

# Einführung in die Gentechnologie

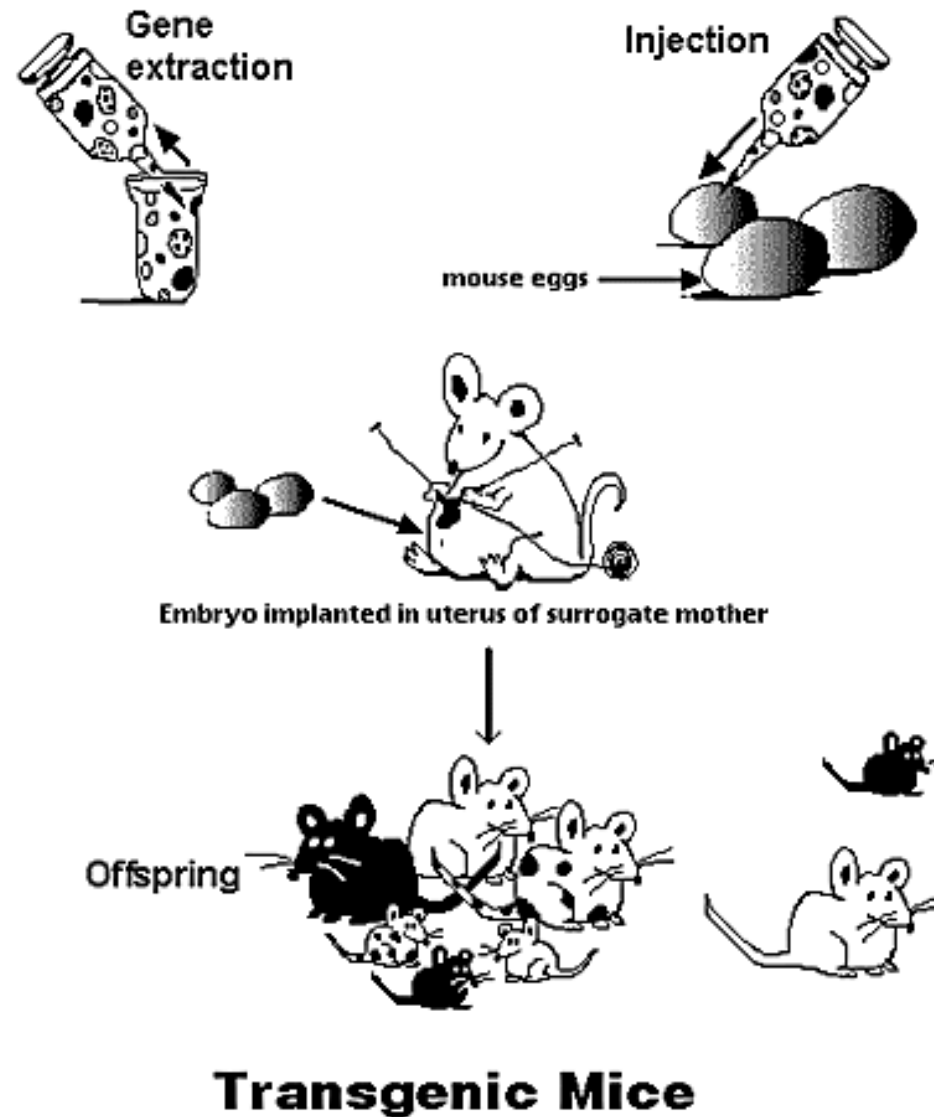
## Erwin R. Schmidt

- Vorlesung # 5
- 13. 05. 2008

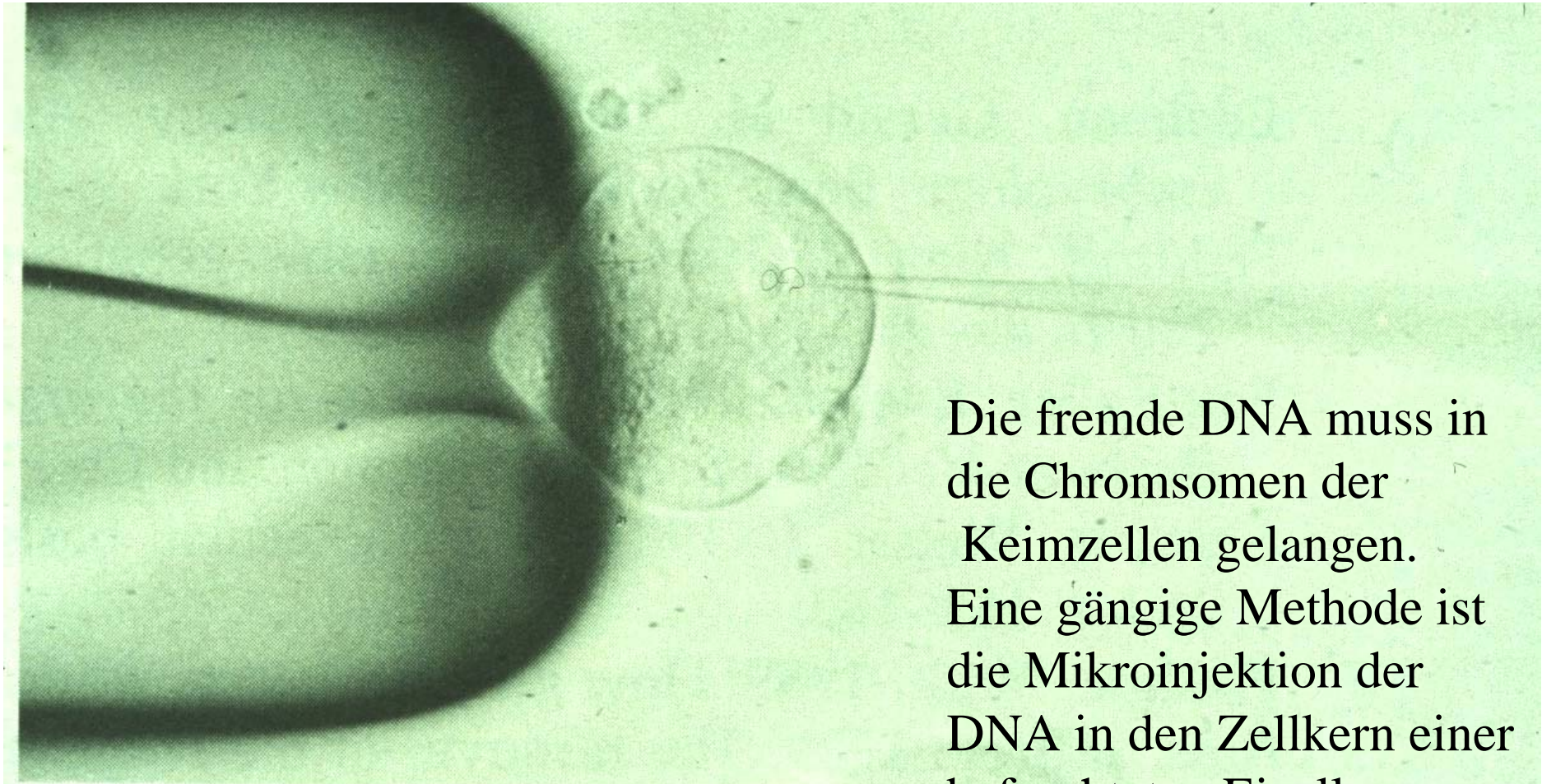
# „Klassische“ DNA-vermittelte Transformation von Säugern

1. Transgene Mäuse durch DNA-Mikroinjektion
2. Transgene/knock out-Mäuse aus gentechnisch veränderten embryonalen Stammzellen

# Herstellung einer transgenen Maus



# Gentechnologie an höheren Organismen ist komplizierter als bei Bakterien wegen der Vielzelligkeit solcher Organismen



Die fremde DNA muss in die Chromsomen der Keimzellen gelangen. Eine gängige Methode ist die Mikroinjektion der DNA in den Zellkern einer befruchteten Eizelle

## **Microinjection of a One-celled Mouse Embryo**

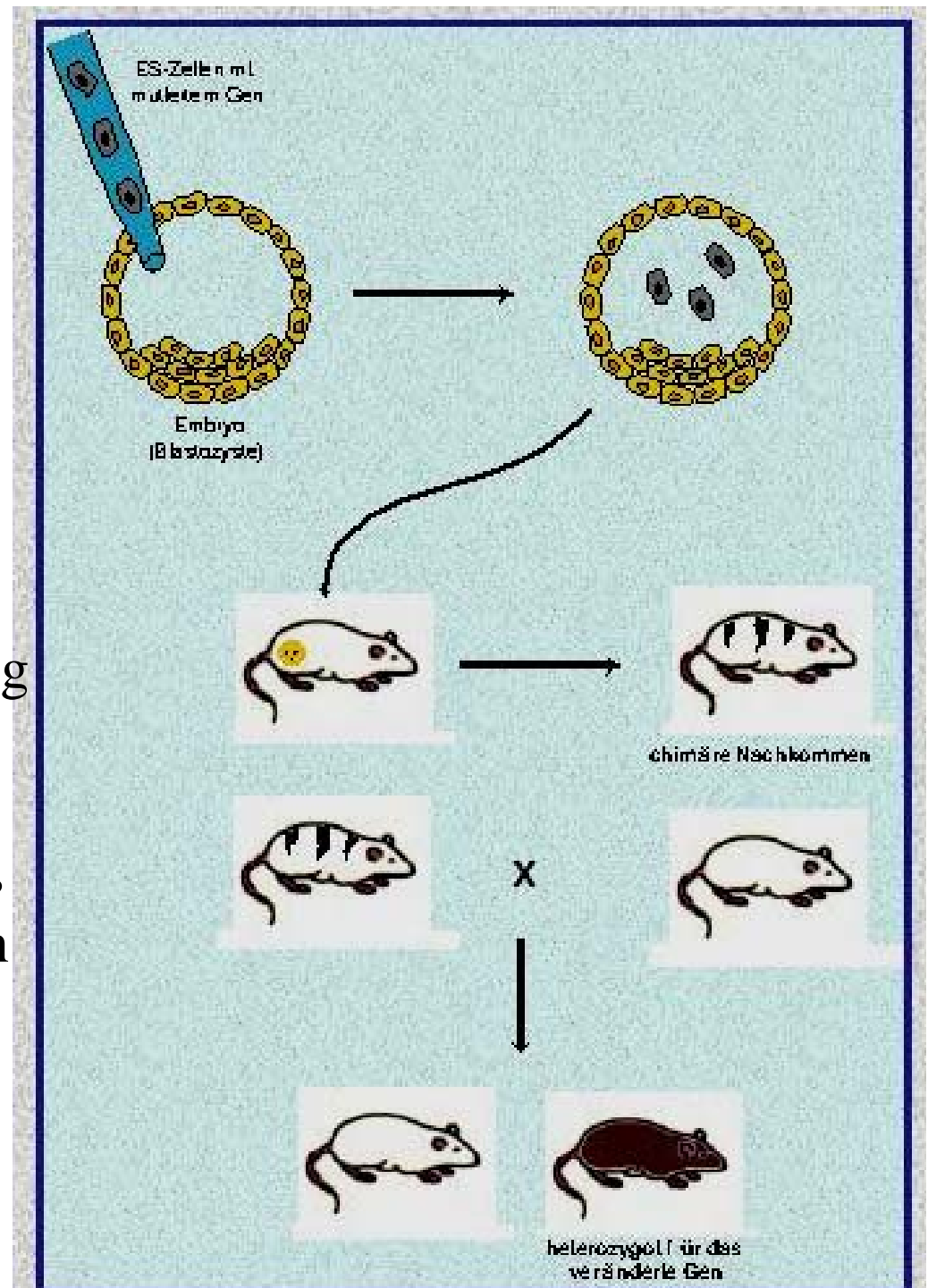
(Courtesy of Mark Steinhelper, Cold Spring Harbor Laboratory.)

