

# Einführung in die Gentechnologie

## Erwin R. Schmidt

- Vorlesung # 6
- 20. 05. 2008

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

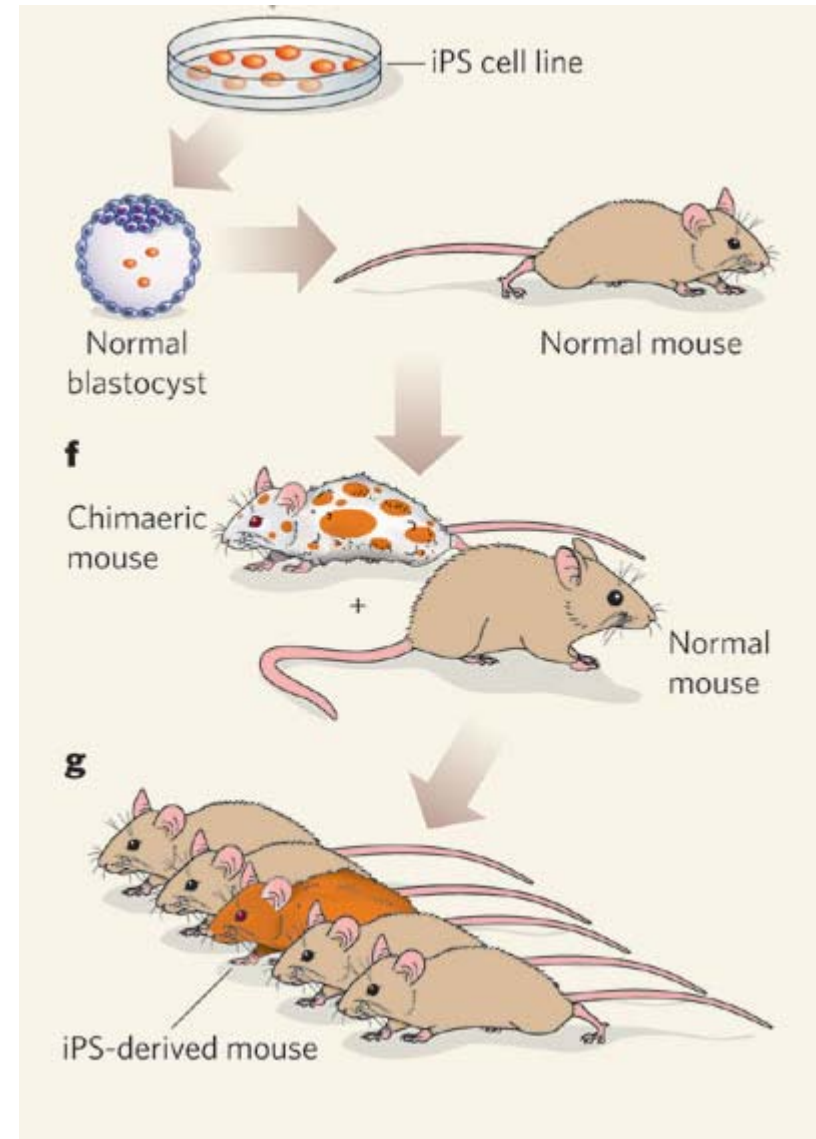
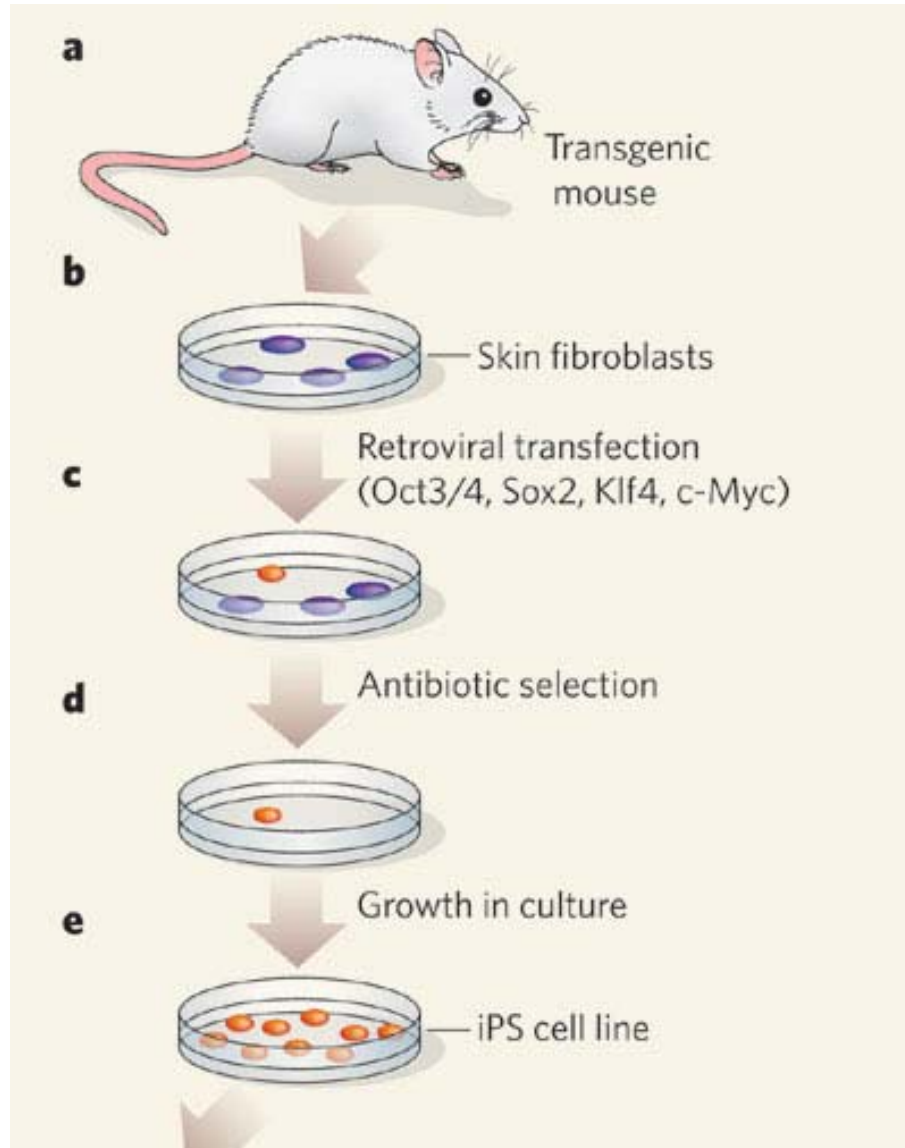
*Oct4, Sox2, cMyc* und *Klf4*.

