 1886 gestellt (Rauber);^[1] Spemann^[2] hatte mit einem Ligaturexperiment an einem achtzelligen Froschembryo gezeigt, dass die Kerne in ihren Entwicklungsmöglichkeiten totipotent sind. Es war klar, dass ein entscheidendes Experiment darin bestehen musste, den Zellkern einer Zygote durch den Zellkern einer somatischen Zelle zu ersetzen. Die zentrale Frage war, ob dieser somatische Zellkern den Zellkern der Zygote funktionell ersetzen könnte, indem er eine normale Entwicklung der „entkernten“ Eizelle hervorrufen würde (Abbildung 1). Briggs und King^[3] hatten bereits erfolgreich einen Blastula-Zellkern in ein entkerntes Ei übertragen und normale Kaulquappen des Frosches *Rana pipiens* erhalten. Sie hatten aber auch gefunden, dass der Kern einer Endodermzelle aus dem Neurula-Stadium eines Embryo keine normale Entwicklung mehr steuern konnte (Abbildung 2).^[5] Sie zogen daraus die naheliegende Schlussfolgerung, dass im Zuge der Entwicklung vom Blastula- zum Neurula-Stadium (etwa 24 h) einige Gene, die für die normale Entwicklung notwendig sind, entweder verloren gegangen waren oder irreversibel reprimiert wurden.

Insoweit war die Arbeit an meinem Thema schon getan, und die Antwort auf die zentrale Frage war bereits gegeben. Warum sollte ich versuchen, die Studie an einer verwandten Spezies zu reproduzieren? Zwei Resultate schienen möglich: Entweder ich erhielt ein von Briggs und King abweichendes Ergebnis; damit wäre die Ausgangsfrage wieder offen und Gegenstand fruchtbarer Untersuchungen. Oder ich würde dasselbe Ergebnis wie Briggs und King erhalten; dann würde sich die wichtige Frage nach dem Mechanismus stellen, durch den ein somatischer Zellkern, dem ein spezifischer Entwicklungsweg (in diesem Fall im Endoderm) vorgezeichnet ist,

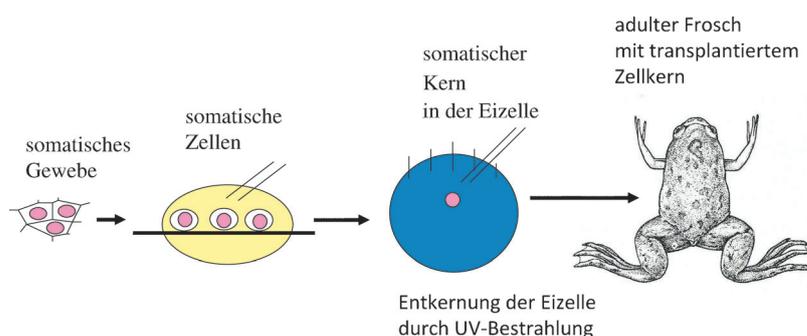


Abbildung 1. Aufbau eines Kernübertragungsexperiments eines somatischen Zellkerns in unbefruchtete Eier, wie es erst von Briggs und King^[3] für *Rana pipiens* entworfen und dann anschließend auch in *Xenopus* durchgeführt wurde. In *Rana* fand die Entkernung von Hand mit einer Nadel statt, in *Xenopus* durch UV-Bestrahlung.^[4]

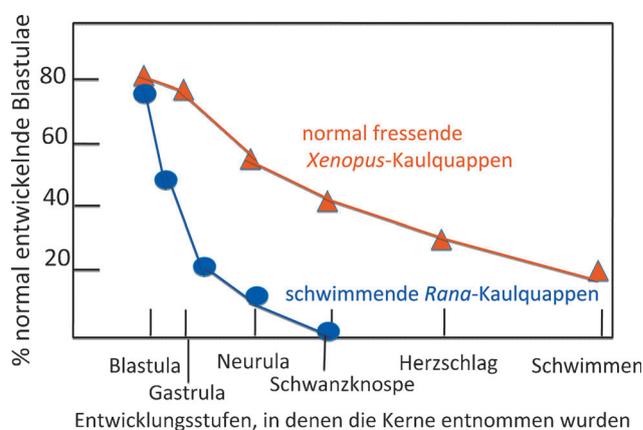


Abbildung 2. Überlebensrate von kerntransplantierten Embryonen in *Rana pipiens* und *Xenopus laevis*. Sogar weiterentwickelte Donorzellen aus dem *Xenopus*-Endoderm haben Kerne, die manchmal nach Kerntransfer zu normalen Individuen heranwachsen können (nach Briggs und King^[5] [*Rana*] und Gurdon^[6] [*Xenopus*]).

[*] Prof. J. B. Gurdon
University of Cambridge
Cambridge CB2 1QN (Großbritannien)
E-Mail: j.gurdon@gurdon.cam.ac.uk

[**] Copyright© The Nobel Foundation 2012. Wir danken der Nobel-Stiftung, Stockholm, für die Genehmigung zum Abdruck einer deutschen Fassung dieses Aufsatzes.

durch Einwirkung des Eizell-Cytoplasmas reprogrammiert werden könnte.

Vorläufige Untersuchungen ergaben, dass es ernsthafte technische Schwierigkeiten zu überwinden galt, um einen Transfer somatischer Zellkerne in *Xenopus* in der Weise durchzuführen, wie es Briggs und King erfolgreich in *Rana pipiens* getan hatten. Zum einen ist das *Xenopus*-Ei, anders als das von *Rana*, von einer dichten und sehr elastischen Gallerte umgeben, die sogar für die feinsten Mikropipetten völlig undurchlässig ist (Abbildung 3). Zum zweiten macht

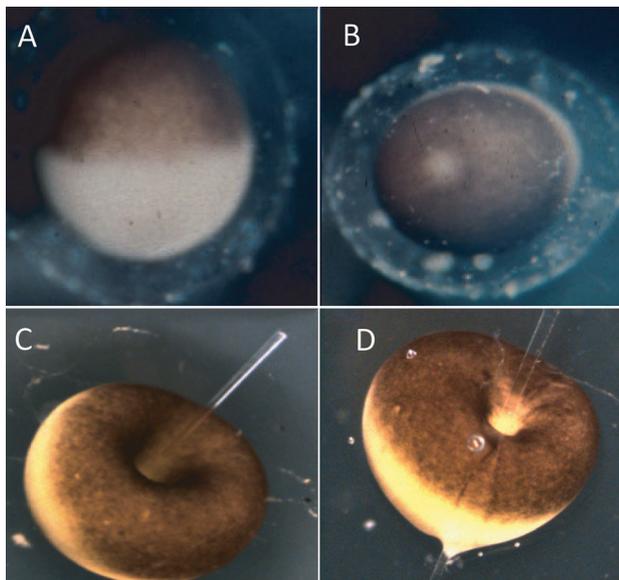


Abbildung 3. Das unbefruchtete *Xenopus*-Ei ist von einer dichten elastischen Gallerte umgeben, sodass man nicht mit einer Mikropipette ins Zytoplasma stechen kann, wenn die Gallerte nicht entfernt oder mit UV-Licht denaturiert wurde. A) Seitenansicht; B) animalischer Zellpol; die weiße Fläche in der Mitte des schwarzen Flecks ist die Stelle, an der sich die Chromosomen des Eies befinden. C) Wenn die Gallerte nicht entfernt wird, drückt eine Mikropipette die Schicht zusammen; manchmal durchdringt die Pipette – noch immer von der Gallerte umgeben – das Ei ohne in das Zytoplasma einzudringen (D).

es diese Gallerte sehr schwer oder gar unmöglich, Metaphase-Chromosomen durch Absaugen mit einer Nadel aus dem Ei zu entnehmen, eine Methode, die bei *Rana* verwendet wurde. Auf der anderen Seite gab es sehr gute Gründe, diese Technik auch bei *Xenopus* zum Erfolg zu bringen. Wie *Xenopus laevis* zum Versuchstier der Entwicklungsbiologie avancierte, ist eine amüsante und lehrreiche Geschichte.^[7] *Xenopus*-Weibchen reagieren auf die Injektion kommerziell erhältlicher weiblicher Hormone (des follikelstimulierenden Hormons und des luteinisierenden Hormons), indem sie am nächsten Tag, ganz gleich welcher Jahreszeit, Eier legen. Im Gegensatz dazu laichen die europäischen und nordamerikanischen Frösche der Gattung *Rana* nur im Frühjahr, es sei denn, man injiziert einen Extrakt aus Frosch-Hypophysen. Man benötigt dazu die Hypophysen von fünf getöteten Fröschen, um eine Ovulation auszulösen. In der Vergangenheit hatten die europäischen Embryologen in jedem Jahr nur ein oder zwei Monate lebende Froscheier zur Verfügung und mussten sich

den Rest des Jahres mit Histologie oder anderen Dingen beschäftigen. Mit *Xenopus* konnten Versuche an lebenden Embryonen im Prinzip während des ganzen Jahres durchgeführt werden. Außerdem ist *Xenopus* ein Wasserfrosch und lässt sich im Labor einfach in Aquarien halten, während für *Rana* ein Terrarium saubergehalten werden muss. Und schließlich können *Xenopus*-Arten in weniger als einem Jahr vom befruchteten Ei zum geschlechtsreifen Tier herangezogen werden (*Rana* benötigt dafür drei bis vier Jahre), was die Zucht und Verwendung von genetischen Mutanten erleichtert. Ein weiterer Vorteil von *Xenopus laevis* ist, dass die Art in stark infizierten Gülleteichen lebt und eine außergewöhnliche Resistenz gegen Infektionen und Erkrankungen aufgebaut hat. Michail Fischberg entschied daher, dass es den Versuch wert sei, mich zumindest für eine Weile am Transfer somatischer Zellkerne in *Xenopus* arbeiten zu lassen.