Mit der DNA-Mikroinjektion ist es bei zahlreichen Tierarten gelungen, Gene dauerhaft in die Chromosomen zu integrieren

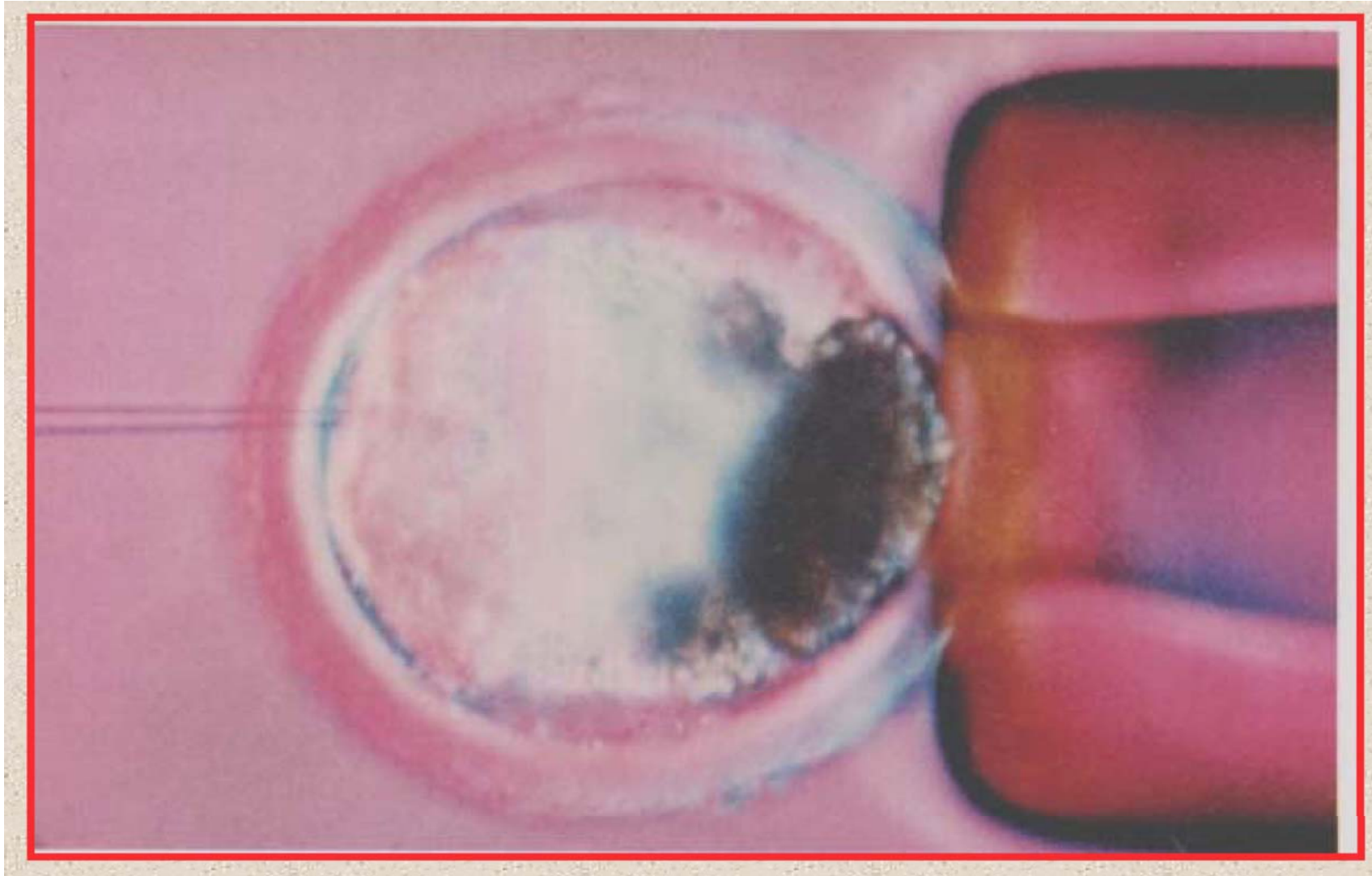
- Maus
- Rind
- Schwein
- Kaninchen
- Pferd
- Schaf

- Ratte
  - Lachs
  - Barsch
  - Forelle
  - Kaninchen
- und andere

Ein besonderes Verfahren zur Herstellung transgener Mäuse ist die Verwendung embryonaler Stammzellen (ES-Zellen: gentechnisch veränderte embryonale Stammzellen („schwarze“ Zellen in der Abb.) werden in einen frühen Embryo (Blastozyste) injiziert. Die ES-Zellen nehmen an der Entwicklung teil. Es entsteht ein chimäre Maus (erkennbar am gescheckten Fell). Auch die Keimzellen dieser Maus stammen z. T. von den transgenen ES-Zellen ab. Durch Kreuzung entstehen Mäuse, die von den transgenen ES-Zellen abstammen (schwarze Maus).



# Injektion von embryonalen Stammzellen in eine Maus Blastozyste



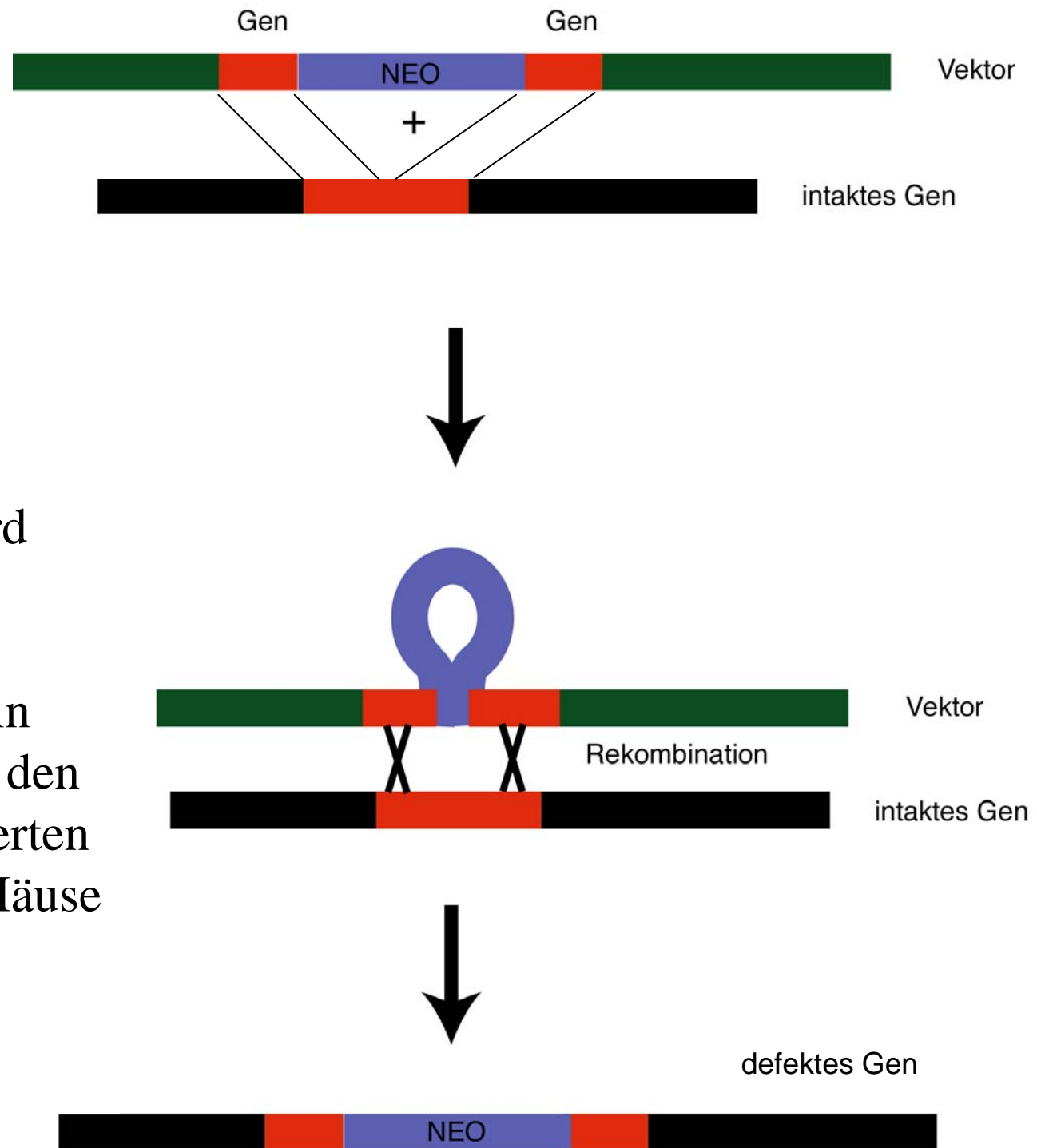
# Maus-Chimären aus embryonalen Stammzellen-Transplantaten



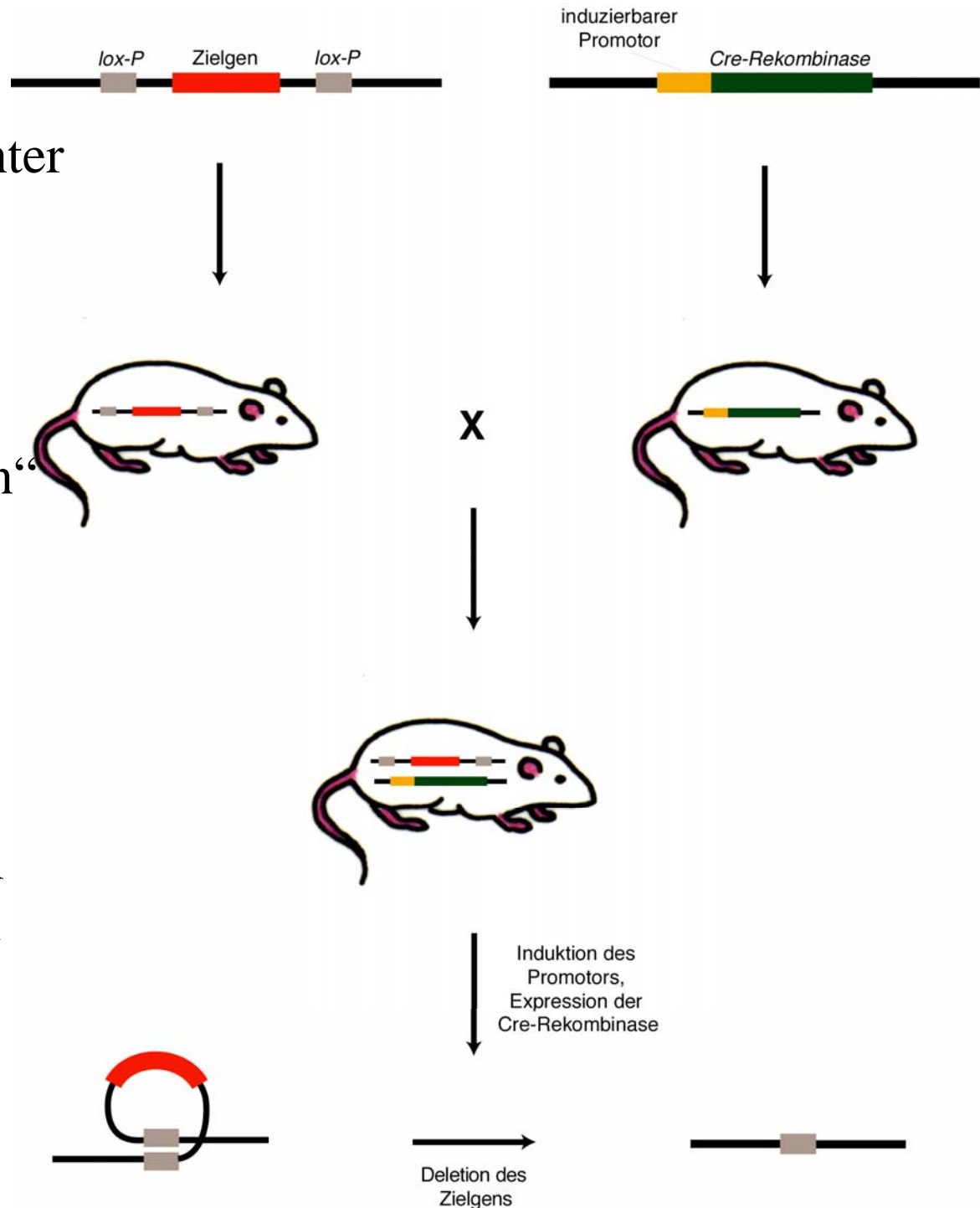
Ein besonderes  
Verfahren ist die  
Herstellung von so  
genannten