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

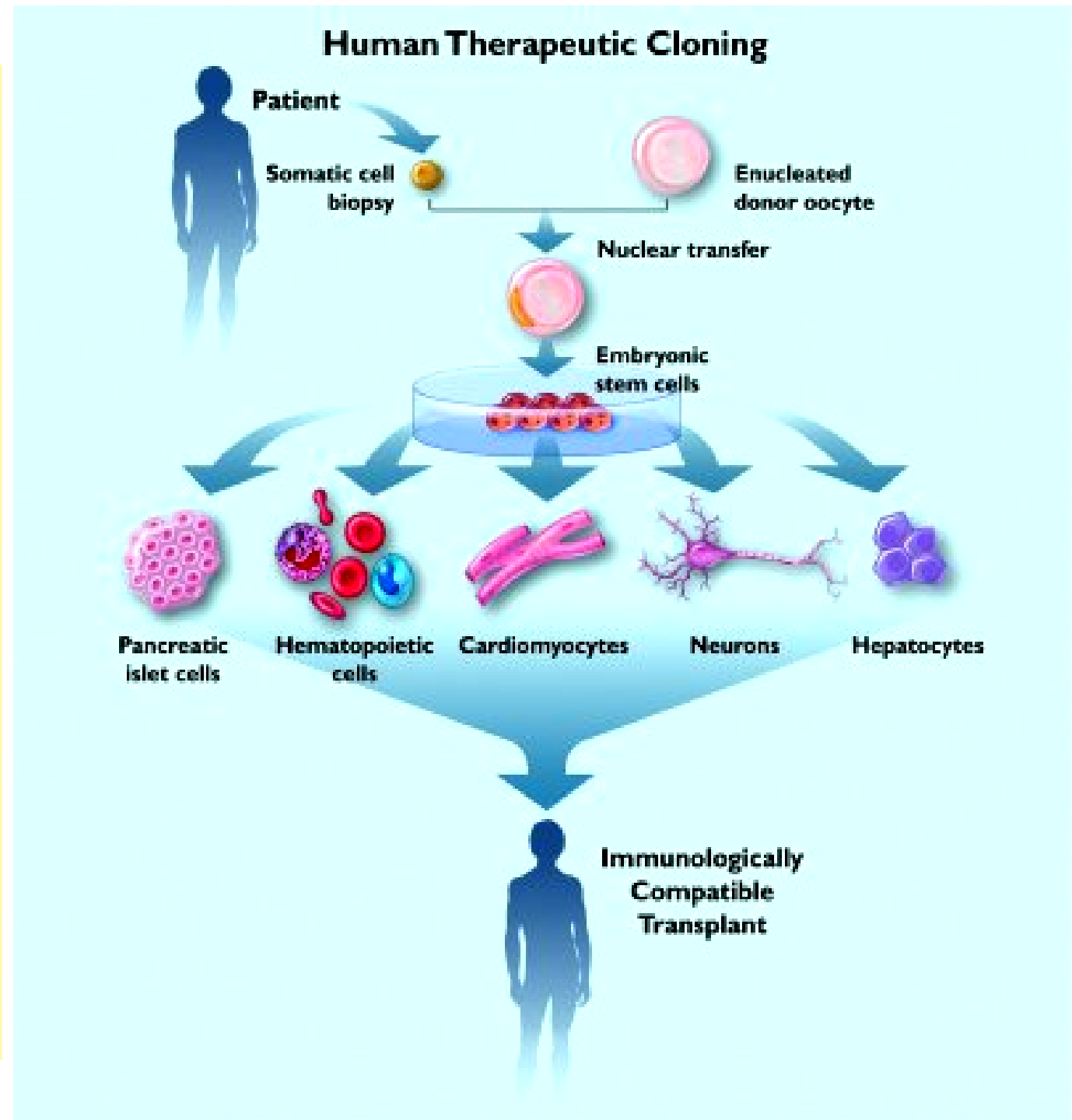
# Herstellung künstlicher ES-Zellen



# Chimäre Maus mit künstlichen ES-Zell-Arealen



Der  
Ausweg:  
thera-  
peutisches  
Klonen?



## **Großbritannien erlaubt Herstellung von Mensch-Tier-Embryonen** (Spiegel on line, 19. 05. 08)

Die Debatte war kontrovers, aber am Ende stand eine deutliche Mehrheit: Das britische Unterhaus hat der Herstellung von Embryonen aus menschlichem Erbgut und Eizellen von Tieren für die Stammzellenforschung zugestimmt. Kritiker befürchten jetzt eine "Frankenstein-Wissenschaft".

London - Das britische Unterhaus stritt heftig, Premierminister Gordon Brown warb für die Stammzellenforschung, und am Ende konnte er zufrieden sein: In Großbritannien können Embryonen aus menschlichem Erbgut und Eizellen von Tieren für die Forschung geschaffen werden.

Das Unterhaus in London stimmte am Montagabend mit 336 zu 176 Stimmen gegen einen Antrag, generell die Produktion von solchen Chimären zu verbieten. Damit unterstreicht Großbritannien seinen Ruf als eines der weltweit liberalsten Länder in der Stammzellenforschung.

Ebenfalls wurde im Unterhaus ein Antrag zum Verbot der Produktion sogenannter "Helfer- oder Rettergeschwister" mit Mehrheit abgelehnt. Dabei geht es um die künstliche Erzeugung von Embryonen, die einem lebenden Kind genetisch weitgehend entsprechen und ihm bei Krankheiten Zellen oder genetisches Material für die Behandlung liefern sollen.

# Dolly

Dolly with her first newborn, Bonnie



- Born in July 1996 at the Roslin Institute in Scotland
- First mammal to be cloned from an adult mammal using the nuclear transfer technique
- 277 attempts were made before the experiment was successful
- Dolly died in February 14, 2003 of progressive lung disease at the age of 6; whereas normal sheep can live up to 12 years of age.



# Klonierung von Säugetieren und Gentechnologie



# Mammal Cloning



<http://www.howstuffworks.com/cloning.htm/printable>

January 8, 2001 Noah, a baby bull gaur, became the first clone of an endangered animal.

# Mammal Cloning Timeline

1984 – A live lamb was cloned from sheep embryo cells

1986 – Early embryo cells were used to clone a cow

1993 – Calves were produced by transfer of nuclei from cultured embryonic cells

1995 – Two sheep, named Megan & Morag, were cloned using embryo cells

1996 – Birth of Dolly, the first organism to be cloned from a fully differentiated adult cell

1997 – Transgenic sheep named Polly was cloned containing a human gene

Megan and Morag



Dolly



<http://www.cnn.com/2001/WORLD/europe/08/06/clone.critics/index.html>

## Tetra



1998 – 50 mice were cloned in three generations from a single mouse

1998 – 8 calves were cloned from a single adult cow, but only 4 survived to their first birthday

1999 – A female rhesus monkey named Tetra was cloned by splitting early embryo cells.

2000 – Pigs and goats reported cloned from adult cells

2002 – Rabbits and a kitten reported cloned from adult cells



<http://hs.houstonisd.org/hspva/academic/Science/Thinkquest/gail/text/benefits.html>

## Table. Cloning success rates

Organism	Live offspring/ oocytes	Cloning efficiency <sup>1</sup>
Goat	7/97	7.2%
Mouse	7/121	5.8%
Cow	5/100	5.0%
Sheep	1/23	4.3%
Domestic cat*	1/91	<1.1%
Pig	2/222	0.9%
Rabbit	6/2000	0.3%

<sup>1</sup>Cloning efficiency is the number of live offspring expressed as a percentage of the total number of nuclear transfer oocytes where the DNA donor cell was an adult cell. These efficiencies represent the highest efficiencies published as of July 2002 for each organism. \*Based on number of oocytes transferred into recipients, not total. Secondary source: Roslin Institute, <http://www.roslin.ac.uk/public/cloning.html>. *KP*

# Vergleich der Erfolgsrate bei verschiedenen Tieren

<u>Species</u>	<u>Number of oocytes used</u>	<u>Number of live offspring</u>	<u>Notes</u>
Mouse	2468	31 (1.3%)	-
Bovine	440	6 (1.4%)	2 died
Sheep	417	14 (3.4%)	11 died within 6 months
Pig	977	5 (0.5%)	-
Goat	285	3 (1.1%)	-

The table shows success rates of cloning when mature mammal cells were used.

Yanagimachi, R. 2002. "Cloning: experience from the mouse and other animals." Molecular and Cellular Endocrinology. 21 March, 187.

# Development and survival of cloned mouse embryos

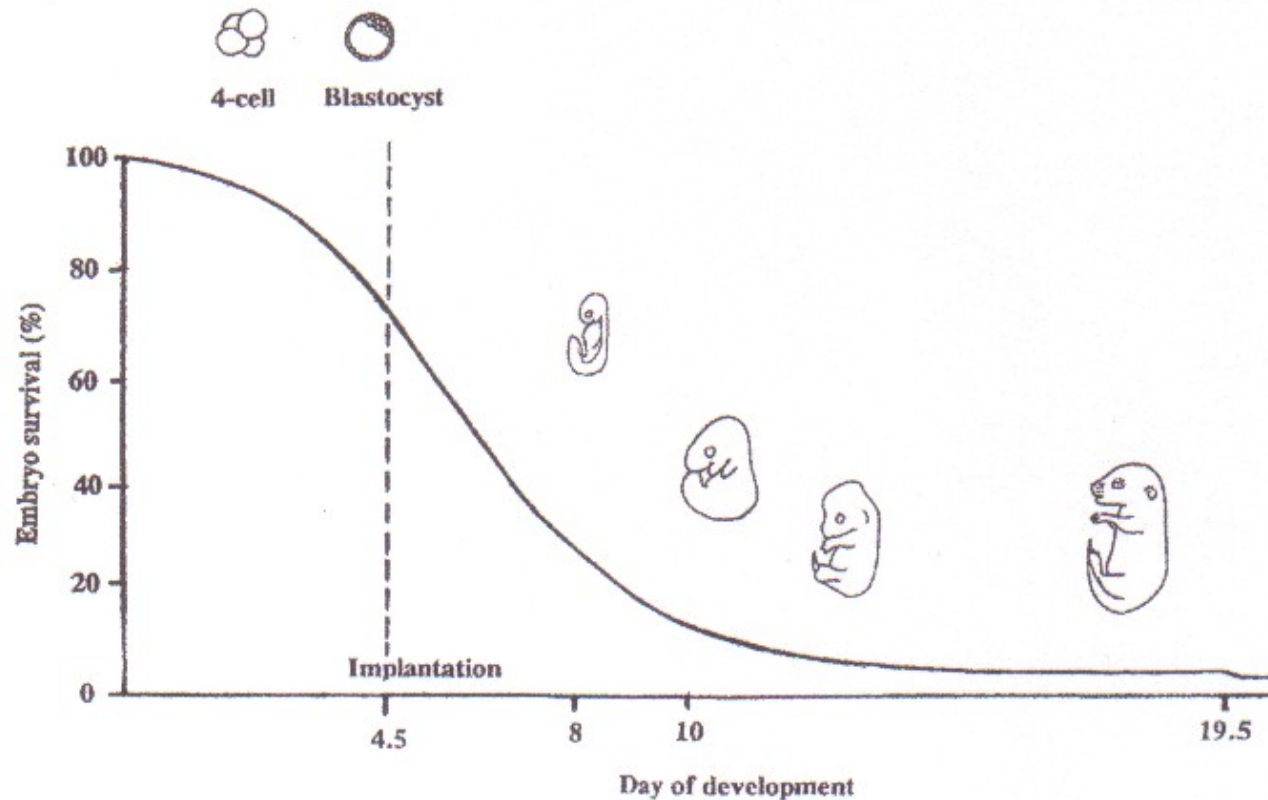


Fig. 1. Development and survival cloned mouse embryos.