In diesem Aufsatz möchte ich die frühe Geschichte des Kerntransfers in *Xenopus* erzählen, ein Thema, für das der Medizin-Nobelpreis 2012 vergeben wurde.^[8] Die weiteren Arbeiten, die im Anschluss daran bis heute in *Xenopus* durchgeführt wurden, werden nur kurz zusammengefasst; sie können an anderer Stelle nachgelesen werden.^[9,10]

Die Methode der Zellkernübertragung in *Xenopus*

Es besteht kein Zweifel, dass ich eine ganze Menge Glück hatte. Aber in dem Satz, dass „das Glück mit den Tüchtigen ist“, steckt wohl auch etwas Wahrheit. Mein Betreuer hatte gerade ein Mikroskop mit UV-Beleuchtung angeschafft. Es gab Hinweise, dass ultraviolettes Licht die DNA in den Chromosomen der Eizelle zerstören würde, die glücklicherweise direkt unter der Oberfläche am animalischen Pol des Amphibieneies liegen. Richtete man die UV-Quelle auf den animalischen Pol unbefruchteter Eier, zerstörte man damit die Chromosomen des Eies, was sich dadurch nachweisen ließ, dass eine Befruchtung solcher bestrahlter Eier mit Spermia zur Bildung haploider Embryonen führte. Lügen die Chromosomen nicht an der Oberfläche des großen Amphibieneies, hätte das UV-Licht mit seiner sehr geringen Eindringtiefe sie nicht erreicht.^[4] Vielleicht noch glücklicher war unser Befund, dass diese spezielle UV-Lampe, die nur für die Mikroskopie bestimmt war, sukzessive die elastische Gallerte um die Eizelle herum denaturierte (auflöste). Nach UV-Beleuchtung konnten die unbefruchteten Eier leicht mit der Mikropipette durchstoßen werden. Da die Veränderung der Gallerte dosisabhängig abläuft, kann man einerseits die Entkernung des Eies möglich machen, andererseits aber soviel Gallerte zurücklassen, dass die Versiegelung der Einstichöffnung, die von der Mikropipette zurückbleibt, unterstützt wird. Damals war noch nicht bekannt, dass die Gallerte mit einer alkalischen Cysteinhydrochloridlösung entfernt werden kann, aber das Glück oder die Erfahrung meines Betreuers oder beides haben mich an diesem Punkt nicht verlassen. Entscheidend für die Aussagekraft dieser frühen Versuche war der Beweis, dass die Chromosomen der Eizelle tatsächlich zerstört waren und nicht zur Entwicklung der kerntransplantierten Embryonen beitrugen. Eine andere Doktorandin unserer Gruppe, Sheila Smith, untersuchte die

Morphologie sich entwickelnder haploider *Xenopus*-Individuen. Als Maß für die Haploidie sollte das Vorhandensein eines Nucleolus pro Zellkern dienen. Sie erhielt ein unerklärliches Ergebnis: Embryonen mit nur einem Nucleolus pro Kern waren diploid und entwickelten sich völlig normal, während die Haploiden (die nur einem Nucleolus pro Kern oder Chromosomensatz haben) als missgebildete Kaulquappen sehr früh starben. Die meisten Betreuer hätten ihrem Studenten empfohlen, das Experiment in der folgenden Woche mit ganz anderem Material zu wiederholen, um zu sehen, ob sich das Ergebnis reproduzieren ließe. Michail Fischberg (Abbildung 4) hatte aber die Weitsicht oder die Intuition, nachzufragen, von welchem Frosch die Eier

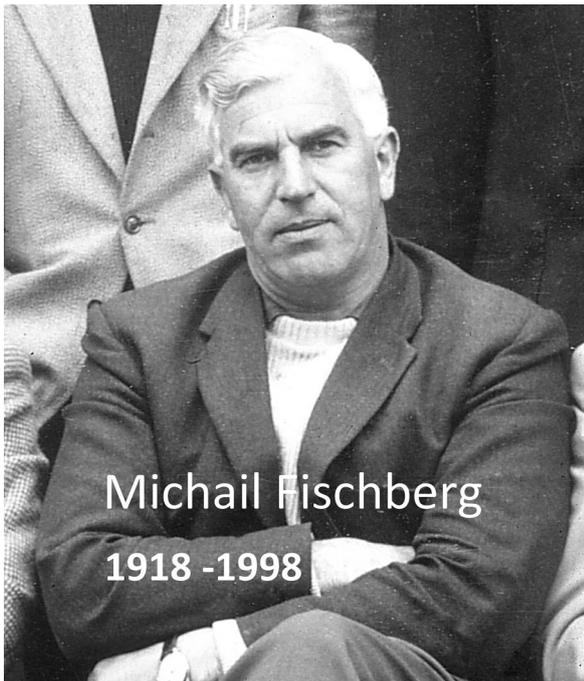


Abbildung 4. Michail Fischberg, geboren in St. Petersburg, aufgewachsen in der Schweiz, promoviert bei E. Hadorn. Sein wissenschaftlicher Stammbaum reicht zurück von Hadorn über Baltzer zu Boveri. Michail Fischberg war mein Doktorvater in Oxford, England, von wo aus er dann nach Genf wechselte.

stammten, aus denen sich normale Embryonen mit nur einem Nucleolus entwickelten. Erstaunlicherweise waren die Ergebnisse mit diesen Eiern reproduzierbar. Michail Fischberg schloss daraus, dass es eine Mutation in einem Chromosomensatz geben müsse, die die Bildung des Nucleolus verhindert.^[11] In einer späteren Arbeit wurde gezeigt, dass dieser *Xenopus*-Stamm tatsächlich alle ribosomalen Gene in einem Nucleolus-Organisator verloren hatte, und dass daher Heterozygote bezüglich dieser Mutation nie mehr als einen Nucleolus pro diploidem Chromosomensatz tragen.^[12] Diese Mutation stellte einen außergewöhnlich wertvollen nukleären Marker für Kernübertragungsexperimente dar (Abbildung 5). Einige Jahre später wurde ein Albino-Stamm von *Xenopus laevis* gefunden, der einen visuell auffälligeren Marker lieferte (Abbildung 6).

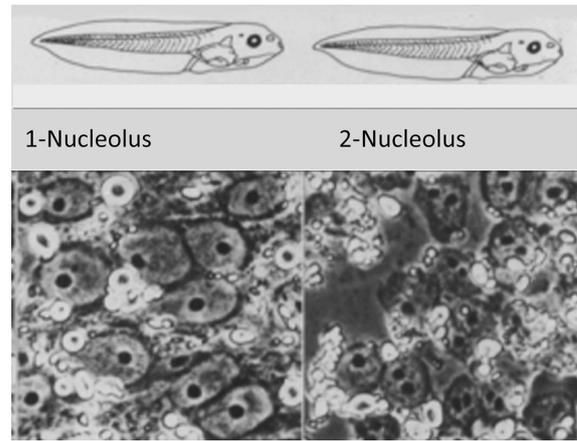


Abbildung 5. Der Nucleolus als genetischer Marker für *Xenopus laevis*.^[11] Heterozygote des Stammes mit nur einem Nucleolus tragen diesen einen Nucleolus pro diploidem Kern (links) im Vergleich zum Wildtyp, der meist zwei Nucleoli pro Kern besitzt (rechts). Der Stamm mit einem Nucleolus trägt eine Deletion ribosomaler Gene in einem Chromosom.^[12] Die Entwicklung zu fruchtbaren adulten Tieren verläuft in heterozygoten und Wildtyp-Stämmen ganz normal.



Abbildung 6. Ein Klon männlicher Albino-Frösche, der durch Transplantation von Kernen aus einem Albinoembryo in entkernte Eizellen eines Wildtyp-Weibchens entstanden ist. Die Albino-Frösche sind genetisch identisch und nehmen Hauttransplantate voneinander an.