**„knock out“  
(k.o.)-Mäusen:**

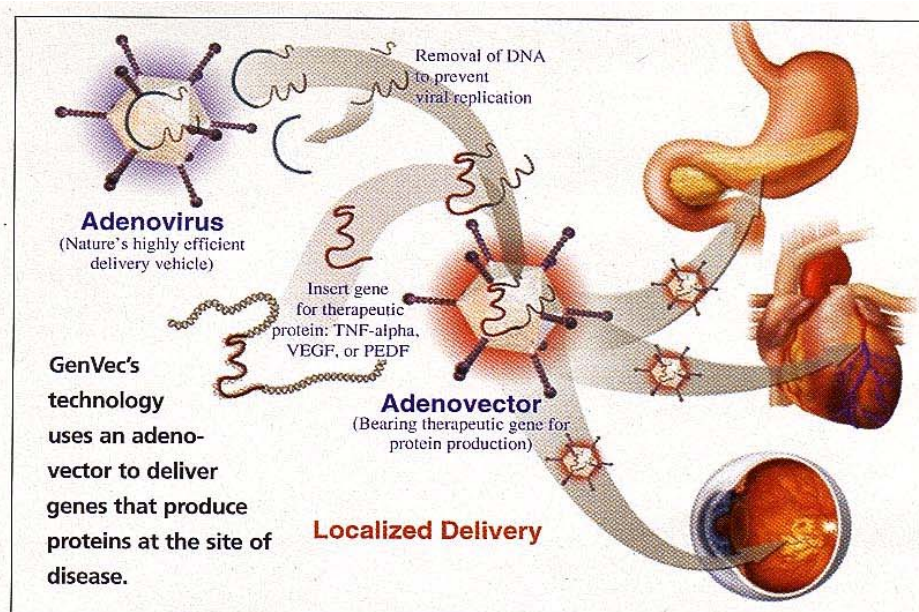
In einer ES-Zelle wird  
durch **homologe  
Rekombination** ein  
intaktes Gen durch ein  
defektes ersetzt. Aus den  
gentechnisch veränderten  
ES-Zellen werden Mäuse  
regeneriert mit dem  
defekten Gen (siehe  
vorherige Folie)



Der Knock-out kann auch „konditional“ sein, d. h. unter bestimmten Bedingungen, nach Belieben induziert werden, indem eine intakte Genkopie von zwei „Rekombinationssequenzen“ (z. B. lox-P-Sequenzen) flankiert in die Maus eingebaut wird. Durch Einkreuzen eines Rekombinase-Gens wird die Genkopie aus dem Chromosom heraus geworfen und damit funktionsunfähig



# Gene therapy mit Hilfe von Stammzellen



## Gene Activity Therapeutics Enter Phase II Trials

Bonnie Joy Sedlak, Ph.D.

The United States suspended three gene therapy trials for SCID (Severe Combined Immuno-deficiency) after two of the ten French boys originally treated for SCID developed leukemia at about two and a half years of age.

All the boys in France were cured of the genetic disorder and all but two are healthy. Scientists found that in both cases the retrovirus used to deliver the gene was inserted in or near *LMO-2*, a cancer-promoting gene.

The boys were treated in 1999 when they were between one and eleven months old. The ex vivo gene therapy protocol took the boy's bone marrow stem cells, used retroviral vectors to deliver the missing gene, and injected the treated cells back into the boys. The two boys who developed can-



Klonierte schweine

# Was ist Totipotenz, was ist Pluripotenz?

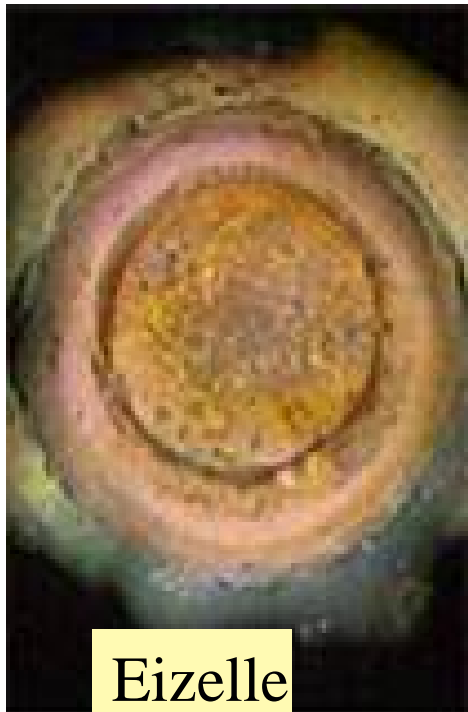
- **Totipotenz:** die Zellen sind in der Lage sich in alle in einem Organismus jemals vorhandene Zellen zu differenzieren (z. B. auch in Trophoblastenzellen)
- daraus folgt: aus solchen Zellen kann sich ein Mensch entwickeln
- **Pluripotenz:** die Zellen können sich noch in sehr viele verschiedene Zellen differenzieren, aber nicht mehr in alle ( z. B. nicht mehr in Trophoblasten-Zellen)

Totipotente Zellen können  
sich in Zellen aller drei  
Keimblätter entwickeln

- **Ektoderm**
- **Endoderm**
- **Mesoderm**

**Was sind (embryonale)  
Stammzellen?  
Wozu brauchen wir sie?**

Ein Organismus entwickelt sich  
aus einer einzigen Zelle:  
der befruchteten Eizelle



Eizelle



Zweizellstadium



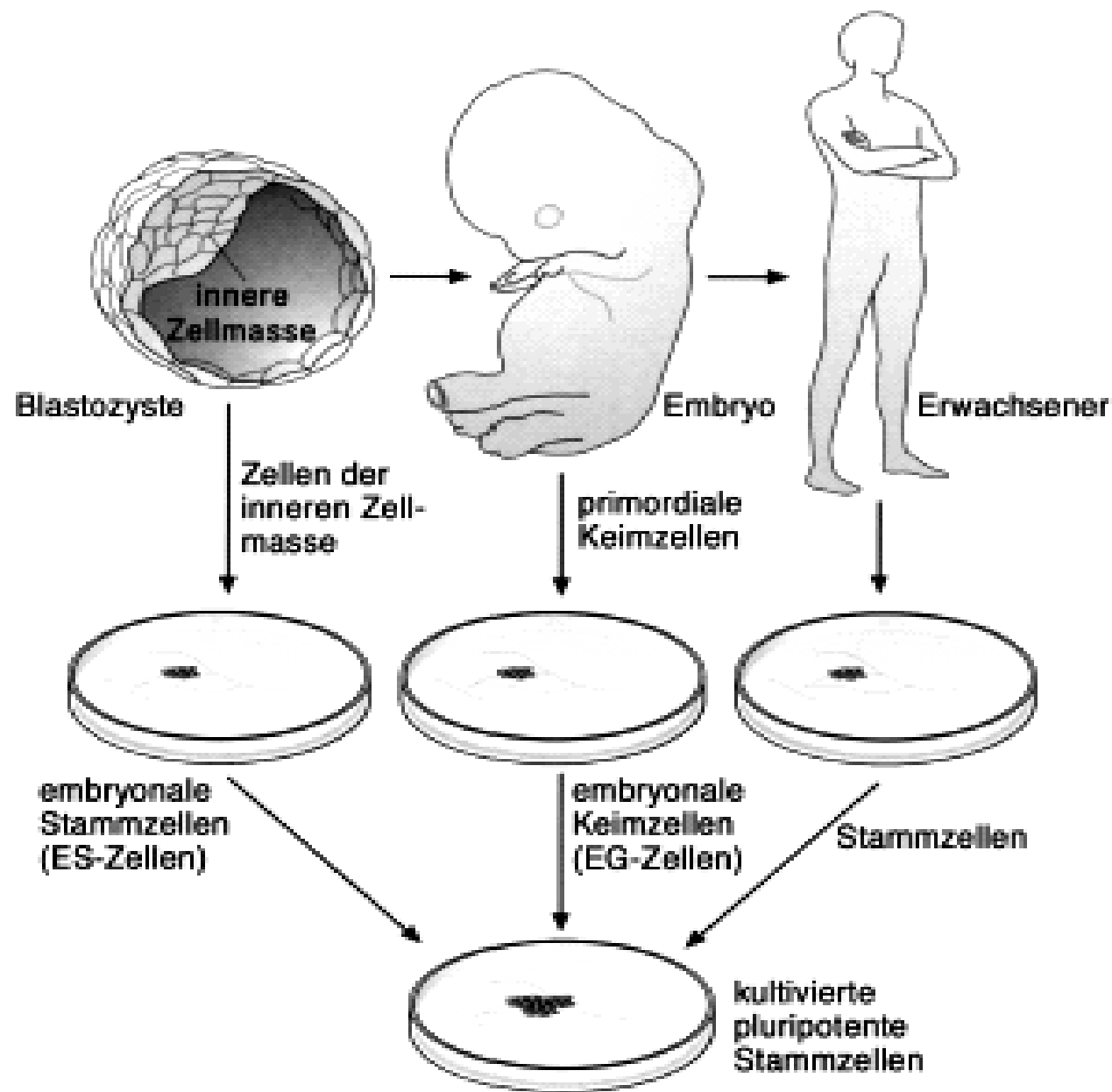
Achtzellstadium

# Es gibt verschiedene Arten von Stammzellen:

- embryonale Stammzellen (ES-Zellen)
- embryonale (fetale) „Keim“-Stammzellen (EG-Zellen, von „embryonic germ cells“)
- adulte Stammzellen  
z. B. hämatopoetische Stammzellen aus Knochenmark

## Die verschiedenen Stammzellen werden nach ihrer Herkunft benannt

- **ES-Zellen** werden aus **frühen Embryonen** gewonnen
- **EG-Zellen** werden aus primordialen Keimzellen aus **Foeten** isoliert
- „**Adulte**“ **Stammzellen** werden aus verschiedenen **Organen** (Knochenmark, Gehirn, Blut, Leber, Retina etc) gewonnen



Quellen für Stammzellen aus menschlichen Geweben, verändert nach Gearhart, J.D. (2001, Potential der Stammzellenforschung für die Regeneration von Geweben und Organen, in BMBF, Humane Stammzellen, Schattauer Verlag, Seite 7)

# Die verschiedenen Stammzellen unterscheiden sich in ihren Eigenschaften

- **ES-Zellen** und **EG-Zellen** sind pluripotent (differenzieren zu Zellen aller drei Keimblätter) und bilden sog. „embryonic bodies“ in Kultur
- **ES-Zellen** wachsen besser (>500 Verdopplungen) in Zellkultur als **EG-Zellen** (max. 80 Verdoppl.)
- **ES-Zellen** bilden Teratome, **EG-Zellen** keine T.
- **Adulte Stammzellen** sind nicht pluripotent, die Plastizität der Zellen ist noch nicht abschließend geklärt