Majority of the embryos die before and after implantation. This figure shows that the present cloning technique is highly inefficient.

# Biotechnology of Mammalian Cloning

## Embryo Splitting



<http://www.faseb.org/opar/cloning/cloning.htm>

- earliest method of cloning
- success limited to embryos split before implantation

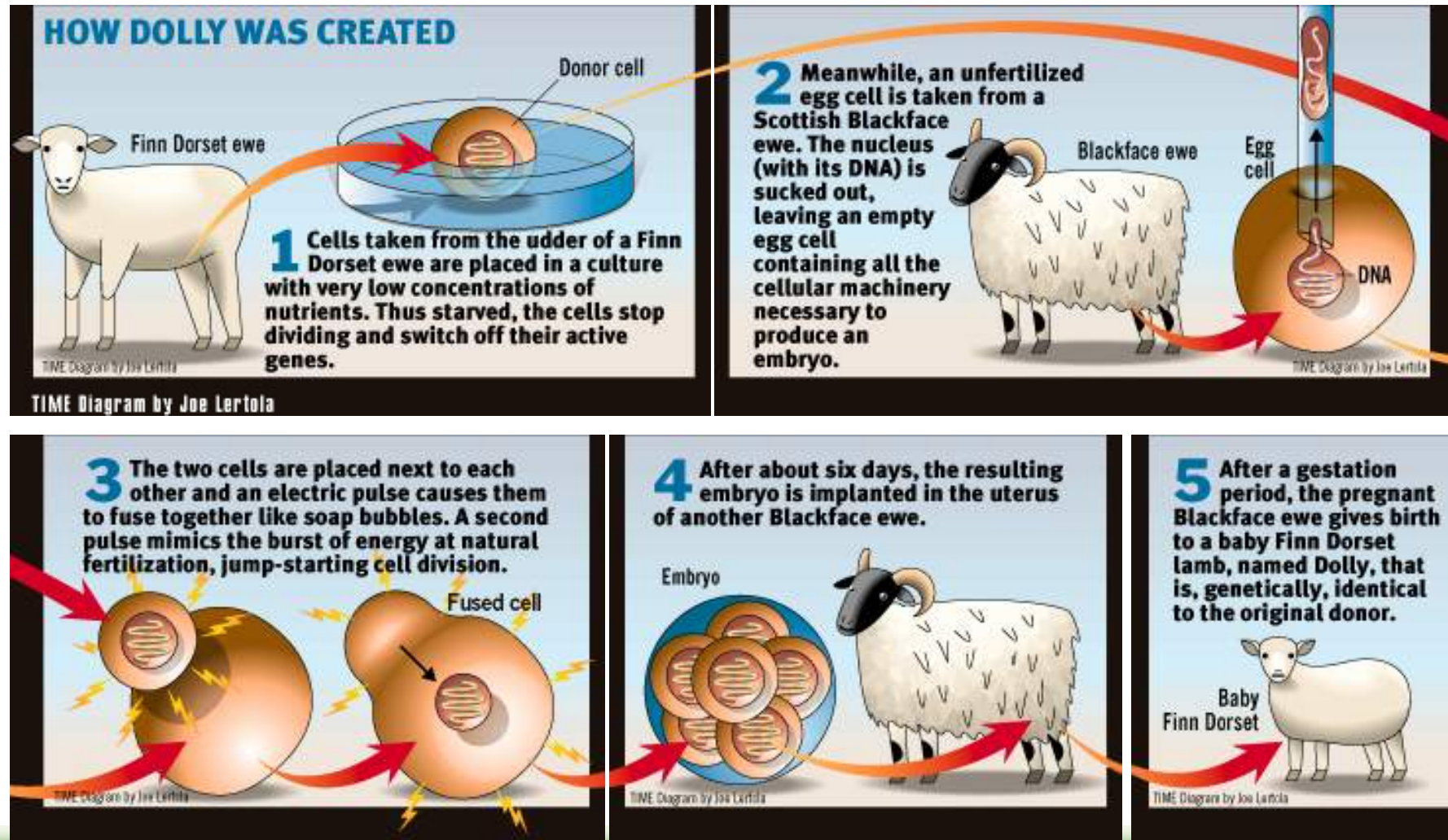
## Parthenogenesis

- only possible in females to give female progeny
- still investigating – so far mostly failed attempts

## Nuclear transplantation

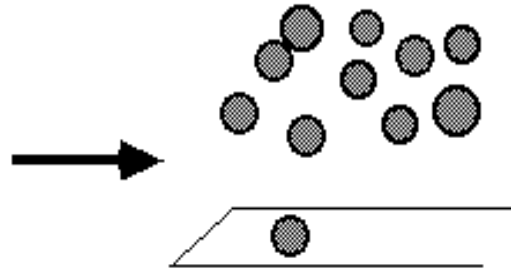
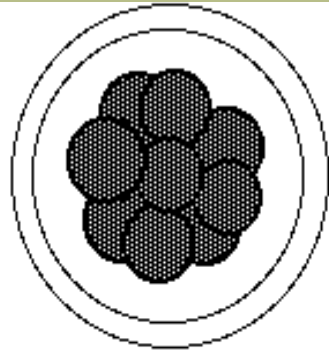
- main technique in current cloning experiments

# Verfahren zur Klonierung von Säugetieren



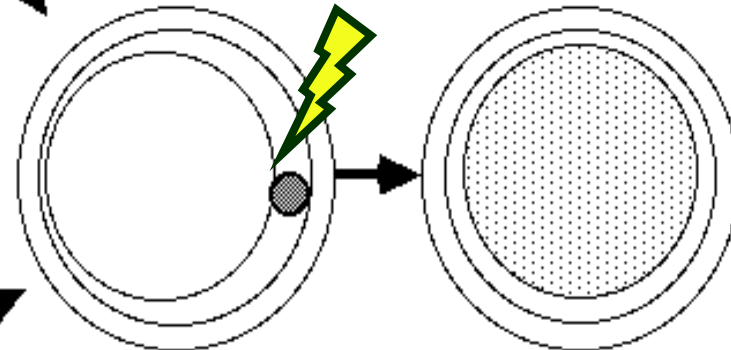
# Nuclear Transfer Procedure

Way cool!!