Mit den Möglichkeiten, die die UV-Bestrahlung in Kombination mit einem genetischen Marker eröffnete, konnten wir innerhalb kurzer Zeit zeigen, dass die Übertragung von somatischen Zellkernen in *Xenopus* gut funktionierte. Bereits nach einem Jahr hatte ich nachgewiesen, dass der Zellkern einer Endodermzelle aus einer entwickelten Kaulquappe eine normale Entwicklung bis zu einem Kaulquappenstadium mit transplantiertem Zellkern steuern konnte. Das entsprach nicht den Ergebnissen von Briggs und King (Abbildung 2).

Normale Entwicklung aus den Kernen differenzierter Darmepithelzellen

Während des nächsten Jahres, inzwischen 1958, fand ich heraus, dass es technisch möglich war, einzelne Zellkerne aus

dem Darmepithel fressender Kaulquappen zu transplantieren. Ich fand es am günstigsten, die Donorzellen möglichst wenig zu verformen,^[13] sodass wenigstens einige den Kern in einer aufgebrochenen Zellwand hatten, obwohl andere Donorkerne auch in ganze, unpermeabilisierte Zellen transplantiert worden sein konnten. Diese waren jedoch nicht in der Lage, auf das Cytoplasma des Eies zu reagieren oder eine Zellteilung einzuleiten. Es schien wichtig zu sein, den Kern der zerstörten Zelle nicht dem einfachen Salinemedium auszusetzen, das für den Kerntransfer verwendet wurde. Später stellte sich heraus, dass es viel einfacher ist, kleine Donorzellen mit Streptolysin O zu behandeln anstatt sie in einer engen Pipette aufzureißen.^[14]

Der Erfolg dieser Kernübertragungen aus Darmepithel schwankte von einem Experiment zum anderen. Außerdem entwickelten sich die Eier mancher Weibchen signifikant besser als die von anderen. Die Qualität der Eier war also ein bedeutsamer Faktor. Dennoch ließ sich zeigen, dass sich ausgehend von Kernen aus ausdifferenzierten Darmepithelzellen mit Bürstensaum einige der kerntransplantierten Embryonen ganz normal bis zum Stadium fressender Kaulquappen entwickelten und dann zur Metamorphose hin fortschritten. Außerdem besaßen diese Kaulquappen nur einen Nucleolus pro diploidem Kern. Dies belegte, dass der transplantierte Kern, der eine normale Entwicklung steuerte, tatsächlich von der Darmepithelzelle abstammte. Obwohl sich nur etwa 1.5% der mit Darmepithelkernen transplantierten Zellen zu normalen fressenden Kaulquappen entwickelten,^[6] erhielten wir viele solcher Individuen und alle trugen den Kernmarker.

Mein Betreuer und sein Assistent versorgten meine kerntransplantierten Kaulquappen, die inzwischen die Metamorphose zu jungen Fröschen durchlaufen hatten, während ich als Postdoc auf einem anderen Gebiet arbeitete. Bei meiner Rückkehr waren aus den Kaulquappen männliche und weibliche Frösche geworden, und wir testeten ihre Fruchtbarkeit und Fähigkeit, normale Embryonen zu erzeugen. Dies mündete 1966 in unsere Veröffentlichung mit dem Titel „Fertile intestine nuclei“,^[15] in der die gegenteilige Schlussfolgerung wie in der Arbeit von Briggs und King mit *Rana pipiens* gezogen wurde. Natürlich gab es Kritik, dass ein Doktorand, der beinahe alleine arbeitete, nicht in der Lage sein sollte, die Ergebnisse der gut etablierten und anerkannten Forscher Briggs und King zu reproduzieren. Der Verweis auf den genetischen Marker des einfachen Nucleolus war jedoch ein überzeugendes Argument, dass die *Xenopus*-Ergebnisse echt waren. Im Laufe der Zeit wurde in Fachkreisen akzeptiert, dass Zellen eine vollständige Differenzierung von Genen gänzlich unverwandter Zellentwicklungslinien und tatsächlich aller Zelltypen durchlaufen können – bis hin zu Darmepithelzellen fressender Kaulquappen, ohne dass Gene verlorengehen oder stabil inaktiviert werden.

Nach diesen frühen Versuchen wurde die zentrale Schlussfolgerung, dass während der Zelldifferenzierung das Genom konserviert bleibt und dass reprimierte, stumme Gene reaktiviert werden können, bestätigt. Zusammen mit verschiedenen Kollegen, vor allem mit R. A. Laskey, konnten wir normale Kaulquappen aus adulten Schwimmhäuten und aus einer Reihe adulter Organe wie Herz, Lunge etc. züchten,

nachdem wir zuvor die Zellen aus diesen Geweben in Zellkultur überführt hatten.^[16] Wir konnten zwar normale geschlechtsreife männliche und weibliche adulte Tiere aus Kernen des Darmepithels von fressenden Kaulquappen erzeugen, ebenso wie wir fressende Kaulquappen aus Kernen adulter Zellen erhielten. Niemals jedoch gelangten wir bis zu geschlechtsreifen adulten Tieren, wenn wir vom Zellkern einer anderen adulten Zelle ausgingen. Wir glauben, dass die intensive und schnelle Zellteilung und DNA-Replikation, die dem transplantierten Amphibienkern durch die aktivierte Eizelle aufgezwungen wird, mit einer hohen Wahrscheinlichkeit von Replikationsdefekten einhergeht, wie man dies auch bei *Rana pipiens*^[17] sieht; dadurch wird die Chance, eine normale Entwicklung ausgehend vom Zellkern einer adulten Zelle zu durchlaufen, enorm verringert.

Das epigenetische Gedächtnis

Zusätzlich zu der schnellen DNA-Replikation und Zellteilung, die einem transplantierten somatischen Zellkern aufgezwungen wird, gibt es auch noch andere Erklärungen für die stetig abnehmende Erfolgsrate von Kernübertragungen von differenzierenden und differenzierten Zellen. Eine offensichtliche Möglichkeit ist, dass es einen Widerstand gegen die Reaktivierung der Gene gibt, die für die frühe Entwicklung benötigt werden, die aber während der Zelldifferenzierung stummgeschaltet oder reprimiert wurden. Diese Möglichkeit wird im Abschnitt über „Resistenz“ diskutiert.

Eine andere interessante Möglichkeit ist, dass es ein Gedächtnis für den Zustand aktiver Gene gibt. Vielleicht lassen sich die Gene, die in spezialisierten Zellen stark exprimiert werden, nach dem Kerntransfer nicht abschalten und stören dann die neuen Anweisungen für die Auswahl von Entwicklungsrichtungen in kerntransplantierten Embryonen. Mit Verfahren, die zur Zeit der ersten Kerntransfers in Amphibien noch nicht verfügbar waren, ist es inzwischen möglich, diese Idee zu testen. Zellkerne wurden von Muskeln oder anderen abstammungsspezifischen Vorläuferzellen transplantiert, um Embryonen zu gewinnen. Obwohl sich viele der kerntransplantierten Embryonen anormal entwickelten, war es möglich, genug Material von unvollständig gespaltenen Embryonen zu erhalten, um genspezifische Transkriptionsassays durchzuführen. Das erstaunliche Ergebnis war, dass ein beträchtliches Gedächtnis bezüglich des Aktivitätszustandes der Gene in diesen kerntransplantierten Embryonen viele transkriptionsinaktive Zellzyklen, wie sie für frühe amphibische Embryonen charakteristisch sind, überdauert. Die Neuroectoderm- und Endoderm-Abstammungslinien kerntransplantierten Embryonen mit Zellkernen aus Muskelvorläuferzellen exprimierten oft auch weiterhin muskelspezifische Gene in großem Umfang.^[18] Das Gedächtnis war unvollständig insofern, als etwa die Hälfte der kerntransplantierten Embryonen aus Muskelvorläuferzellen eine umfangreiche, manchmal sehr starke Überexpression von Muskelgenen in andersartigen Geweben zeigte, während die andere Hälfte dies nicht tat (Abbildung 7). Gene, die charakteristisch für eine bestimmte Abstammungslinie waren, wurden während der ersten Zellteilungen des kerntrans-

Von Muskelzellkernen abgeleitete Embryonen
erinnern sich an ihren Ursprung in
Nerven- und Endodermzellen