# Gewinnung von Stammzellen

ES-Zellen werden aus frühen Embryonen im Blastocystenstadium gewonnen

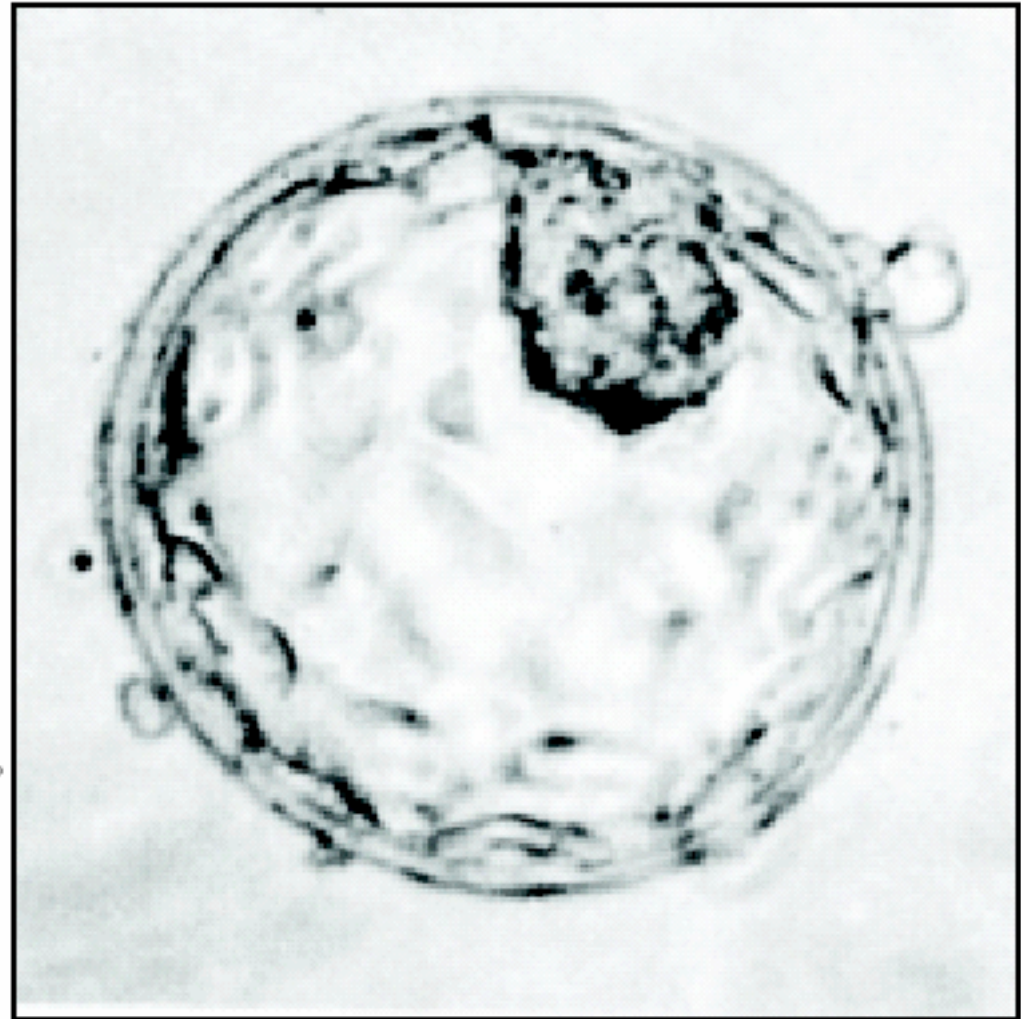


Photo Credit: Mt. J. Coraighan

Figure 3.1. Human Blastocyst Showing Inner Cell Mass and Trophectoderm.

# Entnahme embryonaler Stammzellen



# Entwicklung eines menschlichen Embryos:

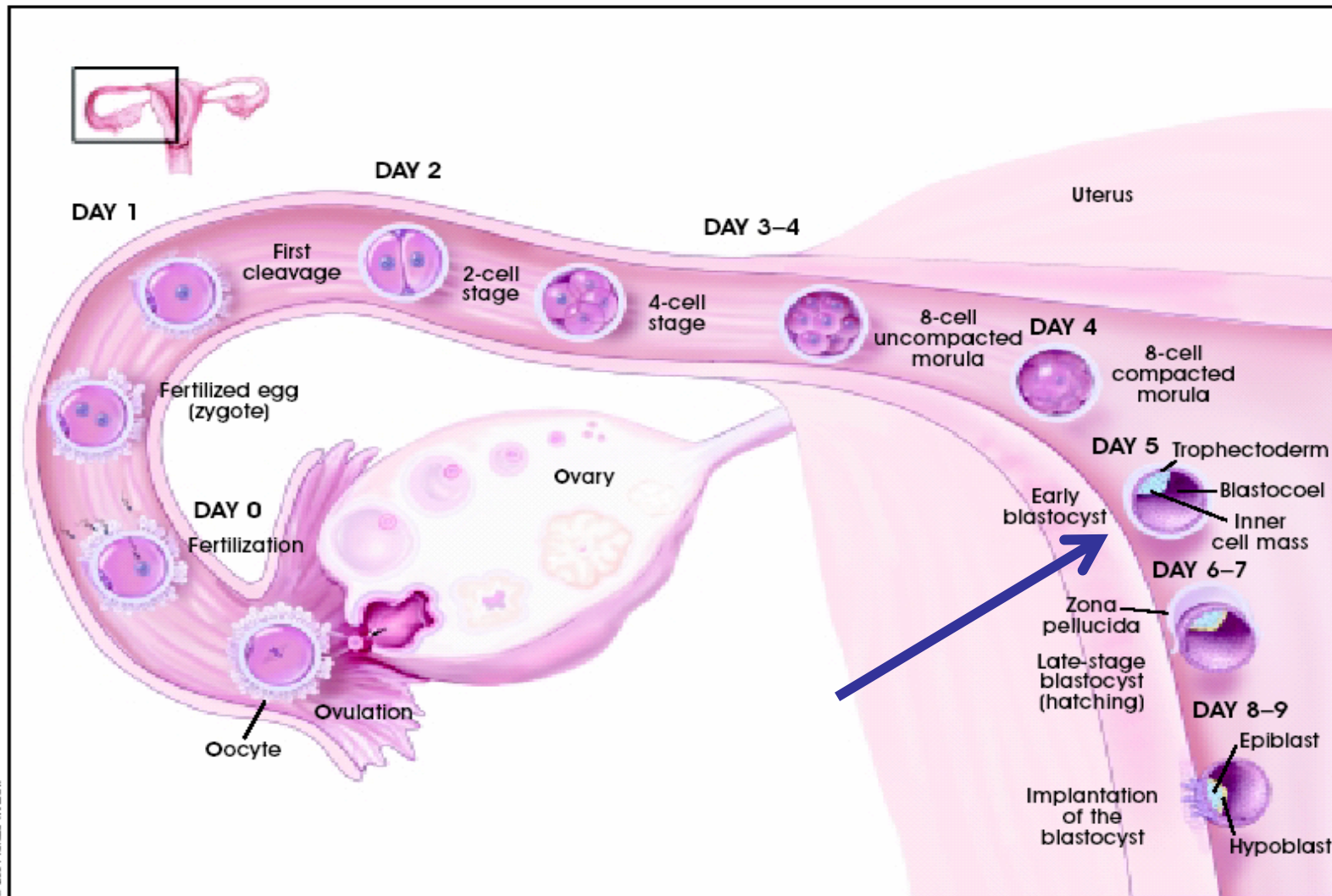


Figure A 2 Development of the Preimplantation Blastocyst in Humans

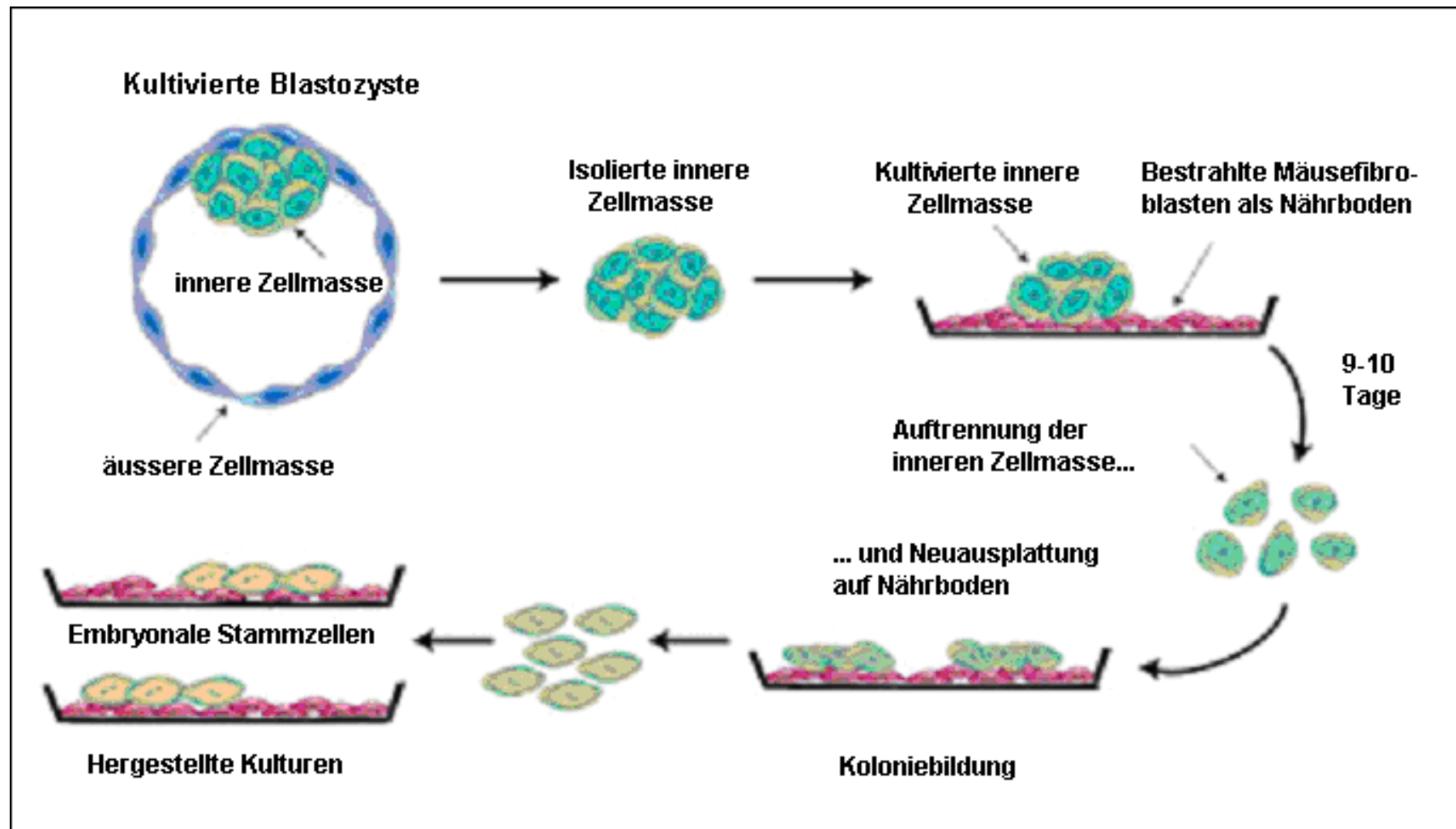
# Etablierung einer ES-Zellkultur

Zur Zeit gibt es zwischen 30 und 60  
humane ES-Zelllinien

# Gewinnung von ES-Zellen : Herkunft der Embryonen

- die menschlichen Embryonen stammen aus IVF-Behandlungen und sind „überzählig“ und werden „gespendet“
- weltweit werden derzeit mehr als 100.000 überzählige Embryonen tiefgekühlt gelagert