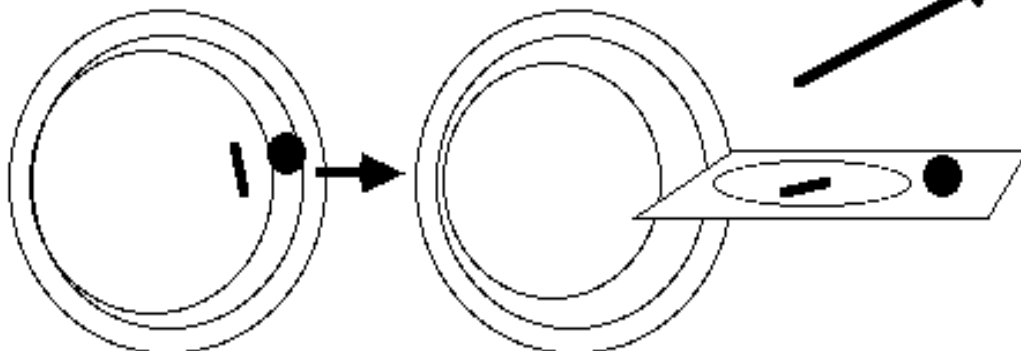
CELLS OF DONOR EMBRYO ARE SEPARATED

TISSUE

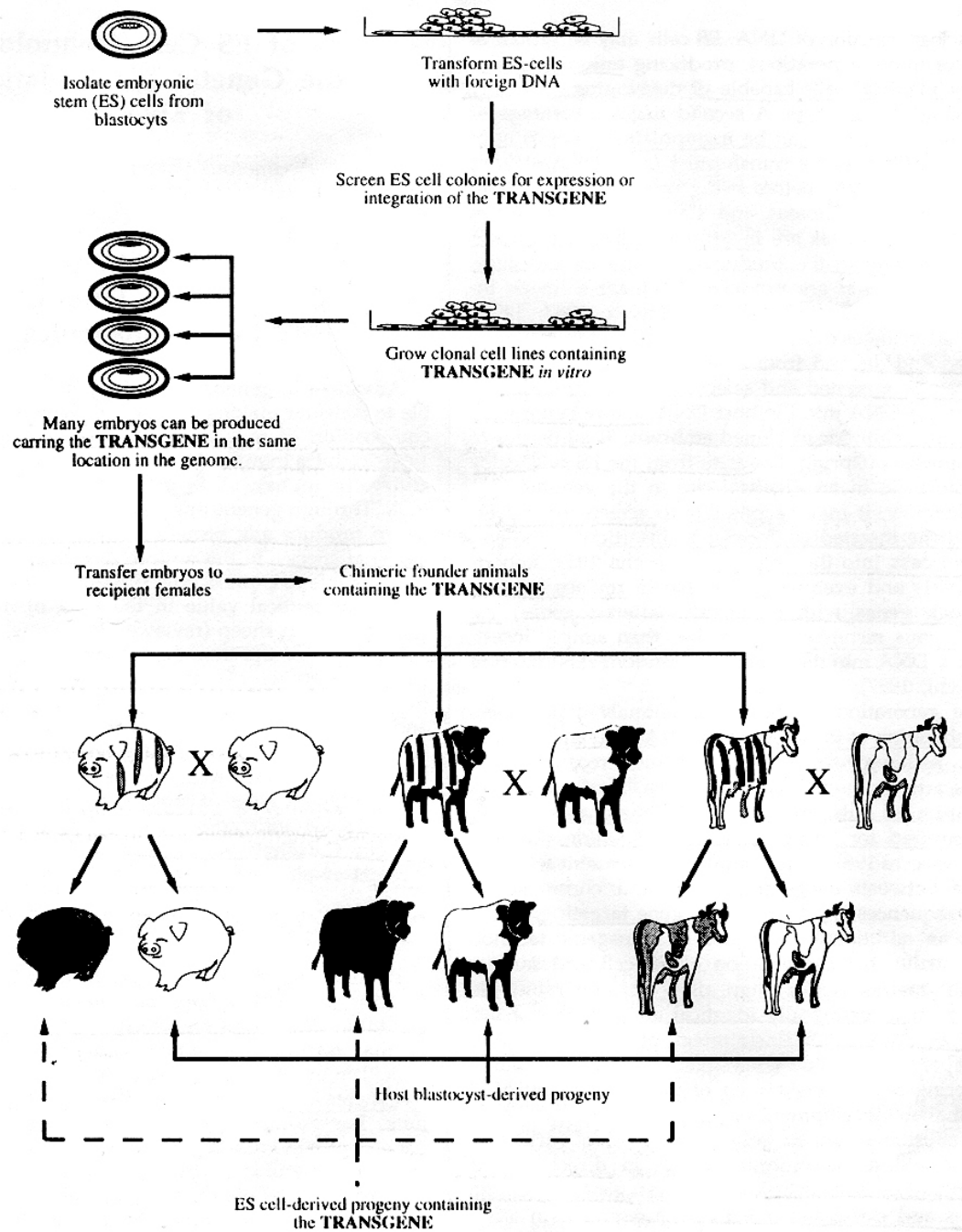


DONOR CELL IS PLACED NEXT TO OOCYTE AND FUSED WITH IT BY AN ELECTRICAL CURRENT

EMBRYO DEVELOPS AS THOUGH A NEWLY FERTILISED EGG



CHROMOSOMES ARE REMOVED FROM UNFERTILISED EGG



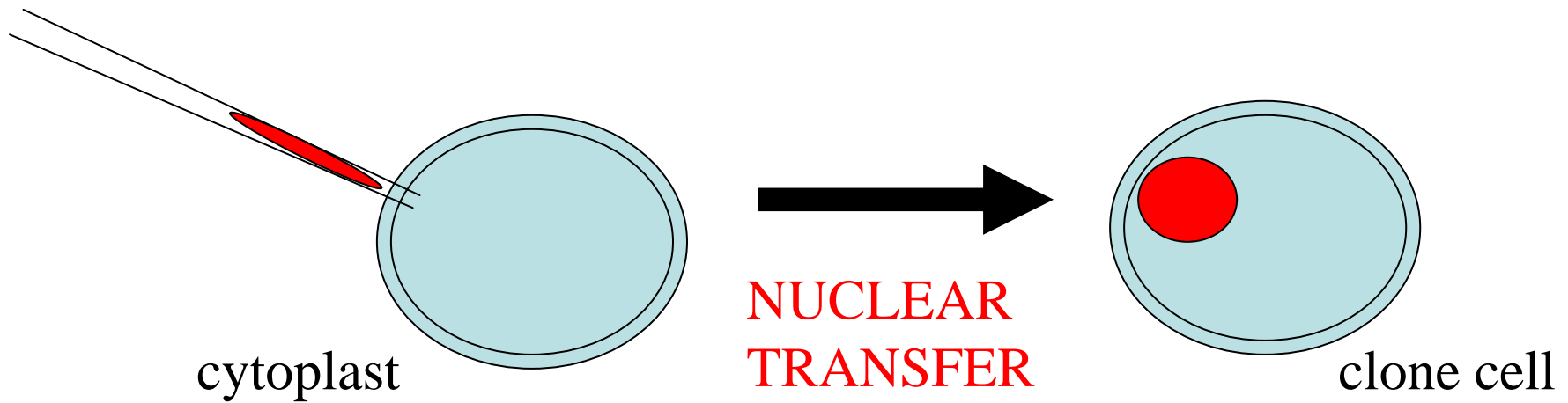
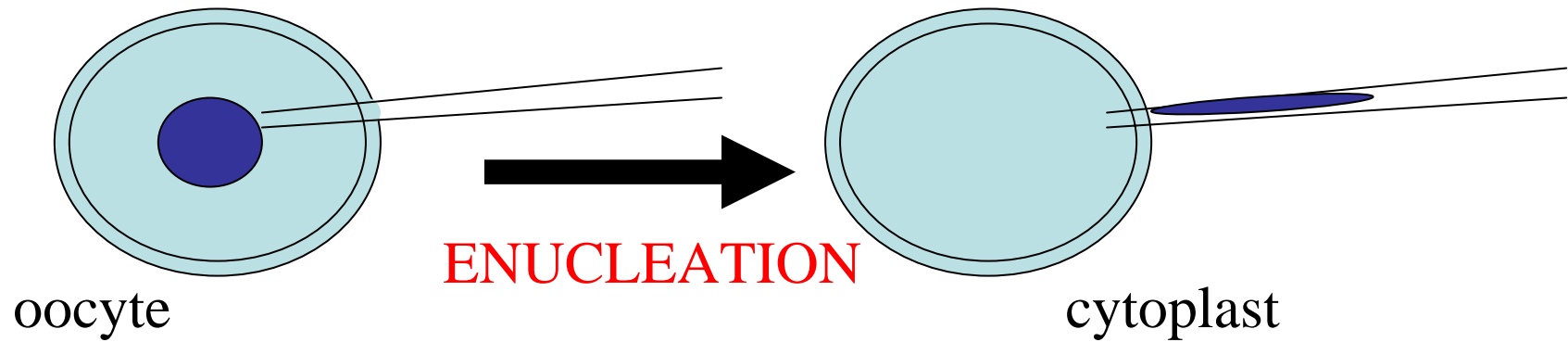
# Kern - Transplantation

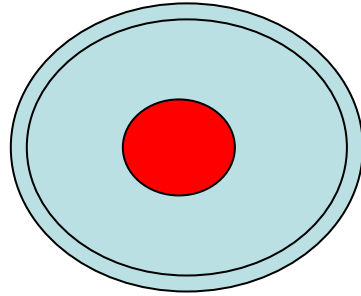
— Eucleation of donor cell

— Nuclear Transfer

- the nucleus of the individual to be cloned is transferred to the cytoplasm in one of the 2 ways:
  - 1) **electrofusion** – whole nucleus donor cell injected beneath the zona pellucida (the outer membrane of the oocyte) and fusion of cells induced by electrical impulses
  - 2) **nuclear injection** – naked nucleus microinjected into cytoplasm