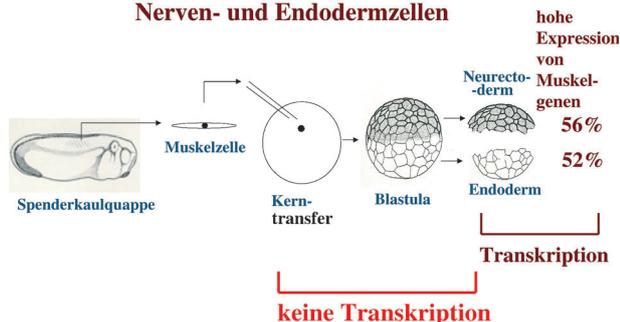


Abbildung 7. Epigenetisches Gedächtnis in kerntransplantierten Embryonen. Embryonen, die mit Kernen aus Muskelgewebe transplantiert wurden, wurden bis zum Blastulastadium herangezogen; dann wurde das Mesoderm (Abstammungslinie der Muskeln) entfernt. Die verbleibenden Regionen (Neurectoderm für Nerven- und Hautzellen und Endoderm für Darmzellen) exprimieren den Muskelgen-Marker MyoD in etwa der Hälfte aller solcher Embryonen in großer Menge.^[19]

plantierten Embryos reprimiert, wurden dann aber im gesamten Embryo nach dem Stadium der Transkriptionsaktivierung im späten Blastulastadium reexprimiert. Dieses Ergebnis wurde auch bei anderen, nicht-muskulären Abstammungslinien gefunden.^[18] Es zeigte sich auch, dass dieses „Gedächtnis“ eines aktiven Genzustands mit dem Histon H3.3 assoziiert war, das ein häufiges Protein in Eiern und frühen Embryonen ist. Die Erklärung für dieses Phänomen war, dass die sehr hohe Konzentration von Histon H3.3, die normalerweise in Oocyten und Eiern vorkommt,^[20] die Transkription jedes Gens verstärkt, das zur Zeit der Kerntransplantation in einem aktiven Zustand ist.^[19] Histon H3.3 ist bekanntermaßen mit aktiver Transkription assoziiert. Das Gedächtnis eines aktiven Genzustands wurde anschließend in Versuchen mit iPS beschrieben.^[21] Die Beobachtung, dass etwa 50 % der kerntransplantierten Embryonen diesen Gedächtniseffekt zeigen, der sich bei den anderen 50 % nicht einstellt, ist ein Beispiel für die Existenz eines Konflikts zwischen denjenigen Bestandteilen des Eies, die die für ein Ei und einen Embryo charakteristische Genexpression wiederherstellen wollen, und dem Widerstand des Kern determinierter oder differenzierter Zellen gegen jede Veränderung, um so den Weg der Differenzierung, auf den sich eine Embryozelle begeben hat, zu stabilisieren.

Kernübertragungen in Säugetieren

Es dauerte dann fast 40 Jahre, bis diese frühen Ergebnisse aus *Xenopus* in Säugern reproduziert werden konnten, und zwar im Schaf.^[22,23] Ein sehr wichtiger Umstand dieser ersten Kerntransplantation im Schaf war die Verwendung unbefruchteter Eier, wie sie auch in Amphibien benutzt wurden. Bei früheren Arbeiten mit Mäusen^[24] wurden befruchtete Eizellen verwendet. Dies ist zwar möglich,^[25] doch ist die Synchronisation zwischen Kern und Ei schwerer zu erreichen als mit unbefruchteten Eiern. Ein sehr elegantes und wichtiges Experiment, das das allgemeine Prinzip bestätigte, nach

dem die Zelldifferenzierung unter Erhaltung eines vollständigen Gensatzes fortschreitet, wurde mit Kernen mit einem reorganisierten Genom durchgeführt, nämlich mit reifen B- oder T-Zellen aus Mäusen als Spender.^[26] Im Lauf der Zeit gelang die Übertragung von somatischen Kernen auch in die Eier von Mäusen und anderen Säugern.^[27] In jeder Art gibt es anscheinend gewisse technische Randbedingungen, die herausgefunden und berücksichtigt werden müssen. Bei Säugern sind die frühen Zellteilungen nach der Befruchtung im Vergleich zu Amphibien extrem langsam (20 h von der Befruchtung bis zum Zwei-Zellen-Stadium in der Maus). Es ist daher unwahrscheinlich, dass die Chromosomenschäden, die bei den Amphibien beobachtet wurden (siehe oben), in Säugern vorkommen. Dennoch nimmt die Erfolgsrate bei der Entwicklung kerntransplantierte Embryonen in Mäusen und Fröschen in gleicher Weise ab (Abbildung 8). Es muss daher andere Gründe für diesen Widerstand der Eizellen gegen die Reprogrammierung geben.

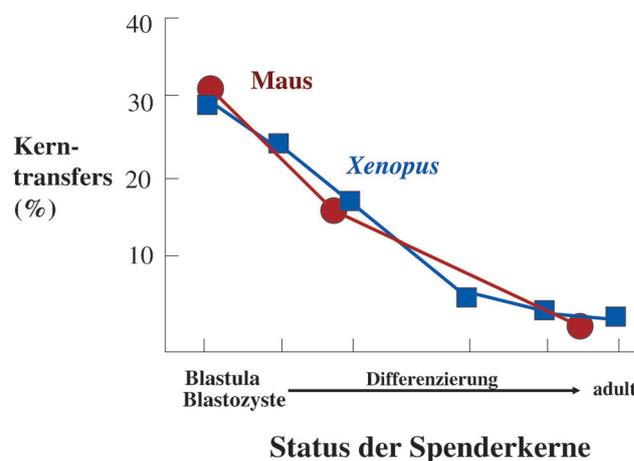


Abbildung 8. Überlebensrate kerntransplantierte Embryonen aus dem Darmgewebe von *Xenopus*-Larven^[6] und der Maus.^[27]

Diese kurze Geschichte der Kerntransplantation aus somatischen Zellen wird den zahlreichen wichtigen Beiträgen, die nach den frühen *Xenopus*-Arbeiten geleistet wurden, nicht gerecht. Diese Arbeiten sind bei Gurdon^[28] zusammengefasst. Nachfolgende Übersichtsartikel, die auch die frühen Arbeiten berücksichtigen, wurden von McKinnell,^[29] DiBerardino und Hoffner^[30] sowie Gurdon^[31] veröffentlicht.

Mechanismen der Kernreprogrammierung durch Eier

Die zweite Frage, die sich für eine Dissertation zum Thema Kernübertragung in *Xenopus* stellt, ist die nach Mechanismen der Reprogrammierung. Die Frage hat zwei Teile: Wie kehrt das Ei den Differenzierungszustand eines somatischen Zellkerns um, sodass dieser sich – wenn die Entwicklung normal verläuft – wie der Kern einer Zygote verhält? Und wie kommt es zum zunehmenden Widerstand der somatischen Kerne gegen die Reprogrammierungsbedingungen im Ei?

Um diese Fragen anzugehen, war es nötig, sich auf die Transkription einzelner Arten von Genen zu konzentrieren. Damals in den 1960er Jahren waren die Gene noch nicht kloniert und es war nur möglich, mit Genen zu arbeiten, die in vielfacher Kopienzahl pro Genom vorlagen, wie die 28S-, 18S- und 5S-ribosomalen Gene. Versuche mit ribosomalen Genen, Transfer-RNA-Genen und der großen Gruppe der Gene, deren Basenzusammensetzung statistisch der des Gesamtgenoms entsprach, ergaben, dass die transplantierten somatischen Kerne im Blastula- und Gastrulastadium des Embryos zu einem embryonalen Transkriptionsmuster zurückgekehrt waren.^[32] Dies trug aber nicht zum Verständnis des Mechanismus bei, nach dem diese Verjüngung abläuft. Es dauerte einige Jahrzehnte, bevor einzelne Gene, die in der frühen Entwicklungsphase von *Xenopus* exprimiert werden, kloniert waren und die notwendigen Sonden und Verfahren entwickelt worden waren, um die Expression dieser Gene in kerntransplantierten Embryonen verfolgen zu können.

Damals erschien es hilfreich, die Mechanismen der frühen Embryonalentwicklung zu untersuchen, wenn die kerntransplantierten Embryonen, insbesondere von fortgeschrittenen Spenderstadien, sich oft sehr anormal entwickeln. Ich fragte mich, ob die Kerntransferverfahren dazu geeignet wären, gereinigte Makromoleküle in ein Ei und damit in embryonale Zellen einzubringen. Dank meiner wissenschaftlichen Freundschaft mit Jean Brachet aus Belgien, der wesentliche Beiträge zur Entwicklungsbiologie geleistet hat,^[33] erhielt ich eine kleine Probe gereinigter Globin-mRNA aus dem Labor von Dr. Chantrenne. Er war einer der ersten, die überhaupt mRNA aus Säugern gereinigt hatten. Sogar wenige Mikrogramm davon waren wertvoller als Gold, und alles, was damit in Berührung kam, musste vorher aus Angst vor RNase mit Chromsäure gereinigt werden. Ein Höhepunkt meiner Karriere war die damals gemachte Entdeckung, dass gereinigte mRNA ungewöhnlich effizient zu einem Protein translatiert, wenn man sie direkt in ein Ei oder eine embryonale Zelle injiziert.^[34] Dieser Befund war vor allem deshalb so unerwartet, weil es in Eizellen eine sehr hohe Ribonuclease-Aktivität gibt. Ein Projektantrag für ein solches Experiment wäre daher sicherlich nicht bewilligt worden. Glücklicherweise hatte ich genügend andere Projektmittel, um diese Arbeit ohne spezifische Förderung durchführen zu können. Es war sogar möglich, Kaninchenglobin-mRNA in das befruchtete *Xenopus*-Ei zu injizieren, es bis zum Kaulquappenstadium heranwachsen zu lassen und dann nachzuweisen, dass beispielsweise das Muskelgewebe noch immer hohe Konzentrationen von Globin bildet, was für diesen Zelltyp völlig unpassend war, ohne aber die normale Entwicklung zu beeinträchtigen.^[35] Die Injektion von mRNA und anderen Makromolekülen in eine Eizelle ist inzwischen eine gängige Methode in der Entwicklungsbiologie. Es erstaunt mich noch immer, wie gut sie funktioniert. Wir wissen nun, dass die Injektion in ein Ei mit einer Mikropipette harmlos genug ist, um die Freisetzung von Ribonuclease aus dem Ei-Zytoplasma zu vermeiden. Möglicherweise ist die Penetration einer Eizelle mit einer Mikropipette genauso harmlos wie die Penetration des Eies durch ein Spermium nach der Befruchtung. Inzwischen ist die Injektion von mRNA für Über- und Unter-

expressionsexperimente eine verbreitete Methode in der Entwicklungsbiologie.