# Gewinnung von Stammzellen: ES-Zellen



# Sind embryonale Stammzellen noch totipotent?

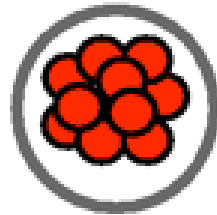
Im Stadium der Blastocyste (ca. 6 Tage nach Befruchtung) sind die Zellen bereits in zwei Gewebe differenziert, den **Trophoblasten** und den **Embryoblasten**. Es scheint, dass Embryoblastenzellen nicht mehr zu Trophoblasten reprogrammiert werden können

# Die früheste Differenzierung der embryonalen Stammzellen:

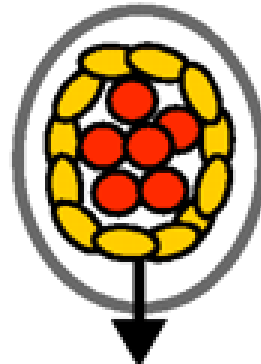
Erste Differenzierung in Trophoektoderm und primitives Endoderm wird durch differenzielle Oct4-Genexpression erreicht

(aus Pesce and Schöler)

**A** Morula

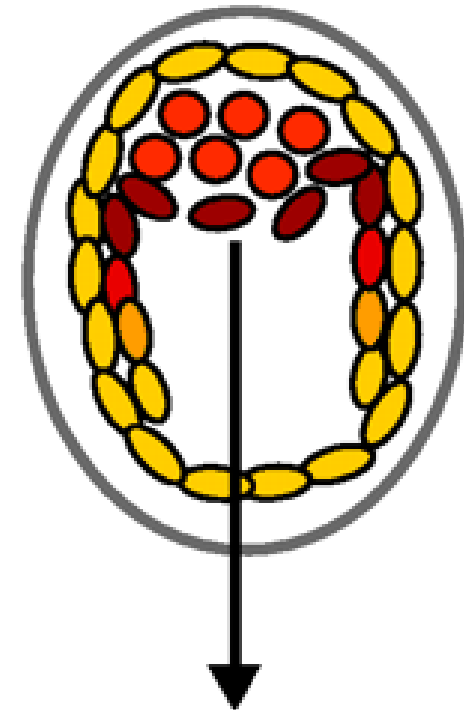


**B** Compacted morula

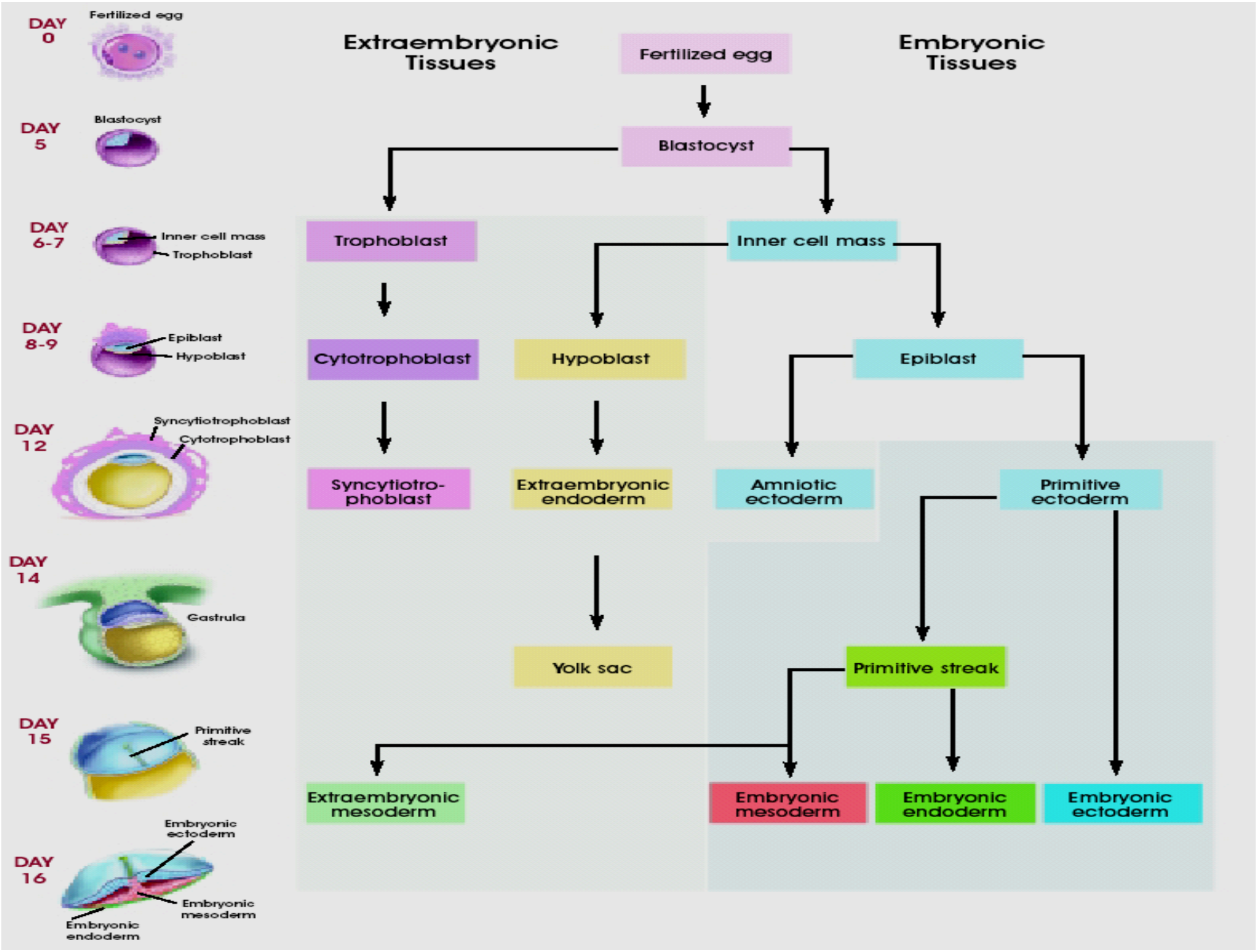


Oct-4 downregulation: trophoectoderm lineage

**C** Blastocyst



Oct-4 transient upregulation: the trigger for the formation of the primitive endoderm



# Etablierung einer Stammzelllinie:

**Wie viele Eizellen werden für eine Stammzelllinie benötigt?**

Bei der Etablierung der ersten menschlichen ES-Zelllinien (Thomson et al. 1998) wurden **36 Embryonen** eingesetzt, 20 entwickelten sich bis zur Blastocyste, davon wurden 14 Embryoblasten isoliert und kultiviert, daraus konnten erfolgreich **5 Zelllinien** etabliert werden (jede Zelllinie jeweils nur von einem Embryo)

# Müssen Embryonen speziell für die Stammzellerzeugung „gezüchtet“ werden?

Die ersten humanen ES-Zelllinien (Thomson et al. 1998) stammen sowohl aus eingefrorenen als auch aus „frischen“ Embryonen. Die Autoren erwähnen keine auffälligen Unterschiede zwischen eingefrorenen und „frischen“ Embryonen

# Kann man ES-Zellen im Reagenzglas zu Organen heranzüchten?

Kultivierte **Mensch-ES-Zellen** konnten zur Differenzierung in mehr als **10 verschiedene Zell-/Gewebetypen** angeregt werden:

z.B. Herzmuskelzellen, Gehirnzellen, Knochen- und Knorpelzellen, Nierenzellen, Leber, Pankreas, Ganglienzellen, glatte Muskelzellen, Darmepithel u. a.. Fraglich ist, ob sich daraus Keimzellen entwickeln können. Das scheint nach neuesten Erkenntnissen aber möglich zu sein!

Kultivierte **Maus-ES-Zellen** konnten zur Differenzierung in mehr als **34 verschiedene Gewebe/Zellen** angeregt werden

Ist schon bewiesen,  
dass ES-Zelltransplantationen  
Erkrankungen heilen können?

**In Tierversuchen, eindeutig ja:**

Beispiele

Autoimmunerkrankungen(Maus),

Diabetes (Maus),

Amyotrophe Lateralsklerose (ALS, deg Motoneuronen, Ratte)

Parkinson (Mensch, fetale Stammzellen -ohne Doppelblind-Studie-)

Herzinfarkt (Maus, Ratte, mit adulten Stammzellen)

# Gentechnische Modifikation zur Verhinderung der Abstoßungsreaktion

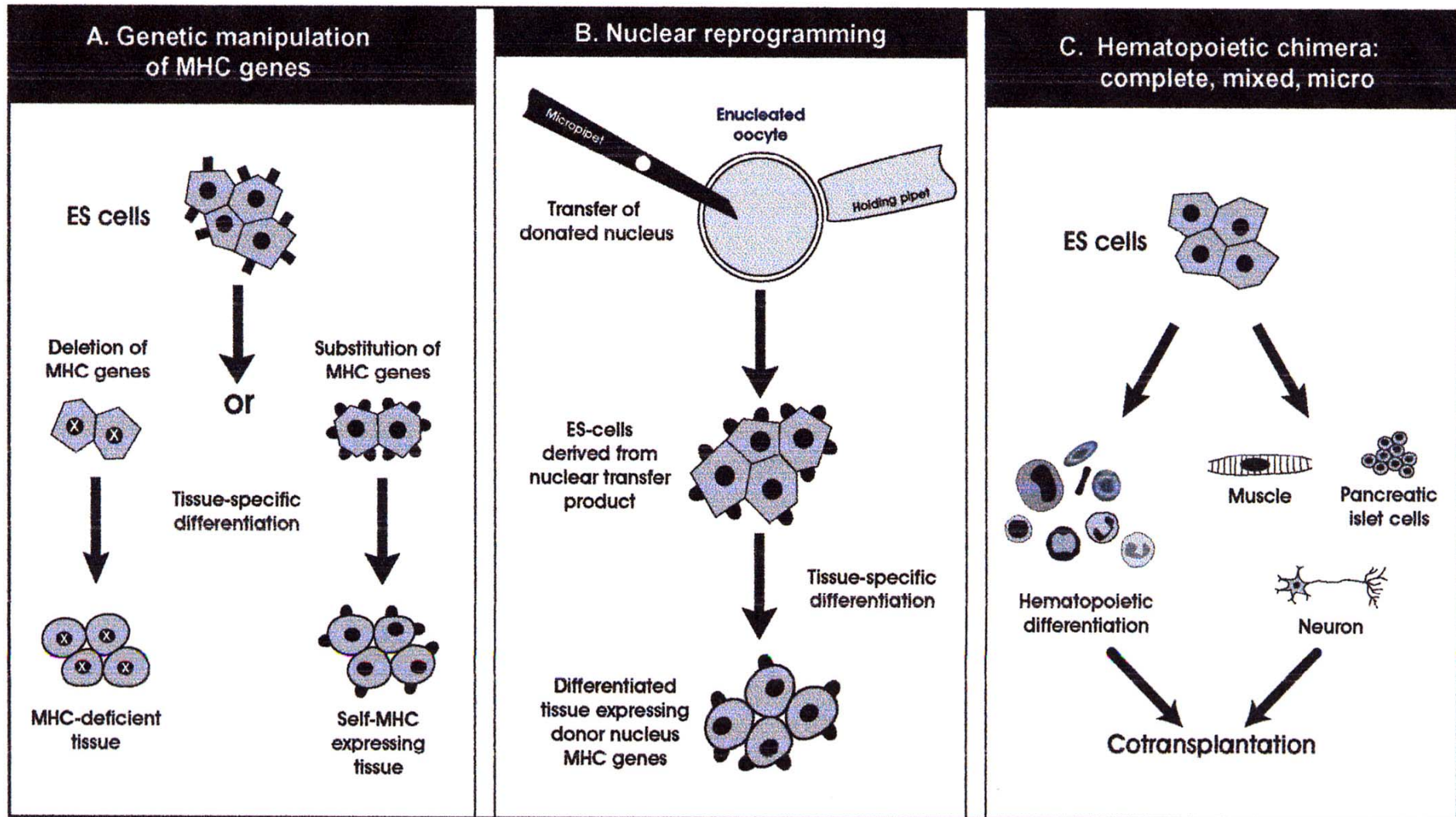


Figure 3.3. Genetic Manipulation of Human Embryonic Stem Cells. (Reproduced with permission from Stem Cells, 2001)

Embryonale Stammzellen  
haben sicher das größte  
Entwicklungspotenzial, zu ihrer  
Gewinnung müssen aber  
Embryonen hergestellt oder  
vorhandene Embryonen (sog  
„überzählige“ Embryonen z. B.  
aus IVF) zerstört werden.