# Zusammenfassung

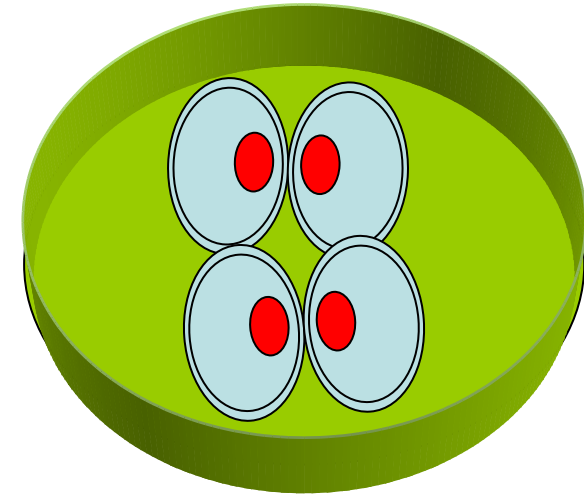




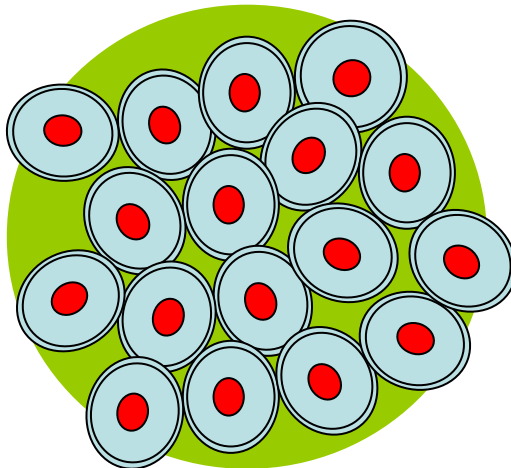
genetic  
reprogramming



Induktion der  
Embryo-  
Entwicklung



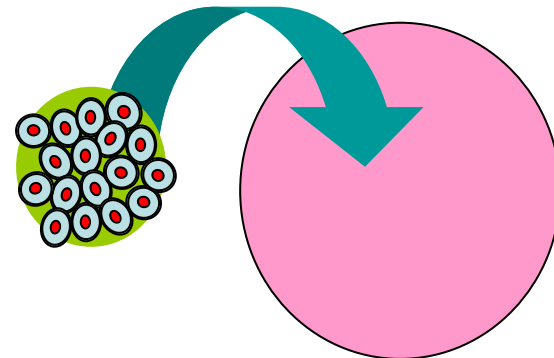
developing embryo in culture



embryo



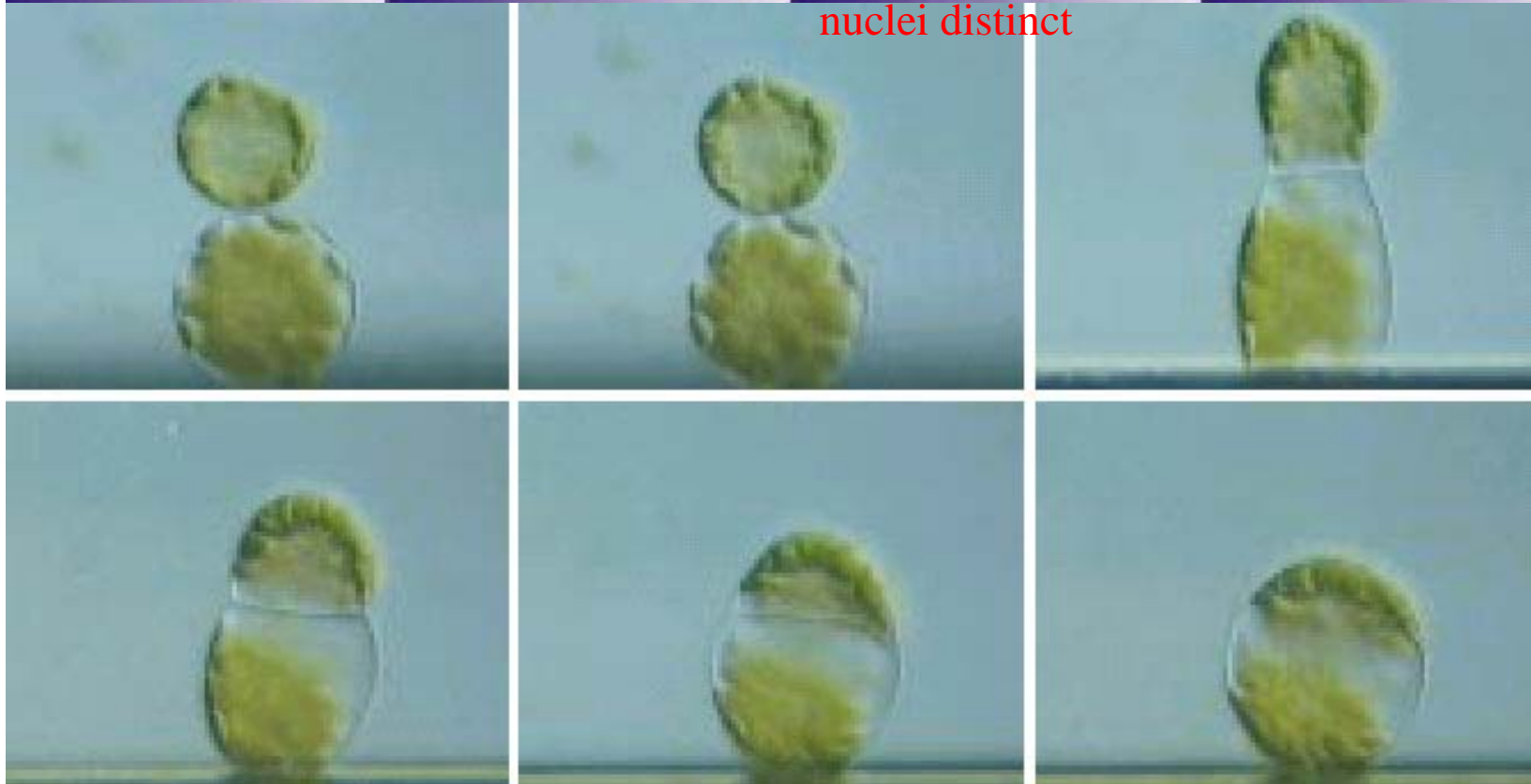
Implantation



uterus of  
surrogate mother

# Electrofusion

[http://www.brinkmann.com/pdf/cell\\_fusion.pdf](http://www.brinkmann.com/pdf/cell_fusion.pdf)



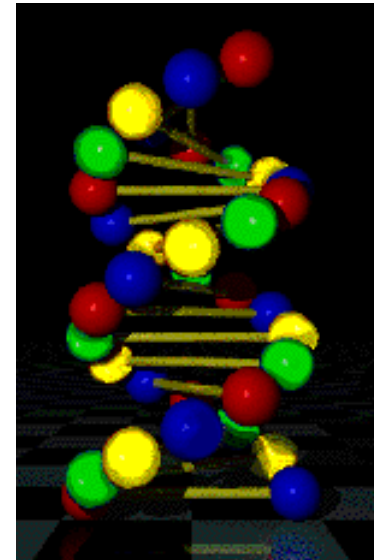
Fusion induced by electric pulse

Enucleation of donor cell

Nuclear Transfer

Genetic Reprogramming

- “de-differentiation” – rearranging the genome of the nucleus to restore its totipotency so it can differentiate into different types of cells and develop into a whole organism
- must occur after nuclear transfer to successfully produce the clone – required for the nuclei from adult cells to develop normally
- best completed in unfertilized oocytes