Ein zentraler Mechanismus in der frühen Entwicklung ist die konzentrationsabhängige Antwort von Zellen auf Signalmoleküle, auch bekannt als Interpretation von Morphogengradienten. Bereits ein Konzentrationsunterschied der Liganden von einem Faktor 2 genügt, damit kompetente Embryonalzellen entscheiden können, welcher Entwicklungslinie sie folgen sollen.^[36,37] Wir wissen jetzt, dass kleine quantitative Abweichungen der Signalstärken die Entwicklung kerntransplantierten Embryonen negativ beeinflussen können; dies wurde mittels Kerntransplantationen zwischen verschiedenen Spezies gezeigt.^[38] Ein weiterer interessanter Aspekt der konzentrationsabhängigen Signalgebung lässt sich an dem so genannten Community-Effekt zeigen.^[39] Dieses Konzept wurde im Rahmen von Einzelzell-Verpflanzungen entwickelt; demnach kann eine Gruppe gleichartiger Zellen gemeinsam eine hinreichend hohe Konzentration eines Signalmoleküls zum Überschreiten eines Schwellenwerts bilden, der von einer einzelnen Zelle niemals erreicht werden könnte. Dieser Effekt scheint bei der normalen Entwicklung vielzelliger Gewebe eine wichtige Rolle zu spielen. Es stellte sich später heraus, dass das Prinzip des Community-Effekts bereits als Quorum-Sensing bei der Lichtemission von Bakterien in Raubfischen und an anderen Beispielen vorgeschlagen worden war.^[40]

Um mit der Analyse der Reprogrammierung der Zellkerne durch das Ei-Zytoplasma voranzukommen, war es offensichtlich wünschenswert, diesen Effekt mit Ei-Extrakten auszulösen. So könnte man durch Fraktionierung und selektive Abreicherungen entsprechende Einzelkomponenten identifizieren. Somatische Kerne, die in Eier transfert werden, induzieren beinahe sofort die DNA-Replikation.^[41] Ei-Extrakte sind außergewöhnlich wirksam, um die DNA-Replikation in isolierten Kernen zu induzieren,^[42,43] doch die Herstellung solcher Extrakte, die dann noch ein sinnvolles Fortschreiten der Transkription auslösen, ist außergewöhnlich schwierig. Die Probleme bei der Herstellung funktioneller Zellextrakte kontrastieren auffällig zu dem schon lange etablierten Verfahren, mRNA, Gene oder ähnliche Spezies in lebende Zellen zu injizieren. Diese Injektion von Komponenten in Eier und frühe Embryonalzellen kann man als „lebende biochemische Reagenzgläser“ ansehen.^[44]

Die Analyse der Kernreprogrammierung durch Oocyten

Bereits bei den ersten Kerntransplantationen in Amphibien wurde deutlich, dass die Replikation von DNA und Chromosomen in den übertragenen somatischen Kernen sehr oft fehlerhaft verläuft.^[17] Sind die Amphibieneier erst einmal durch Spermien oder eine Injektionspipette penetriert und aktiviert, durchlaufen sie unmittelbar eine Phase von etwa zehn oder mehr schnellen Teilungszyklen. Es ist sehr schwierig für einen somatischen Zellkern, der sich normalerweise einmal in zwei Tagen teilt, sofort auf einen Teilungszyklus von 30 min umzuschalten. Die Folge ist, dass die DNA des transplantierten Zellkerns oder seiner Tochterzel-

len oft während der Zellteilung auseinandergerissen wird, bevor die Replikation abgeschlossen ist. Dadurch kommt es zu größeren Chromosomenverlusten und anderen Defekten, insbesondere wenn der Kern aus einer sich langsam teilenden somatischen Zelle stammt. An dieser Stelle war klar, dass wir einen Weg finden mussten, um die Reprogrammierung somatischer Zellkerne ohne den Nachteil und den schädigenden Effekt der erzwungenen schnellen DNA-Replikation und Zellteilung zu analysieren. Daher wurden Amphibienoocyten als Rezipienten für somatische Zellkerne eingeführt.

Bei Amphibien-Oocyten dauert die Wachstumsphase von der frühen Keimzelle zum ausgewachsenen Vorläufer eines Eies mit Lampenbürstenchromosomen mehrere Monate.^[45] Solche Zellen befinden sich in der Vorphase der ersten Meiose (Abbildung 9). Diese Vorläuferzellen von der Größe

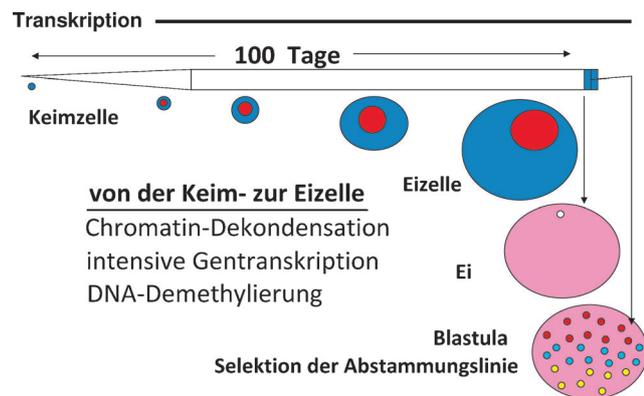


Abbildung 9. Die *Xenopus*-Oocyte wächst im Eierstock aus einer Keimzelle über viele Monate heran, während sie sich in der ersten meiotischen Vorphase befindet. Wenn sie vollständig herangewachsen ist, kann sie auf Hormone wie Progesteron reagieren, die erste Meiose vervollständigen und in der zweiten meiotischen Metaphase verharren. Nach der Befruchtung entwickelt sie sich innerhalb von 8 Stunden zur Blastula weiter, und die Entwicklungslinien der somatischen Zellen treten erstmals in Erscheinung.

einer normalen Eizelle werden normalerweise durch einen bestimmten Hormonspiegel induziert, die erste Meiose abzuschließen und sich bis zur Metaphase der zweiten Meiose weiterzuentwickeln. Danach können sie auf den Befruchtungsvorgang reagieren. Noch während meiner Dissertation entwickelte ich ein Verfahren, um mithilfe der *Xenopus*-Oocyten den Ursprung der replikationsinduzierenden Kapazität von Eiern zu analysieren. Sogar Spermienkerne können nach Injektion in Oocyten in Lampenbürstenchromosomen umgewandelt werden.^[46] Es wurde deutlich, dass somatische Kerne oder sogar reine DNA effizient und korrekt transkribiert würden, wenn man sie in das Keimbläschen (= Zellkern) einer Oocyte injiziert.^[47,48] Es ist wichtig, dass das Keimbläschen eines Amphibieneies einen großen Vorrat an Komponenten enthält, die für die Entwicklung essentiell sind und die während der Vervollständigung der Meiose im Zytoplasma der Eizelle verteilt werden (Abbildung 10). Diese Vorräte sind für die normale Embryonalentwicklung erforderlich. Zum Glück für die Entwicklungsbiologen sind diese Komponenten, die von den hochaktiven Lampenbürstenchromosomen kodiert werden, in dem spezialisierten Keimbläschen

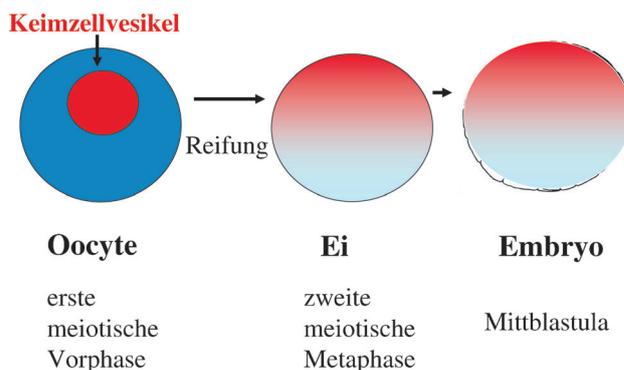


Abbildung 10. Eine *Xenopus*-Oocyte hat ein riesiges Keimbläschen (420 µm Durchmesser), das seinen tetraploiden Chromosomensatz enthält. Nach Abschluss der Meiose wird der Inhalt des Keimbläschens auf das Ei und anschließend auf den Embryo verteilt.

akkumuliert, wo sie eine stark konzentrierte Lösung von Verbindungen darstellen, die später im Zytoplasma der Eizelle landen. Da DNA-Replikation und Zellteilung in diesen wachsenden Oocyten nicht stattfinden, hält das Oocyten-Keimbläschen ein zugängliches Konzentrat transkriptionsaktiver Komponenten bereit.