„Künstliche“ Embryonale  
Stammzellen (iPS) aus  
Fibroblasten durch Aktivierung  
der Gene

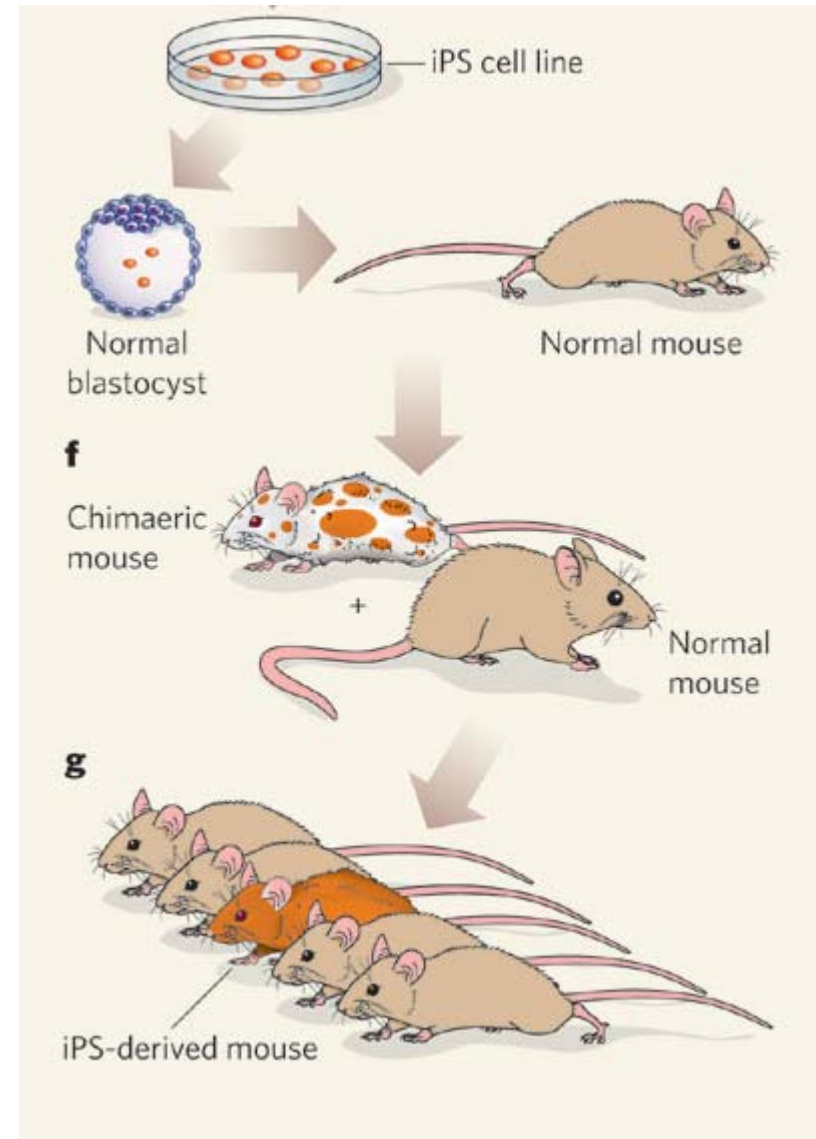
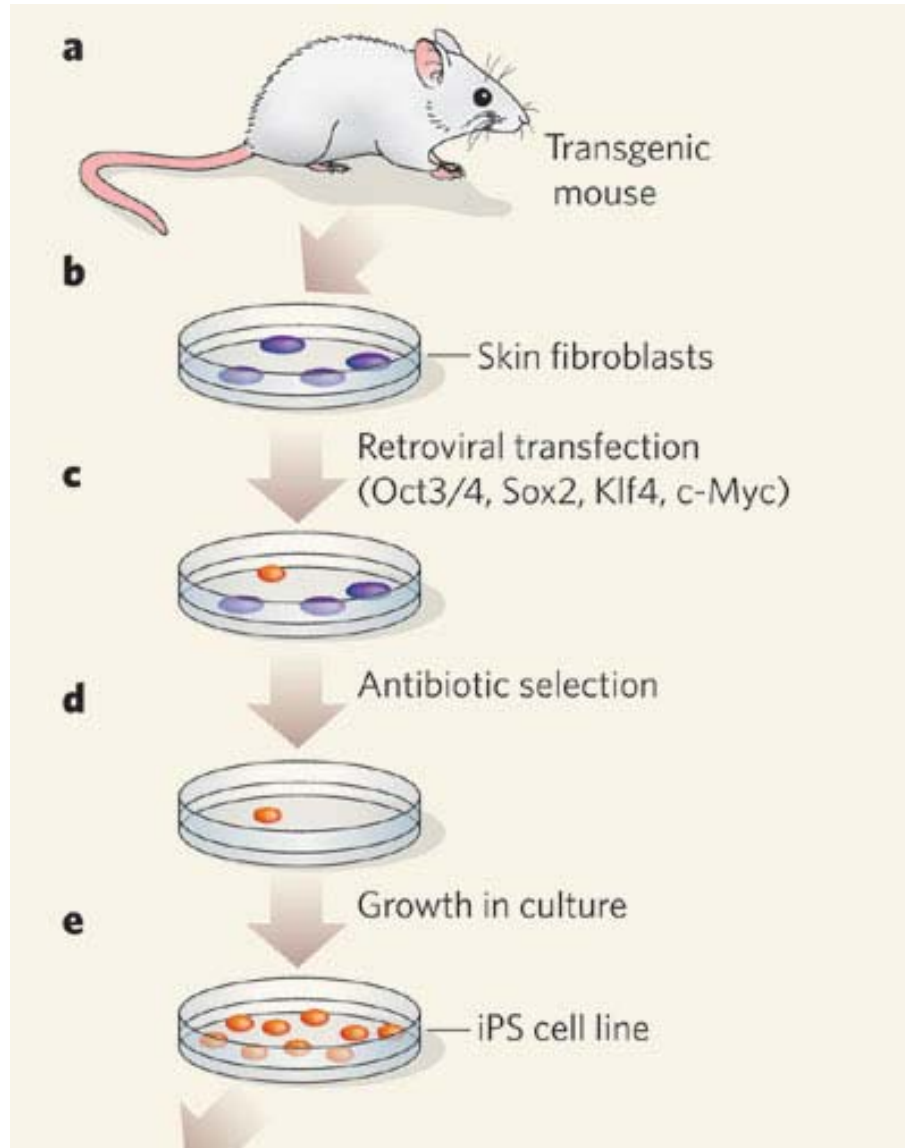
*Oct4, Sox2, cMyc* und *Klf4*.

Ca. 1 von 1000 Zellen  
entwickelt ES-Cell Phänotyp

.Takahashi, K., and Yamanaka, S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. Cell 126:663-676, 2006.

Marius Wernig(1\*), Alexander Meissner(1\*), Ruth Foreman(1,2\*), Tobias Brambrink(1\*), Manching Ku(3\*), Konrad Hochedlinger(1^), Bradley E. Bernstein(3,4,5) & Rudolf Jaenisch(1,2) , Nature Juni 2007

# Herstellung künstlicher ES-Zellen



# Chimäre Maus mit künstlichen ES-Zell-Arealen



# EG(embryonic germ)-Zellen

- werden aus 8-10 Wochen alten Feten isoliert
- EG-Zellen sind ES-Zellen sehr ähnlich
- EG Zellen sind vermutlich auch pluripotent
- bisher deutlich weniger Studien mit EG Zellen

# EG/ES-Zellen

## Unterschiede:

Obwohl ES- und EG-Zellen ähnliche „embryonic bodies“ bilden, scheint das **Differenzierungspotenzial** von EG-Zellen deutlich **geringer** zu sein

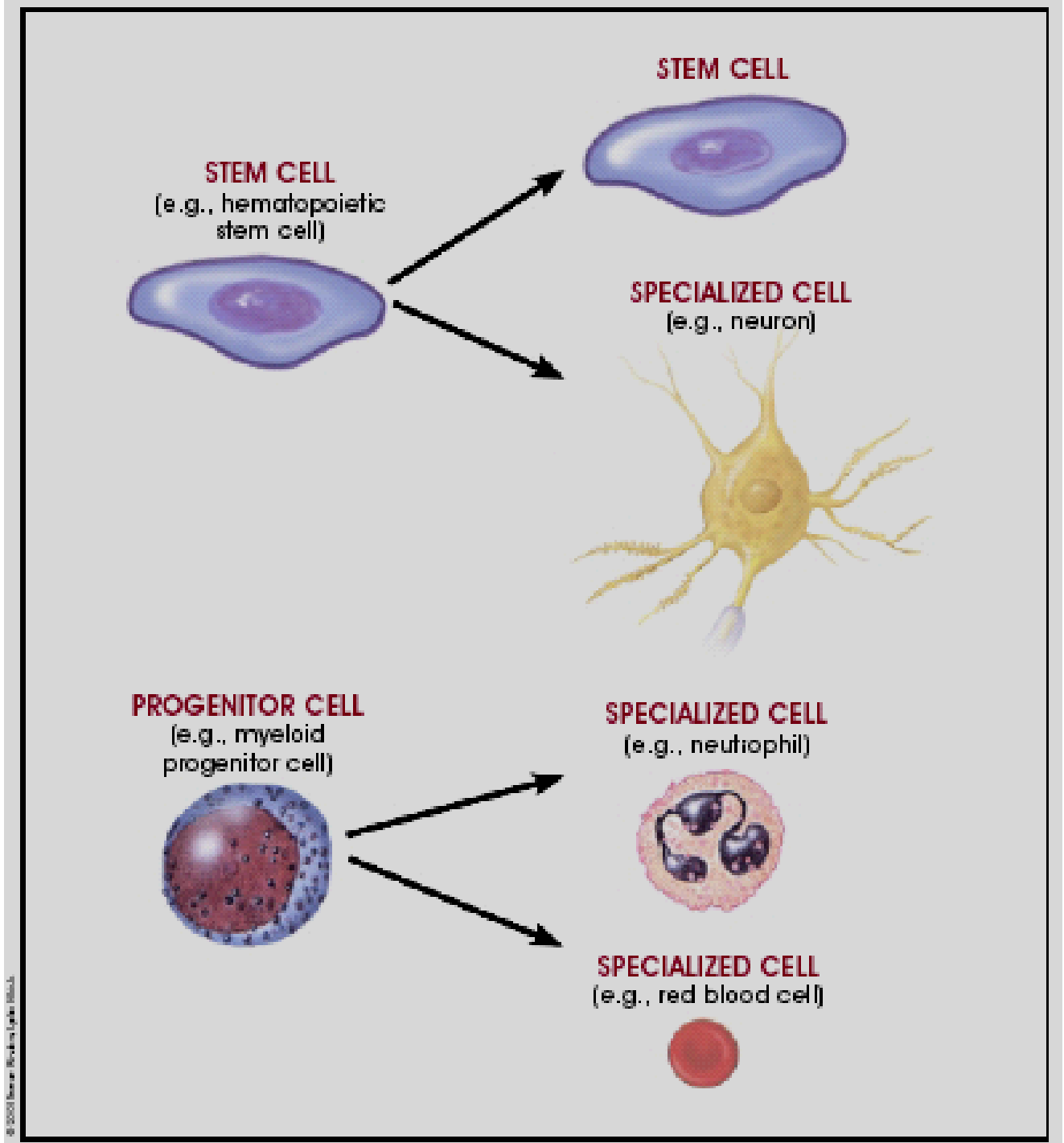
EG Zellen bilden auch **keine Teratome** nach Injektion in Mäuse!