# Genetische Reprogrammierung

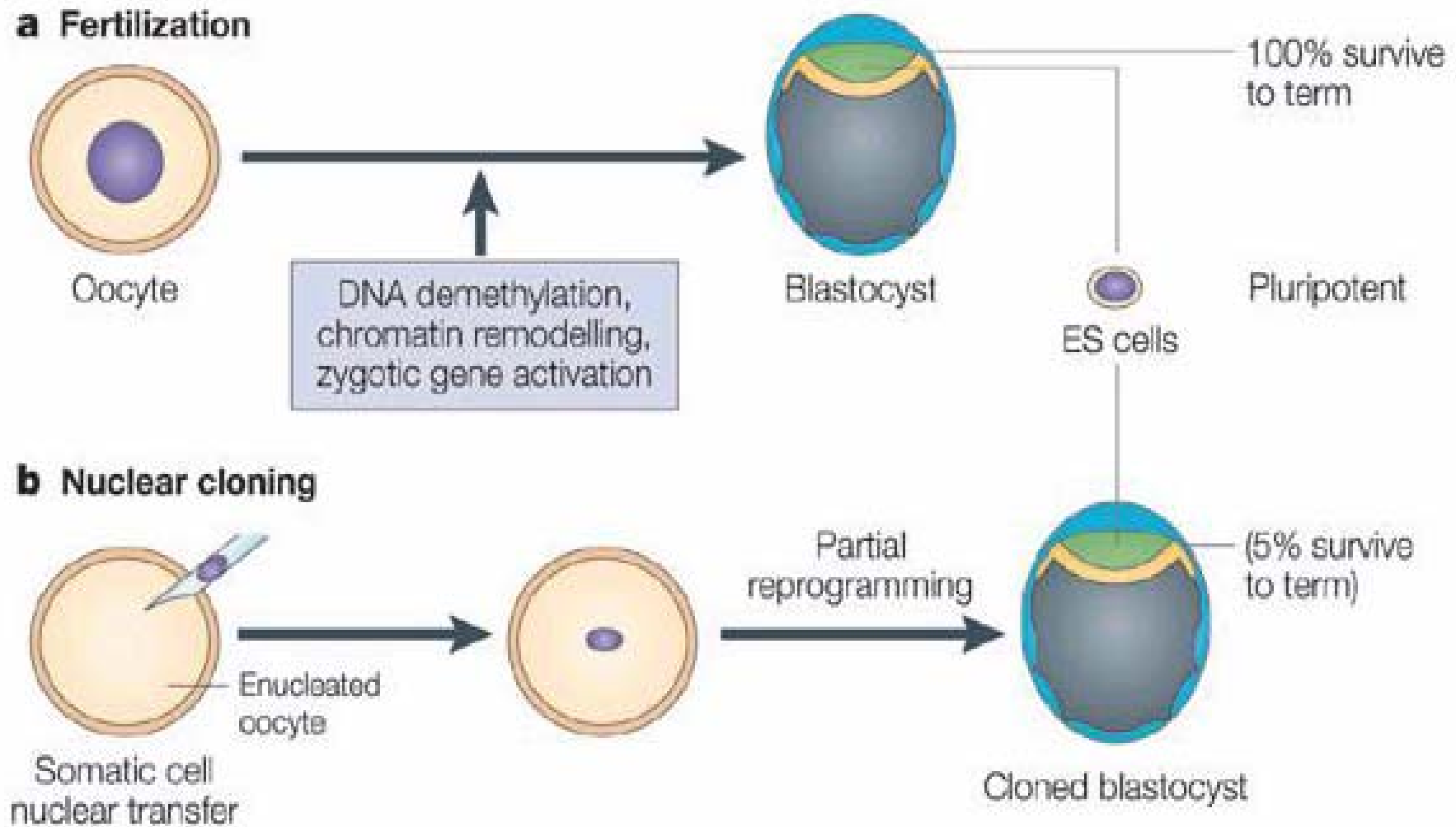
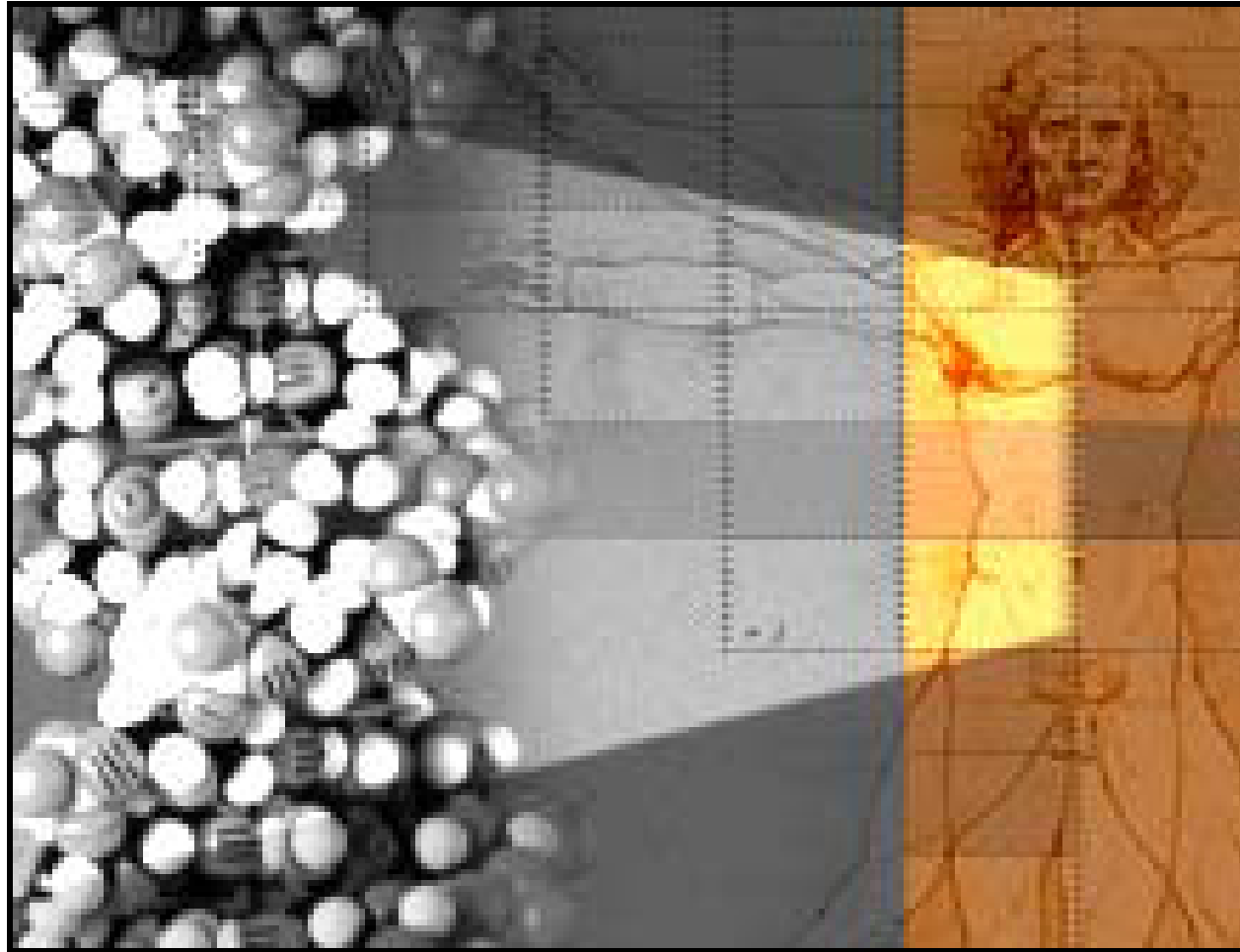


Fig. 5 from *Nature Reviews Genetics* 3: 671

# Cloning Humans

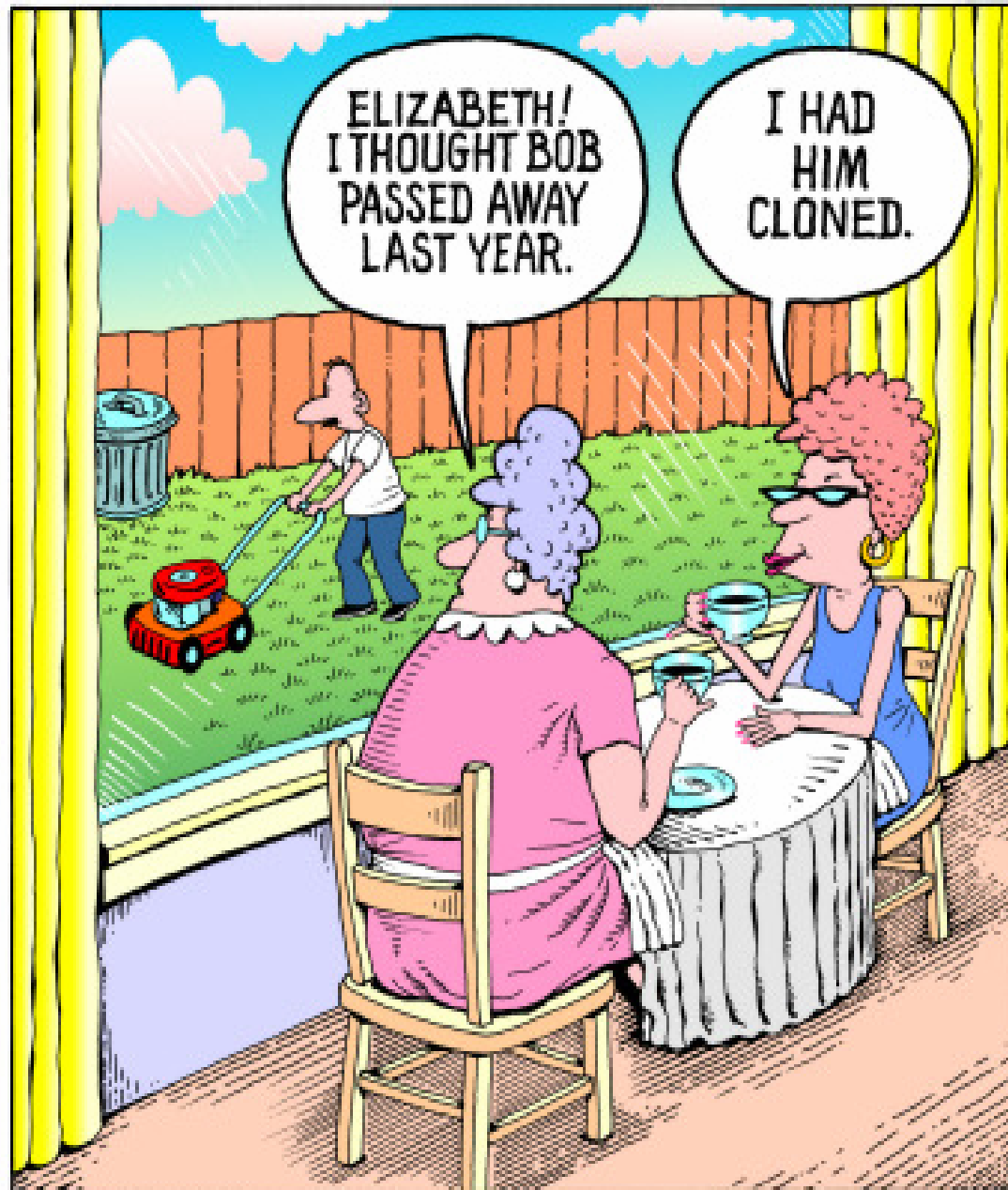


<http://www.cnn.com/2001/WORLD/europe/08/06/clone.doctor/index.html>

# Klonierung von Menschen? therapeutisch oder reproduktiv?



<http://www.humancloning.org/>





# Christians

for the cloning of  
Jesus



GREETINGS FRIENDS , WE LIVE IN AN IMPERFECT WORLD. A WORLD FULL OF SIN. EVERYWHERE YOU LOOK YOU CAN SEE THE EFFECTS OF THE DEVIL ; WAR , FAMINE , POVERTY , VIOLENCE , GOVERNMENT CORRUPTION , PORNOGRAPHY ON TELEVISION , THE LIST GOES ON AND ON. ARMAGEDDON IS SURELY ON ITS WAY. THE SECOND COMING OF CHRIST IS OUR ONLY HOPE. FRIENDS , WE CAN'T SIT BACK AND WAIT FOR JESUS. HE HAS GIVEN US THE POWER TO BRING HIM TO US. AFTER ALL , GOD HELPS THOSE WHO HELP THEMSELVES.