Somatische Zellkerne, Chromatin oder DNA von Amphibien oder Säugern können mit etwas Übung in das unsichtbare Keimbläschen einer intakten Oocyte injiziert werden.^[49] *Xenopus*-Oocyten transkribieren selektiv somatische Kerne von nichtverwandten Spezies.^[50] Die Transkription injizierter Kerne oder Gene läuft mit hoher Geschwindigkeit ab, mit mehreren hundert Reinitiationen der Transkription eines Gens pro Tag. Zwei- bis dreihundert somatische Zellkerne können in das Keimbläschen einer Oocyte injiziert werden, sodass eine beladene Oocyte etwa die gleiche Menge von Kernmaterial liefert wie 250 Eizellen, in die je ein einzelner Zellkern injiziert wurde (Abbildung 11). Dadurch wird es realistisch, an Oocyten solche molekularen Verfahren anzuwenden, die ansonsten große Mengen an Material verbrauchen. Injizierte gereinigte DNA wird in Chromatin umgewandelt.^[51] Die Transkription injizierter Zellkerne oder von Chromatin läuft über mehrere Tage weiter. Die Keimbläschen mit den injizierten somatischen

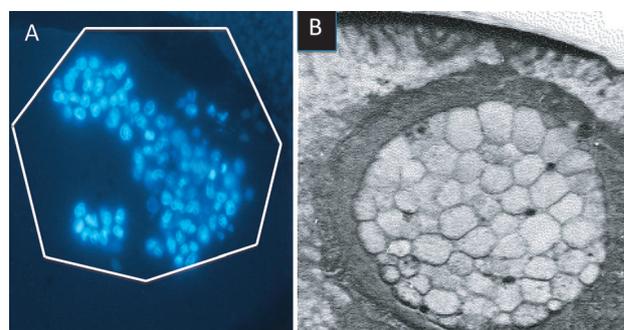


Abbildung 11. Zahlreiche somatische Zellkerne können in das Keimbläschen einer Oocyte injiziert werden. A) Säugetierzellkerne aus Zellkultur, kurz nach der Transplantation in das Keimbläschen einer Oocyte (weiße Linie). B) HeLa-Zellkerne zwei Tage nach der Transplantation in das Keimbläschen einer Oocyte.

Zellkernen lassen sich manuell aus einer Oocyte isolieren und zur Antikörperbindung, für FRAP-Tests etc. an individuellen transplantierten Kernen einsetzen. Nach Injektion in das Keimbläschen durchlaufen die somatischen Kerne eine massive Dekondensation des Chromatins wie Spermien in einer Eizelle. Nach dem Transfer in die Oocyten werden einige Gene stark transkribiert, und es häufen sich große Mengen an Transkript an. Zu diesen aktivierten Genen gehören einige, die in Embryonen aktiv sind, wie die gut bekannten Pluripotenzgene Oct4, Sox2, Nanog und andere. Durch diese Eigenschaften sind transplantierte *Xenopus*-Oocyten in der ersten meiotischen Vorphase gut geeignet für die Analyse sowohl der Genaktivierung während der Reprogrammierung als auch der Grundlagen der Resistenz von Kernen differenzierter somatischer Zellen gegen Reprogrammierung.^[49]

Transkriptionsaktivierung

Mehrere erforderliche frühe Schritte sind inzwischen aufgeklärt. Der erste ist die Wanderung eines speziellen Verbindungshistons, B4 in Amphibien und H1foo in Säugern genannt, in die transplantierten Kerne. Dieses Histonprotein ist sehr reichlich im Keimbläschen amphibischer Oocyten vorhanden, und ein großer Teil davon wird innerhalb von 2–3 h bei 17°C in das Chromatin der injizierten Kerne eingebaut. Dieser Schritt ist eine Voraussetzung für die anschließende Aktivierung der Transkription, wie sich durch Einsatz von Antikörpern und überexprimierten dominant-negativen Formen dieses Histons zeigen ließ, weil die darauf folgende Aktivierung der Pluripotenzgene gehemmt wurde.^[52] Wenn das Histon B4 in die transplantierten Kerne einwandert, verlieren diese Kerne die somatische Form des Verbindungshistons. Diese Substitution im Chromatin ist wahrscheinlich ein wichtiger Teil der verblüffenden Dekondensation der Chromosomen, die kurz nach der Kerninjektion stattfindet. Dieses frühe Ereignis verschafft vermutlich den anderen Oocyten-Komponenten, darunter den Transkriptionsfaktoren, Zugang zum injizierten Chromatin. Das Histon B4 kommt in Oocyten in großen Mengen vor, nicht aber bei der normalen Entwicklung nach dem Blastula-Stadium.^[53] Einer der nächsten wichtigen Schritte ist die Einwanderung eines anderen oocyten-spezifischen Histons, H3.3, in den injizierten Kern. Histon H3.3 kommt auch in somatischen Zellen vor, seine Konzentration in Oocyten ist jedoch viel höher, und es ist allgemein mit aktiver Transkription assoziiert. Wir haben oben angemerkt, dass Histon H3.3 ursächlich mit dem epigenetischen Gedächtnis in somatischen Zellen zusammenhängt, die in Eizellen in der zweiten Metaphase transplantiert wurden. Wenn das Histon H3.3 allgemein die Transkription verstärkt, würde dies sowohl zur Erklärung des epigenetischen Gedächtnisses in kerntransplantierten Embryonen als auch der steigenden Intensität der Transkription in somatischen, in Oocyten verpflanzten Kernen dienen.^[28] Ein späteres Ereignis ist die Polymerisation des nukleären Actins in Oocyten und in Kernen, die in die Keimbläschen übertragen wurden.^[54] Dies scheint die Transkriptionsaktivität der transplantierten Kerne während der ersten beiden Tage zu verstärken. Die beschriebene Folge von Einzel-

ereignissen führt zu einem hohen Maß transkriptionaler Reprogrammierung und läuft mit überraschend hoher Geschwindigkeit ab. Innerhalb von zwei Tagen weisen die meisten der transplantierten somatischen Kerne eine stark aktivierte Transkription des Pluripotenzgens Sox2 auf; dies läuft bei 17°C ab, dem metabolischen Äquivalent von 12 h bei 37°C.

Die Transkription einiger Gene wird zwar nach dem Kerntransfer in die Oocyten gegenüber dem Zustand in somatischen Zellen enorm gesteigert (bis zum Hundertfachen bei Sox2), doch kommt es im Keimbläschen der Oocyte nicht zu einer allgemeinen Verstärkung der Transkription bei allen Genen. Eine RNA-Sequenzanalyse belegt vielmehr, dass die meisten Gene in einer somatischen Mauszelle unverändert transkribiert werden, einige bleiben auf hohem Niveau, andere bleiben reprimiert. Eine kleine Zahl von Genen, die in somatischen Zellen aktiv waren, wurden nach dem Transfer in die Oocyten reprimiert und ein noch kleinerer Anteil durchläuft eine deutliche Steigerung der Transkriptionsrate. Die Reprogrammierung der somatischen Zellen durch das Keimbläschen der Oocyte ist also sehr selektiv.^[55] Zu den Genen, deren Transkription aktiviert wird, gehören solche, die stark exprimiert werden und die wichtig für die frühe Entwicklung bei Säugern sind, darunter Sox2, Oct4 und Nanog. Das Keimbläschen des Oocyten scheint mit Komponenten ausgestattet zu sein, die eine intensive transkriptionelle Aktivität induzieren, wie man sie in den Lampenbürstenchromosomen bei allen zugänglichen Genen sieht.^[9] Einige Gene aus den somatischen Kernen reagieren jedoch nicht auf die transkriptionsinduzierenden Bedingungen im Ei.