EG Zellen haben deutlich **geringeres Wachstumspotenzial** (< 80 Verdopplungen)

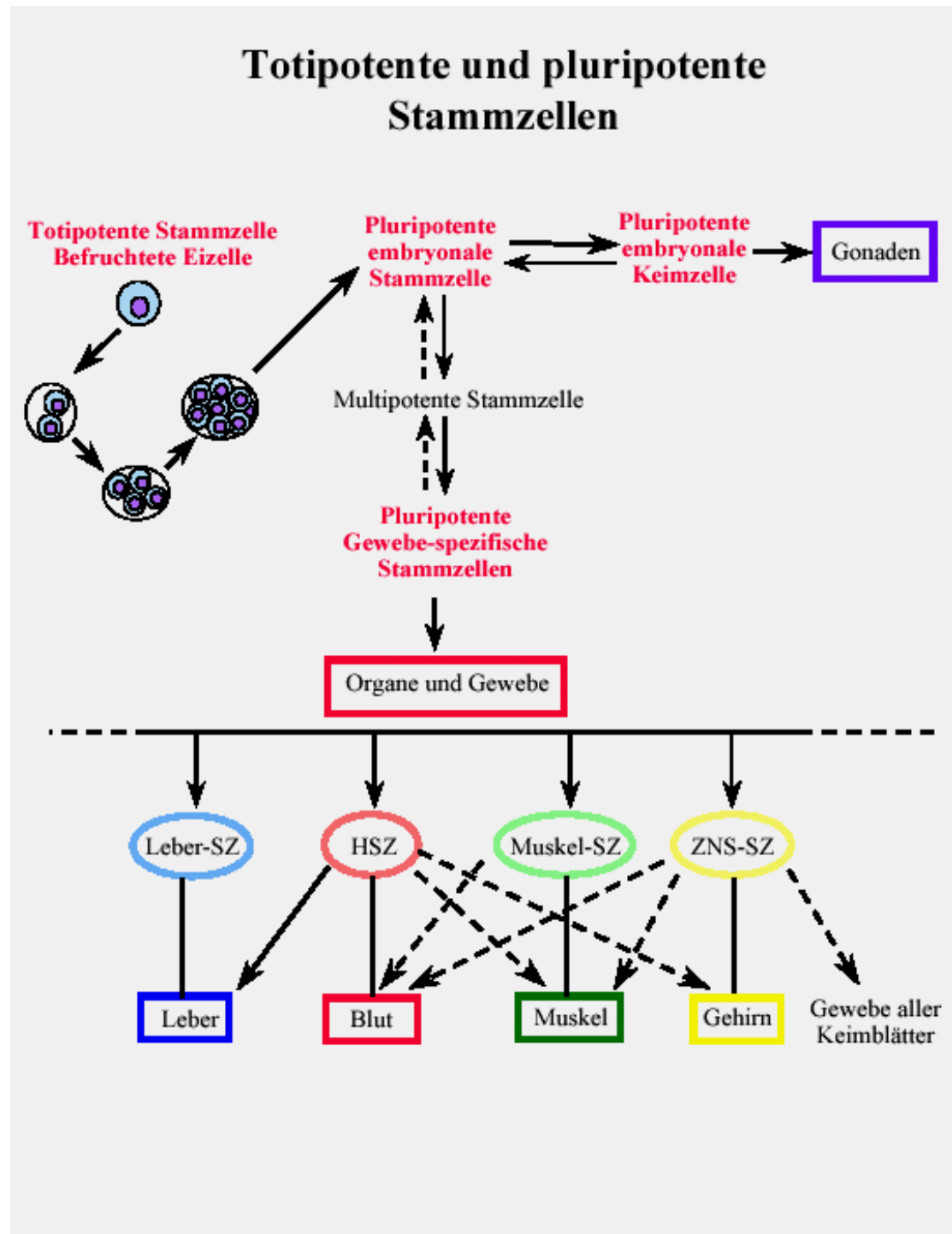
# „Adulte“ Stammzellen

- **adulte Stammzellen finden sich in sehr vielen verschiedenen Geweben, z.B. Knochenmark, Blut (Nabelschnur!), fetales und adultes Gehirn, Leber, Pankreas, Skelettmuskel, u. a.**
- **sind schwer zu identifizieren**
- **sind sehr selten, z. B. 1 von 15.000 Zellen im Knochenmark, 1 von 100. 000 im Gehirn**
- **Gewinnung z. T. sehr schwierig**

„Adulte“  
Stamm-  
zellen  
oder  
Vorläufer-  
zellen?

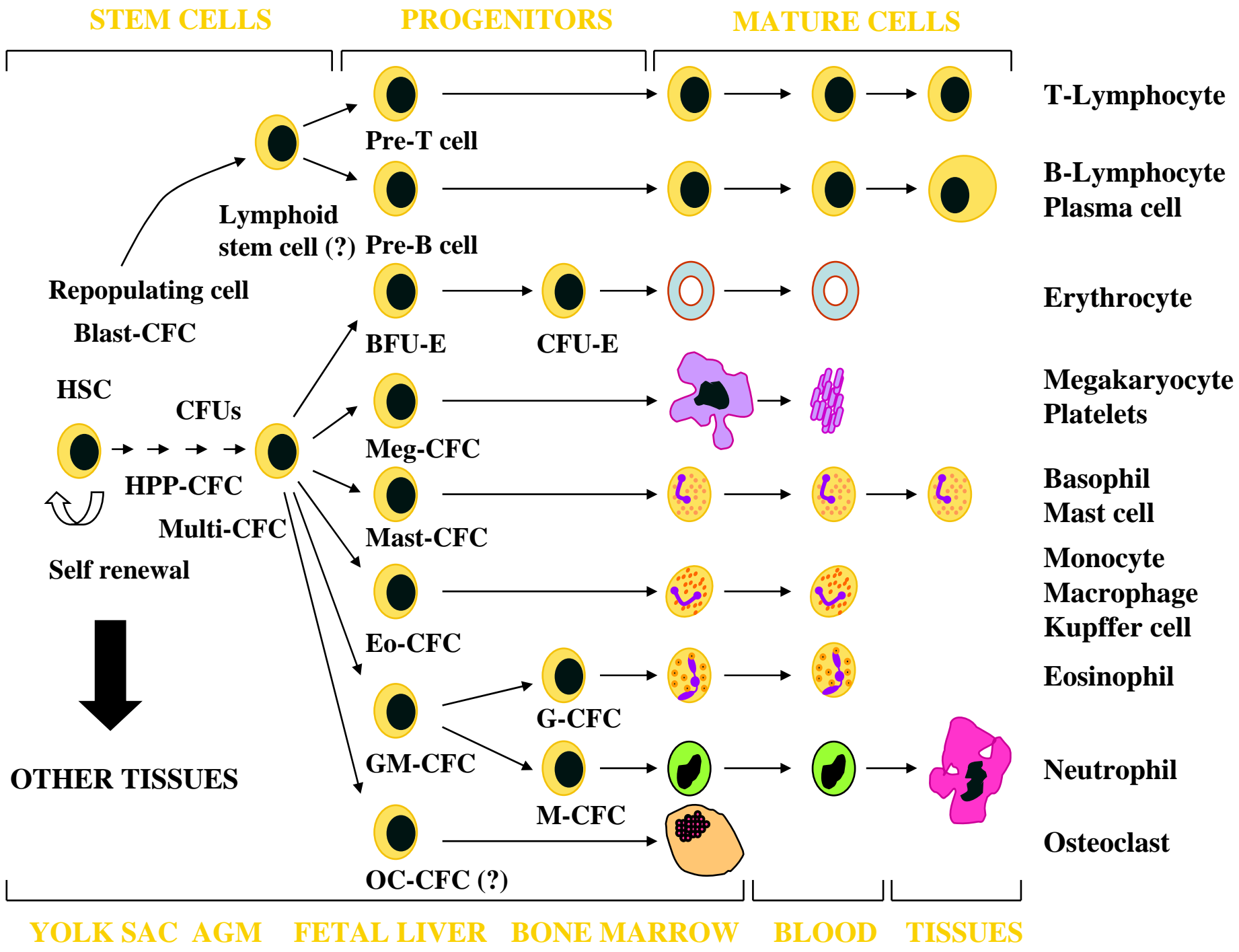


„Adulte“  
Stammzellen  
oder  
Vorläuferzellen?



# Beispiel: Stammzellen des Knochenmarks

- Bilden alle Blutzellen
- Entwickeln sich zu Zellen des Immunsystems
- Scheinen auch Stammzellen für andere Gewebe zu enthalten



# Gewinnung adulter Stamm- zellen

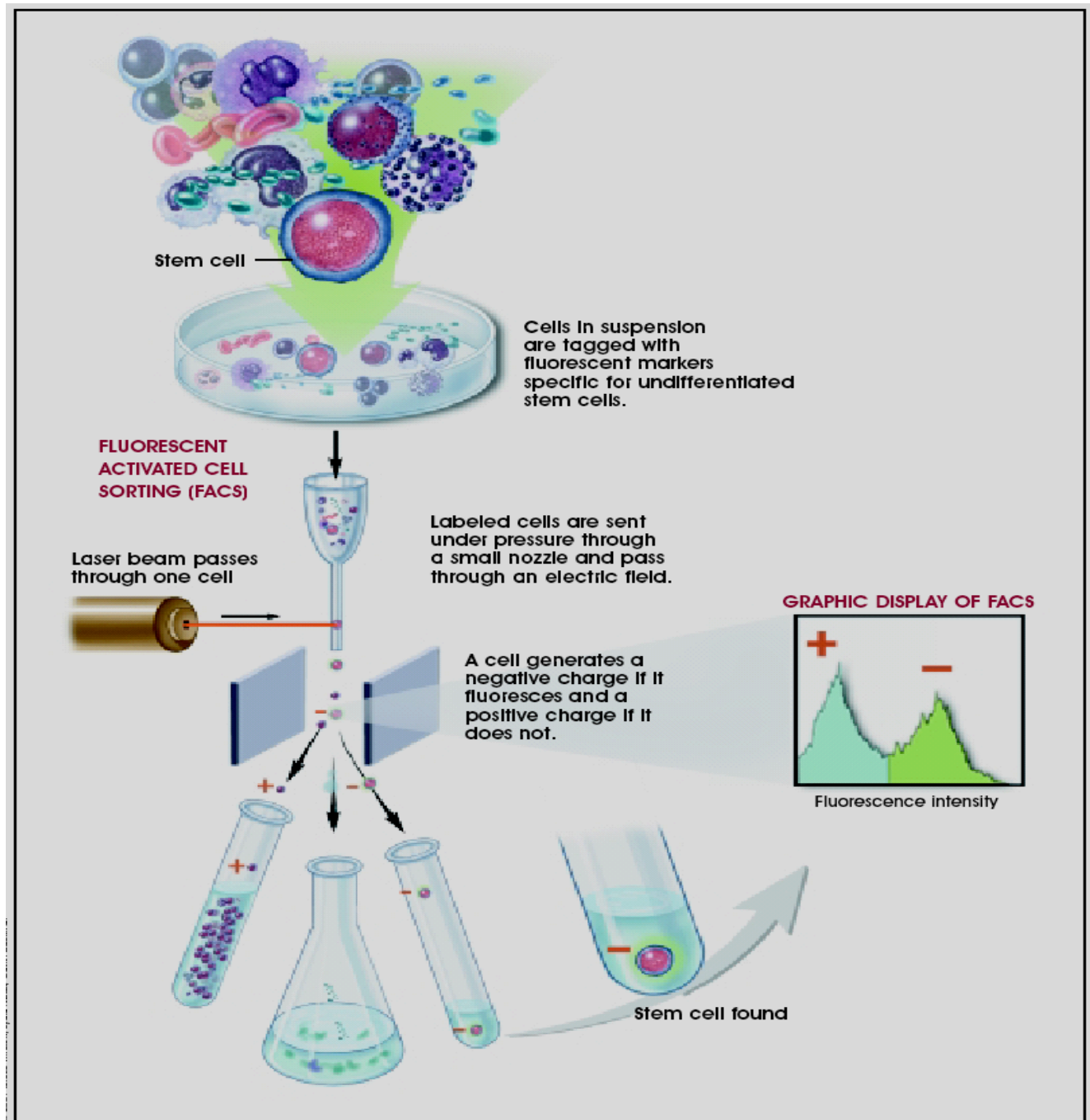


Figure E.1.2. Looking for a Needle in a Haystack: How Researchers Find Stem Cells.