## THE SHROUD OF TURIN

Thanks to advances in science we can take DNA samples from the shroud and use them to clone the second coming ! This is fantastic , but to stop here would be blasphemy . Friends , we should clone a Jesus for anyone who wants one . Why , any woman that wanted to could immaculately conceive Jesus .

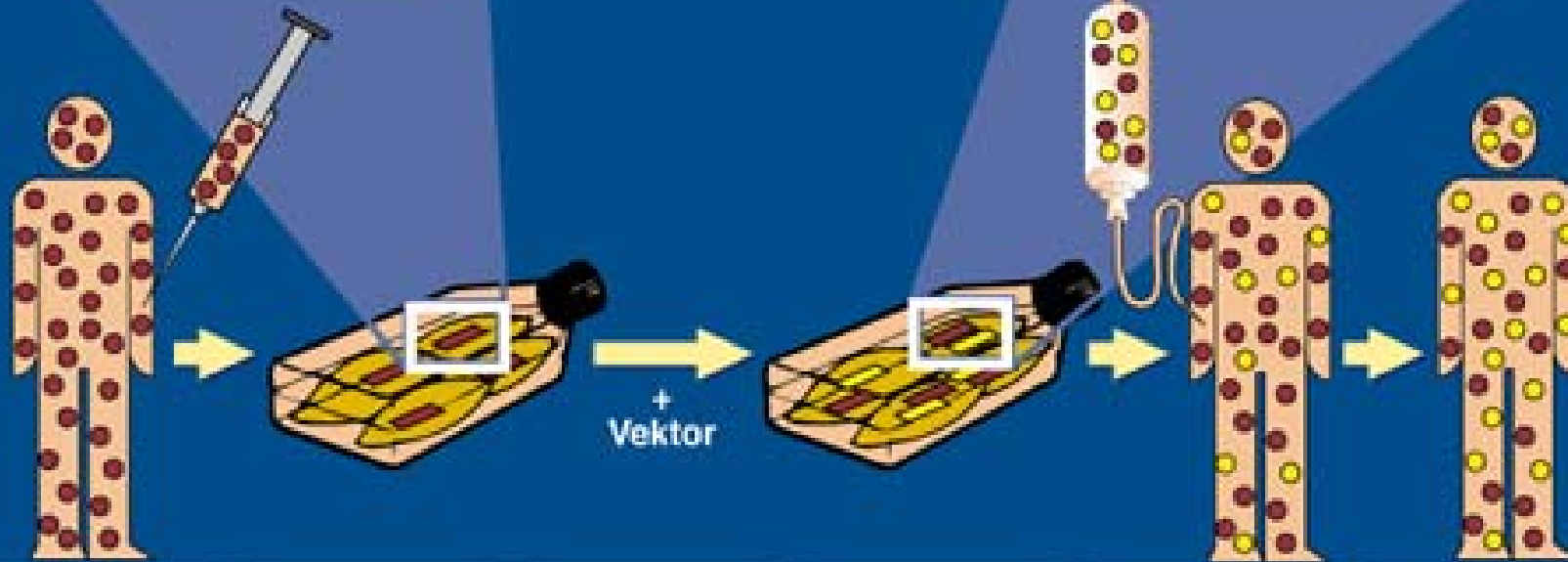


# Prinzip der somatischen Gentherapie

Zelle mit defektem Gen und nicht-funktionellem Produkt (●)

Vektor mit intaktem Gen

Zelle mit intaktem Gen und funktionellem Produkt (●)



Entnahme des Zellmaterials beim Patienten

Kultivieren der Zellen

Zugabe des Vektors

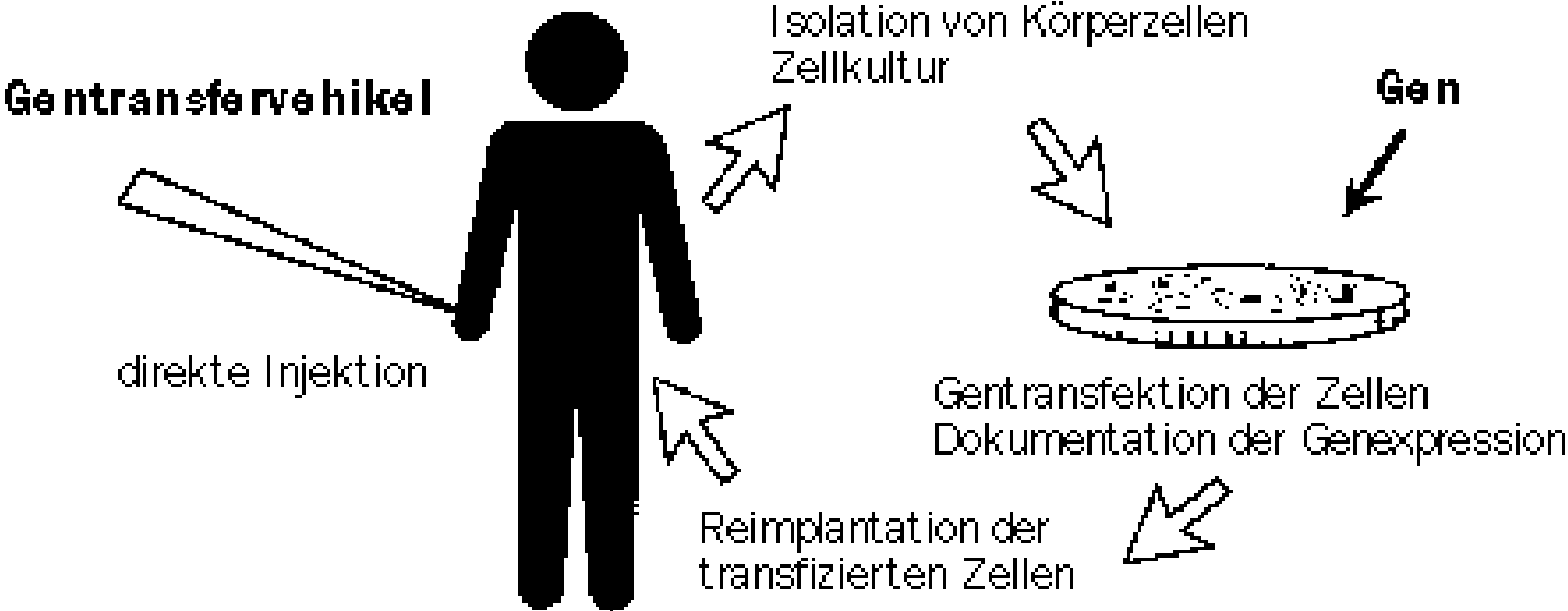
Zellen mit intaktem Gen

Infusion dieser Zellen in den Patienten

geheilter Patient

# In vivo

# Ex vivo



## Übersicht

M. Hallek<sup>1,2,3</sup> · H. Buening<sup>2</sup> · M. Ried<sup>2</sup> · U. Hacker<sup>1,2</sup> · Ch. Kurzeder<sup>3</sup> · C.-M. Wendtner<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup> Medizinische Klinik III, Klinikum der Universität München, Großhadern

<sup>2</sup> Genzentrum der Universität München

<sup>3</sup> GSF – Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit, Hämatologikum,  
Klinische Kooperationsgruppe für Gentherapie

# Grundlagen der Gentherapie

## Prinzipien und Stand der Entwicklung

### Zum Thema

Nur wenige medizinische Forschungsgebiete erhielten in den letzten Jahren so viel Aufmerksamkeit wie die somatische Gentherapie. Die bahnbrechenden molekularbiologischen Entdeckungen in der zweiten Hälfte des letzten Jahrhunderts, die im Jahr 2001 in der Entschlüsselung weiter Teile des menschlichen Genoms ihren bisherigen Höhepunkt fanden [1, 2], schufen die Voraussetzungen dafür.