Resistenz gegen die Reprogrammierung durch Oocyten

Für mich ist nun die Resistenz gegen die Transkriptionsaktivierung der interessanteste Aspekt der Zellkern-Reprogrammierung. Diese zunehmende, mit der Entwicklung assoziierte Resistenz spiegelt wahrscheinlich die bemerkenswerte Stabilität der Zelldifferenzierung wider (Abbildung 12). Kaum je wandelt sich eine spezialisierte Zelle in einen anderen Zelltyp um oder bildet Tochterzellen, die dieses tun. Die Resistenz gegen eine Reprogrammierung wird auch bei Zellfusionsexperimenten sichtbar^[56] und sogar auch in Experimenten mit iPS.^[57] Die Transplantation von somatischen Säugerzellkernen mit einem reprimierten X-Chromosom hat Hinweise auf ein möglicherweise verantwortliches Molekül gegeben. Mäuseembryo-Fibroblasten mit einem in-

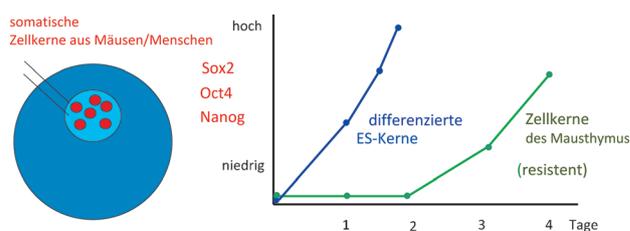


Abbildung 12. Zellkerne aus differenzierten Zellen (Mausthymus) werden viel langsamer reprogrammiert als embryonale Zellkerne.

aktiven X-Chromosom sind sehr resistent gegen die Transkriptionen dieser Gene nach dem Kerntransfer in Oocyten. Demgegenüber werden die Kerne von Zellen aus der Keimscheibe von Mausembryonen, die ebenfalls ein inaktives X-Chromosom enthalten, von den Oocyten stark transkriptional reaktiviert. Dieser Unterschied zwischen Keimscheibe und adulten Zellkernen lässt sich auf die chromosomale Verbindung macroH2A zurückführen, deren Entfernung oder Inaktivierung in embryonalen Mausfibroblasten aus adulten Mäusen die Transkription von Pluripotenzgenen nach sich zieht.^[58] Gegenwärtig sehen wir den Vorgang der X-Chromosom-Inaktivierung bei weiblichen Säugern als eine Folge mehrerer Schritte an, die zunehmend den inaktiven Status stabilisieren. Mit fortschreitender Entwicklung und Zelldifferenzierung sorgen aufeinanderfolgende Ebenen der Inaktivierung, einschließlich Histonmodifikationen (wie H3K27Me2/3- und macroH2A-Aufnahme ins Chromatin), und schließlich die Methylierung der DNA dafür, dass ein Gen stabil reprimiert und hochresistent gegen Reprogrammierungen wird.^[10]

Um andere Möglichkeiten zu analysieren, nach denen Gene resistent gegen die Reprogrammierung werden können, sind vermutlich zwei experimentelle Ansätze erfolgversprechend. Bei dem einen werden fortschreitend Komponenten aus isolierten Kernen entfernt; anschließend wird durch Injektion in Oocyten die Transkription getestet, bis die Resistenz verschwunden ist.^[59] Diese Methode erweist sich als erfolgreich bei der Abreicherung aller RNA einschließlich nichtkodierender RNA aus den Kernen. Steigende Mengen NaCl mit Triton können zunehmend chromosomale Proteine aus isolierten Kernen entfernen. Wenn die Resistenz wiederhergestellt werden kann, indem definierte Fraktionen der freigesetzten Proteine wieder zugesetzt werden, könnte dies zur Identifizierung der chromosomalen Proteine führen, die die Resistenz auf individuelle Gene übertragen. Ein anderer potenziell hilfreicher Ansatz ist die Expression der Enzyme, die Modifikationen an Histonen anbringen oder sie entfernen, indem man die mRNA in die Oocyten injiziert. Es sollte dann möglich sein, ein bestimmtes Histon oder eine andere Chromosomenmodifikation mit der Resistenz eines Gens gegen die Reprogrammierung durch Oocyten in Verbindung zu bringen. Mit diesen Methoden hat man die Aussicht, hinreichend genau den Mechanismus der Kern-Reprogrammierung und die Resistenz von Kernen, die in Amphibien-Oocyten transplantiert wurden, zu verstehen.

Überblick und Aussichten

Der Vorgang der Reprogrammierung von Zellkernen durch Eier und Oocyten kann als Konflikt zwischen dem Zytoplasma eines Eies, dessen Komponenten dazu bestimmt sind, eine rasche DNA-Replikation und -Transkription zu fördern, und den Bestandteilen von differenzierten Zellkernen, die einen stabilen Zustand sicherstellen sollen, aufgefasst werden. Das Zytoplasma eines Eies ist speziell optimiert, um den hochkondensierten und spezialisierten Kern eines Spermiums mit 100 % Effizienz zu aktivieren. Es überrascht daher nicht, dass die gleichen Bestandteile den Kern einer somati-

schen Zelle effizient aktivieren. Der Unterschied ist, dass ein somatischer Zellkern während der Zelldifferenzierung sehr resistent gegen die Aktivierung durch das Eizell-Zytoplasma geworden ist, auf eine Art, die sich von den Spermienkernen unterscheidet. Die Kerne differenzierter Zellen sind mit Molekülen ausgestattet, die ihren differenzierten Zustand stabilisieren und einer Umkehr und Verjüngung entgegenwirken. Wenn differenzierte Zellkerne zu leicht in den embryonalen Zustand zurückgeschaltet werden könnten, könnte dies die Umkehr der Differenzierung ermöglichen und zu Krebs und anderen Schädigungen führen.

Die experimentellen Arbeiten, die hier beschrieben wurden, haben sich um Versuche mit Amphibieneiern und -oocyten gedreht, weil diese reichlich vorhanden und einfach verfügbar sind, ein Vorteil, der den Entwicklungsbiologen bis in die 1950er Jahre klar bewusst war. Die allgemeinen Prinzipien, die aus der Arbeit mit Amphibien abgeleitet wurden, scheinen sich auch auf Säuger und andere Wirbeltiere übertragen zu lassen. Eine vollständige Aufklärung der Kern-Reprogrammierung durch Amphibieneier und -oocyten könnte es erleichtern, Kerne in Säugern einschließlich dem Menschen zu reprogrammieren, und damit letztlich zu therapeutischen Anwendung beim Zellersatz beitragen.

Eingegangen am 1. August 2013

Online veröffentlicht am 5. Dezember 2013

Übersetzt von Dr. Burkard Neuß, Jülich

- [1] „Personaltheil und germinaltheil des individuum“: A. Rauber, *Zool. Anz.* **1886**, 9, 166–171.
- [2] H. Spemann, *Embryonic development and induction*, Yale University Press, New Haven, Conn, **1938**.
- [3] „Transplantation of living nuclei from blastula cells into enucleated frogs' eggs“: R. Briggs, T. J. King, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1952**, 38, 455–463.
- [4] „The effects of ultraviolet irradiation on uncleaved eggs of *Xenopus laevis*“: J. B. Gurdon, *Q. J. Microsc. Sci.* **1960**, 101, 299–312.
- [5] „Changes in the nuclei of differentiating endoderm cells as revealed by nuclear transplantation“: R. Briggs, T. J. King, *J. Morphol.* **1957**, 100, 269–312.
- [6] „The developmental capacity of nuclei taken from intestinal epithelium cells of feeding tadpoles“: J. B. Gurdon, *J. Embryol. Exp. Morph.* **1962**, 10, 622–640.
- [7] „The introduction of *Xenopus laevis* into developmental biology: Of empire, pregnancy testing and ribosomal genes“: J. B. Gurdon, N. Hopwood, *Int. J. Dev. Biol.* **2000**, 44, 43–50.
- [8] „Nuclear cloning and direct reprogramming: the long and the short path to Stockholm“: R. Jaenisch, *Cell Stem Cell* **2012**, 11, 744–747.
- [9] „Mechanisms of nuclear reprogramming by eggs and oocytes: a deterministic process?“: J. Jullien, R. P. Halley-Stott, K. Miyamoto, V. Pasque, J. B. Gurdon, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2011**, 12, 453–459.
- [10] „Epigenetic factors influencing resistance to nuclear reprogramming“: V. Pasque, J. Jullien, K. Miyamoto, R. P. Halley-Stott, J. B. Gurdon, *Trends Genet.* **2011**, 27, 516–525.
- [11] „A description of the technique for nuclear transplantation in *Xenopus laevis*“: T. R. Elsdale, J. B. Gurdon, M. Fischberg, *J. Embryol. Exp. Morph.* **1960**, 8, 437–444.
- [12] „Absence of ribosomal-RNA synthesis in the anucleolate mutant of *Xenopus laevis*“: D. D. Brown, J. B. Gurdon, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1964**, 51, 139–146.