## Unterschiede zwischen adulten Stammzellen/ES-Zellen

- wahrscheinlich nicht pluripotent
- unterschiedliche Typen je nach Gewebe
- keine Telomerase-Aktivität (wichtig für Erhalt der Chromosomenintegrität)
- limitierte Vermehrung in Zellkultur

# **Ungeklärt ist die Frage der „Plastizität“**

**Unter Plastizität versteht man das Potenzial adulter Stammzellen, sich in andere Zelltypen als die des Herkunftsgewebes zu differenzieren**

# Beispiele für Plastizität:

**Plastizität:**  
Bisher ist unklar, ob eine einzelne Zelle die beobachtete Plastizität hat oder ob verschiedene Zellen die verschiedenen Differenzierungswege ermöglichen

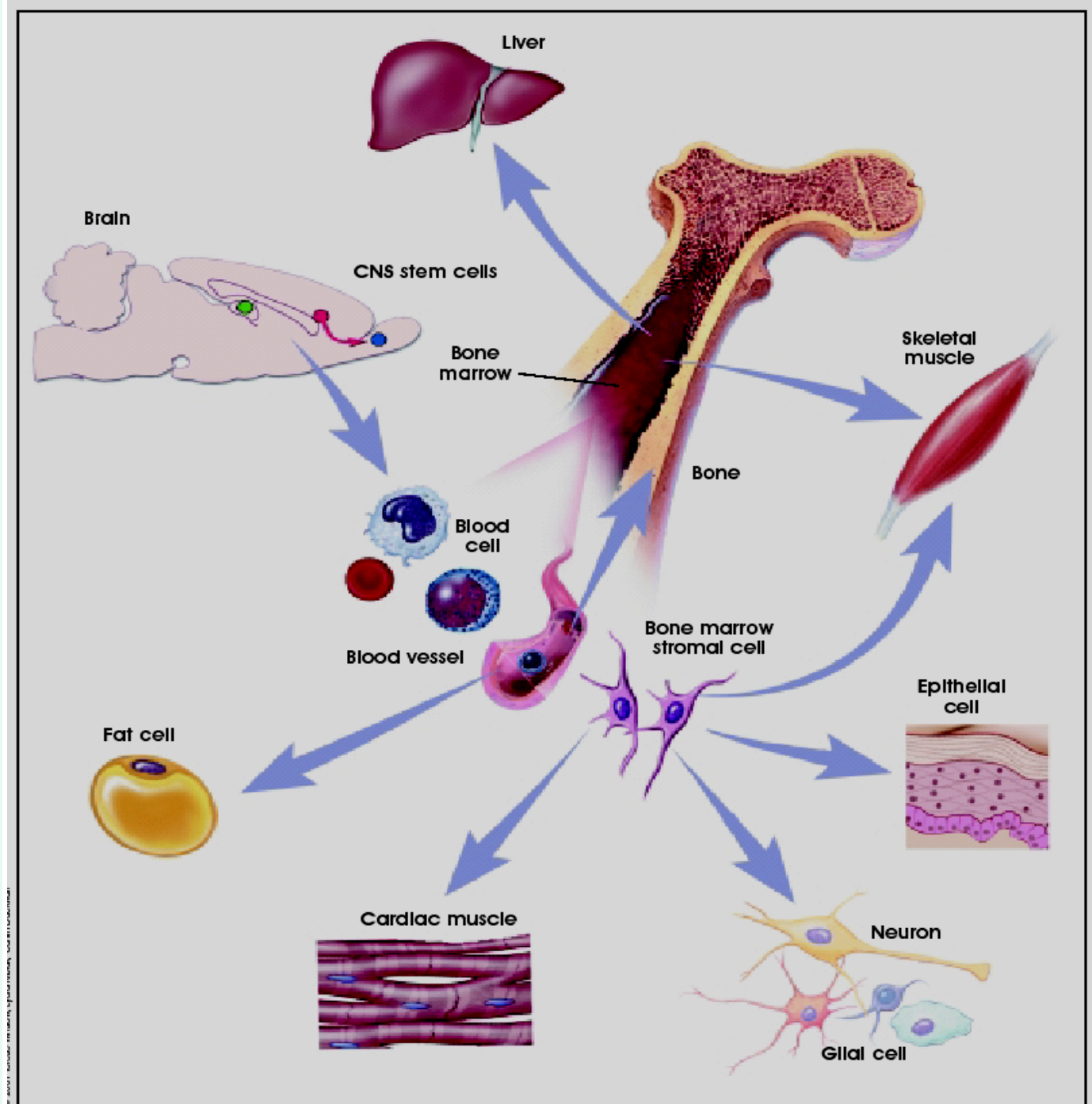


Figure 4.2. Preliminary Evidence of Plasticity Among Nonhuman Adult Stem Cells.

## Was könnten adulte Stammzellen schon heute leisten?

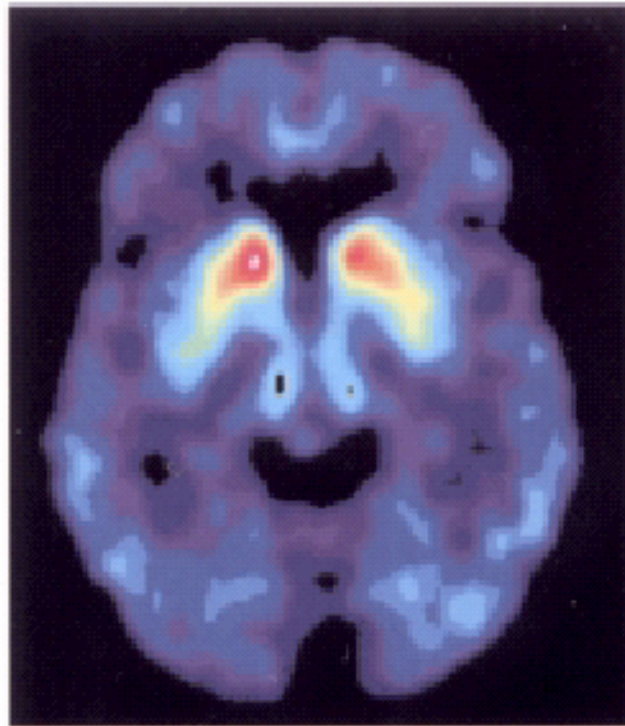
schon seit über 40 Jahren werden Knochenmarkstransplantationen durchgeführt

Nabelschnurblut wird seit 1992 zur Transplantation verwendet

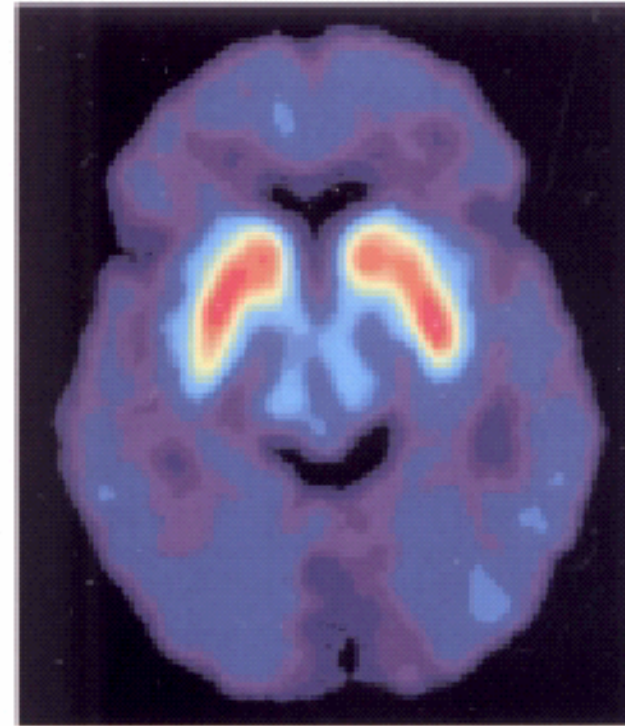
Parkinson Patienten haben durch Transplantation fetaler Gehirnzellen z. T. Verbesserung der Symptomatik erlebt (noch sehr unsicher)

# Parkinson-Therapie mit fetalen Gehirnzellen?

## Dopamine-Neuron Transplantation



Before Surgery



After Surgery

**Figure 8.3.** Positron Emission Tomography (PET) images from a Parkinson's patient before and after fetal tissue transplantation. The image taken before surgery (left) shows uptake of a radioactive form of dopamine (red) only in the caudate nucleus, indicating that dopamine neurons have degenerated. Twelve months after surgery, an image from the same patient (right) reveals increased dopamine function, especially in the putamen. (Reprinted with permission from *N Eng J Med* 2001;344 (10) p. 710.)

# Multiple Sklerose Heilung?

## **MS: Stammzellen lindern Symptome**

**MAILAND** (eb). Im Tierversuch ist es gelungen, Symptome bei Multipler Sklerose durch Injektion von adulten neuronalen Stammzellen zu lindern (Nature 422, 2003, 688). Italienische Forscher hatten dazu Tieren mit experimenteller Autoimmun-Enzephalitis die Zellen intravenös injiziert. Die Zellen drangen in demyelinisierte Hirnareale und differenzierten zu reifen Zellen, die Axone wieder mit einer Myelinscheide umhüllten.

Sind adulte Stammzellen für den  
Patienten „sicher“?

# Sind adulte Stammzellen für den Patienten sicher?

- Jahrelange Erfahrungen mit Knochenmarks-transplantation machen Hoffnung
- Tumoren als Nebenwirkung aus solchen Behandlungen sind nicht beobachtet worden
- Kürzlich ist allerdings nachgewiesen worden, dass nach Transplantation von Knochenmark auch in den Gehirnen der Patienten die fremden Zellen (Neuronen) zu finden waren

# Sind adulte Stammzellen eine Alternative zu ES-Zellen?

adulte Stammzellen sind vermutlich nicht pluripotent, nicht leicht zu isolieren und nicht unbegrenzt in Zellkultur zu züchten  
eine wirkliche „Reprogrammierung“ ist bisher nicht, bzw. nur über die Kerntransplantation in Oocyten gelungen (was wieder zu ES-Zellen führt)

## Nachteile fetaler (EG-Zellen) gegenüber ES-Zellen?

- beschränktes Wachstumspotenzial in Kultur
- schwer zu gewinnen
- anderes Differenzierungsstadium

# Stammzellen aus Nabelschnurblut anstelle von ES-Zellen?

Nabelschnurblut enthält adulte Stammzellen,  
N. ist daher keine echte Alternative

Der  
Ausweg:  
thera-  
peutisches  
Klonen?