- [13] „Factors responsible for the abnormal development of embryos obtained by nuclear transplantation in *Xenopus laevis*“: J. B. Gurdon, *J. Embryol. Exp. Morph.* **1960**, *8*, 327–340.
- [14] „Nuclear transplantation from stably transfected cultured cells of *Xenopus*“: A. P. Chan, J. B. Gurdon, *Int. J. Dev. Biol.* **1996**, *40*, 441–451.
- [15] „‘Fertile’ intestine nuclei“: J. B. Gurdon, V. Uehlinger, *Nature* **1966**, *210*, 1240–1241.
- [16] „Genetic content of adult somatic cells tested by nuclear transplantation from cultured cells“: R. A. Laskey, J. B. Gurdon, *Nature* **1970**, *228*, 1332–1334.
- [17] „Development and cellular differentiation of neural nuclear transplants of known karyotype“: M. A. DiBerardino, T. J. King, *Dev. Biol.* **1967**, *15*, 102–128.
- [18] „Epigenetic memory of active gene transcription is inherited through somatic cell nuclear transfer“: R. K. Ng, J. B. Gurdon, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2005**, *102*, 1957–1962.
- [19] „Epigenetic memory of an active gene state depends on histone H3.3 incorporation into chromatin in the absence of transcription“: R. K. Ng, J. B. Gurdon, *Nat. Cell Biol.* **2008**, *10*, 102–109.
- [20] „*Xenopus laevis* B4, an intron-containing oocyte-specific linker histone-encoding gene“: H. Cho, A. P. Wolffe, *Gene* **1994**, *143*, 233–238.
- [21] „Cell-type of origin influences the molecular and functional properties of mouse induced pluripotent stem cells“: J. M. Polo, S. Liu, M. E. Figueroa, W. Kulalert, S. Eminli et al., *Nat. Biotechnol.* **2010**, *28*, 848–855.
- [22] „Sheep cloned by nuclear transfer from a cultured cell line“: K. H. Campbell, J. McWhir, W. A. Ritchie, I. Wilmut, *Nature* **1996**, *380*, 64–66.
- [23] „Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells“: I. Wilmut, A. E. Schnieke, J. McWhir, A. J. Kind, K. H. S. Campbell, *Nature* **1997**, *385*, 810–813.
- [24] „Inability of mouse blastomere nuclei transferred to enucleated zygotes to support development in vitro“: J. McGrath, D. Solter, *Science* **1984**, *226*, 1317–1319.
- [25] „Developmental reprogramming after chromosome transfer into mitotic mouse zygotes“: D. Egli, J. Rosains, G. Birkhoff, K. Eggan, *Nature* **2007**, *447*, 679–685.
- [26] „Monoclonal mice generated by nuclear transfer from mature B and T donor cells“: K. Hochedlinger, R. Jaenisch, *Nature* **2002**, *415*, 1035–1038.
- [27] „Full-term development of mice from enucleated oocytes injected with cumulus cell nuclei“: T. Wakayama, A. C. Perry, M. Zuccotti, K. R. Johnson, R. Yamagimachi, *Nature* **1998**, *394*, 369–374.
- [28] „Nuclear transplantation in eggs and oocytes“: J. B. Gurdon, *J. Cell Sci. Suppl.* **1986**, *4*, 287–318.
- [29] R. G. McKinnell, *Cloning: nuclear transplantation in Amphibia*, University of Minnesota Press, Minneapolis, **1978**.
- [30] „Gene reactivation in erythrocytes: nuclear transplantation in oocytes and eggs of *Rana*“: M. A. DiBerardino, N. J. Hoffner, *Science* **1983**, *219*, 862–864.
- [31] „From nuclear transfer to nuclear reprogramming: the reversal of cell differentiation“: J. B. Gurdon, *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **2006**, *22*, 1–22.
- [32] „RNA synthesis in an amphibian nuclear-transplant hybrid“: H. R. Woodland, J. B. Gurdon, *Dev. Biol.* **1969**, *20*, 89–104.
- [33] J. Brachet, *Biochemical Cytology*, Academic Press, New York, **1957**, S. 516.
- [34] „The use of frog eggs and oocytes for the study of messenger RNA and its translation in living cells“: J. B. Gurdon, C. D. Lane, H. R. Woodland, G. Marbaix, *Nature* **1971**, *233*, 177–182.
- [35] „The translation of mammalian globin mRNA injected into fertilised eggs of *Xenopus laevis*. II. The distribution of globin synthesis in different tissues“: H. R. Woodland, J. B. Gurdon, J. B. Lingrel, *Dev. Biol.* **1974**, *39*, 134–140.
- [36] „Graded changes in dose of a *Xenopus* activin A homologue elicit stepwise transitions in embryonic cell fate“: J. B. Green, J. C. Smith, *Nature* **1990**, *347*, 391–394.
- [37] „The interpretation of position in a morphogen gradient as revealed by occupancy of activin receptors“: S. Dyson, J. B. Gurdon, *Cell* **1998**, *93*, 557–568.
- [38] „Deficient induction response in a *Xenopus* nucleocytoplasmic hybrid“: P. Narbonne, D. E. Simpson, J. B. Gurdon, *PLoS Biol.* **2011**, *9*, e1001197.
- [39] „A community effect in animal development“: J. B. Gurdon, *Nature* **1988**, *336*, 772–774.
- [40] „Amino acid sensing mechanisms: an Achilles heel in cancer?“: R. F. Lamb, *FEBS J.* **2012**, *279*, 2624–2631.
- [41] „The induction of DNA synthesis by frog egg cytoplasm“: C. F. Graham, K. Arms, J. B. Gurdon, *Dev. Biol.* **1966**, *14*, 349–381.
- [42] „S phase of the cell cycle“: R. A. Laskey, M. P. Fairman, J. J. Blow, *Science* **1989**, *246*, 609–614.
- [43] „Eukaryotic DNA replication origins: many choices for appropriate answers“: M. Méchali, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2010**, *11*, 728–738.
- [44] „Molecular biology in a living cell“: J. B. Gurdon, *Nature* **1974**, *248*, 772–776.
- [45] „The Croonian Lecture, 1981. Lampbrush chromosomes“: H. G. Callan, *Proc. R. Soc. London Ser. B* **1982**, *214*, 417–418.
- [46] „Assembly of lampbrush chromosomes from sperm chromatin“: J. G. Gall, C. Murphy, *Mol. Biol. Cell* **1998**, *9*, 733–747.
- [47] „Purified DNAs are transcribed after microinjection into *Xenopus* oocytes“: J. E. Mertz, J. B. Gurdon, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1977**, *74*, 1502–1506.
- [48] „High fidelity transcription of 5S DNA injected into *Xenopus* oocytes“: D. D. Brown, J. B. Gurdon, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1977**, *74*, 2064–2068.
- [49] „Mammalian Nuclear Transplantation to Germinal Vesicle stage *Xenopus* Oocytes—A Method for Quantitative Transcriptional Reprogramming“: R. P. Halley-Stott, V. Pasque, C. Astrand, K. Miyamoto, I. Simeoni, J. Jullien, J. B. Gurdon, *Methods* **2010**, *51*, 56–65.
- [50] „Gene activation in somatic nuclei after injection into amphibian oocytes“: E. M. De Robertis, J. B. Gurdon, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1977**, *74*, 2470–2474.
- [51] „Nuclear localization of an oocyte component required for the stability of injected DNA“: A. H. Wyllie, J. B. Gurdon, J. Price, *Nature* **1977**, *268*, 150–152.
- [52] „Characterization of somatic cell nuclear reprogramming by oocytes in which a linker histone is required for pluripotency gene reactivation“: J. Jullien, C. Astrand, R. P. Halley-Stott, N. Garrett, J. B. Gurdon, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2010**, *107*, 5483–5488.
- [53] „Expression of a histone H1-like protein is restricted to early *Xenopus* development“: R. C. Smith, E. Dworkin-Rastl, M. B. Dworkin, *Genes Dev.* **1988**, *2*, 1284–1295.
- [54] „Nuclear actin polymerization is required for transcriptional reprogramming of Oct4 by oocytes“: K. Miyamoto, V. Pasque, J. Jullien, J. B. Gurdon, *Genes Dev.* **2011**, *25*, 946–958.
- [55] J. Jullien et al., unveröffentlichte Ergebnisse.
- [56] „Cytoplasmic activation of human nuclear genes in stable heterokaryons“: H. M. Blau, C. P. Chiu, C. Webster, *Cell* **1983**, *32*, 1171–1180.
- [57] „Induced pluripotent stem cells: past, present, and future“: S. Yamanaka, *Cell Stem Cell* **2012**, *10*, 676–684.
- [58] „Histone variant macroH2A confers resistance to nuclear reprogramming“: V. Pasque, A. Gillich, N. Garrett, J. B. Gurdon, *EMBO J.* **2011**, *30*, 2373–2387.
- [59] R. P. Halley-Scott et al., unveröffentlichte Ergebnisse.