Heute kann man mit zunehmend ausgefeilten Methoden Gene in Zellen einbringen und diese dadurch neu programmieren. Dennoch wird es einige Jahre dauern, bis eine ausgereifte Gentherapie für viele ansonsten nicht behandelbare Krankheiten zur

### Geschichtlicher Abriss

Die wesentlichen Entdeckungen in der Gentherapie liegen nur wenige Jahrzehnte zurück: 1944 bewies Avery, dass Desoxyribonukleinsäure (DNS) die Speichersubstanz der Erbinformation ist. 1955 schlugen Watson und Crick die Doppelhelixstruktur der DNS vor, die Tripletstruktur des genetischen Codes wurde 1961 entschlüsselt. Die im gleichen Jahr entdeckte Botenribonukleinsäure (mRNS) enthüllte einen prinzipiellen Mechanismus der Übersetzung von Genen in Proteine. Durch die Klonierung eukaryotischer Gene in bakterielle Plasmide (erstmalig 1974) wurde die Vermehrung und Untersuchung von

Tabelle 1

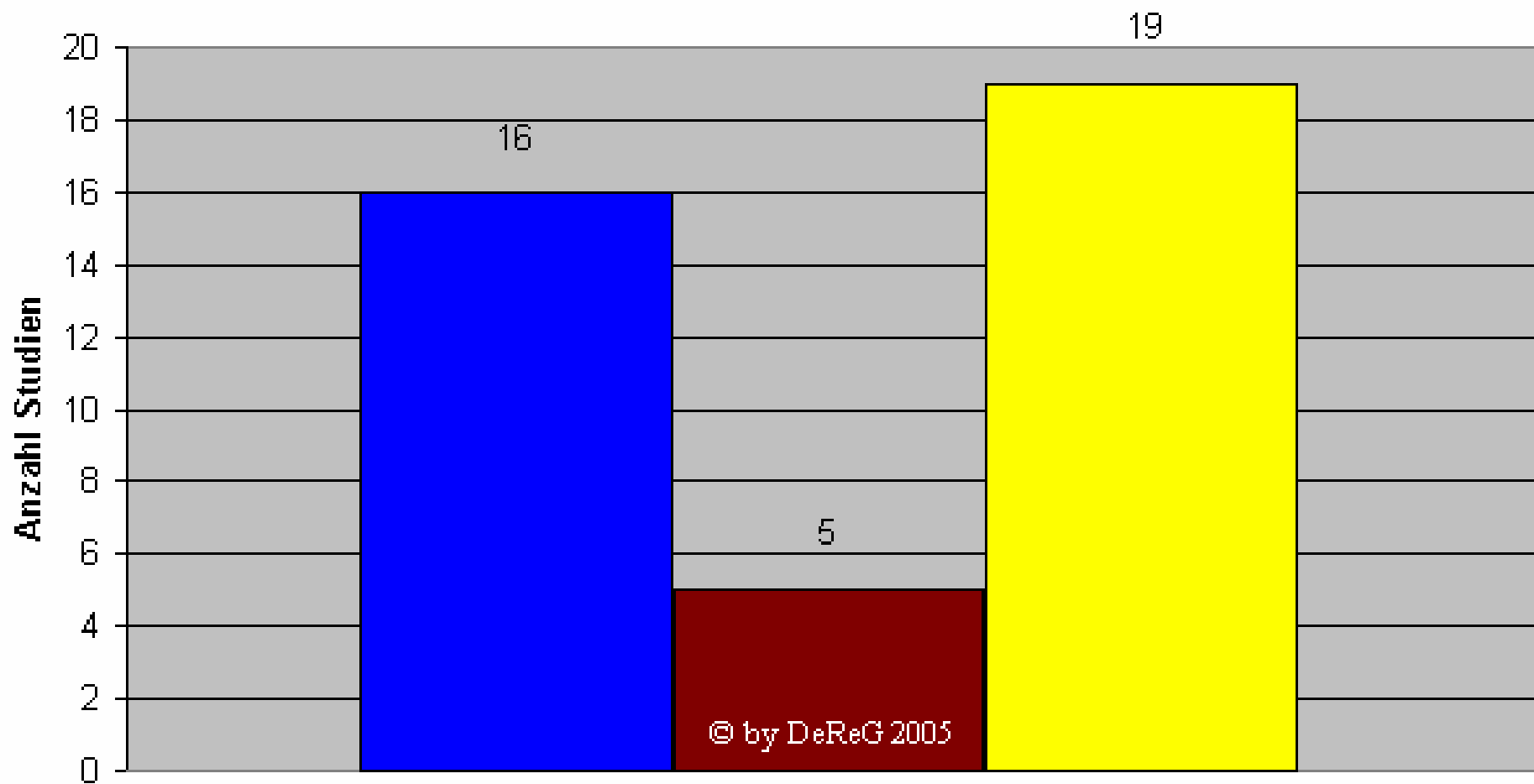
### Gentherapie: historischer Abriss

1989	Erste Genmarkierungsstudie (Rosenberg)
1990	Erste Gentherapiestudie an Patienten mit Adenosin-desaminase-defizienz (Blaese, Culver, Anderson).
1994	Erste Gentherapiestudien in Deutschland.
2000	Erster Nachweis der klinischen Wirksamkeit der Gentherapie (Hämophilie B, Immundefizienz)
2001	Mehr als 500 Gentherapiestudien weltweit mit über 3400 Patienten.

**Tabelle 6**  
**Klinische Gentherapiestudien**

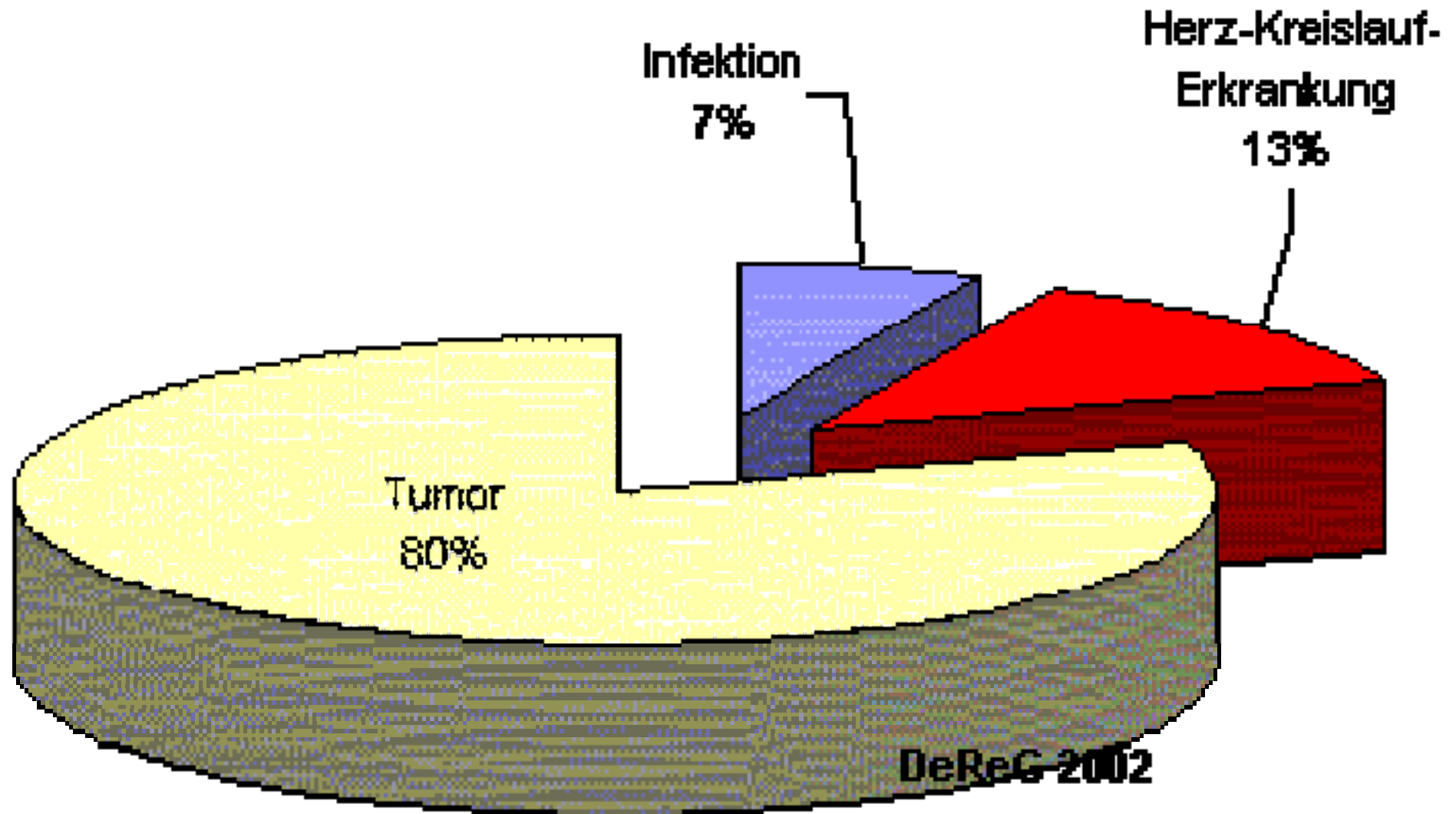
Genmarkierung	48	(9,0%)
<b>Therapie</b>	<b>484</b>	<b>(91,0%)</b>
Krebs	331	(62,2%)
Monogene Krankheiten	71	(13,3%)
Zystische Fibrose		
Morbus Gaucher		
Alpha-1-Antitrypsin-Mangel, familiäre Hypercholesterinämie, Fanconi-Anämie, Hunter-Syndrom, Ornithintranscarbamylase-Mangel, Purinnukleosid-Mangel, SCID-ADA, X-gebundenes SCID		
Infektionskrankheiten (HIV)	36	(6,8%)
kardiovaskuläre Erkrankungen	36	(6,8%)
Andere (rheumatoide Arthritis)	10	(1,9%)
<b>Total</b>	<b>532</b>	<b>(100,0%)</b>

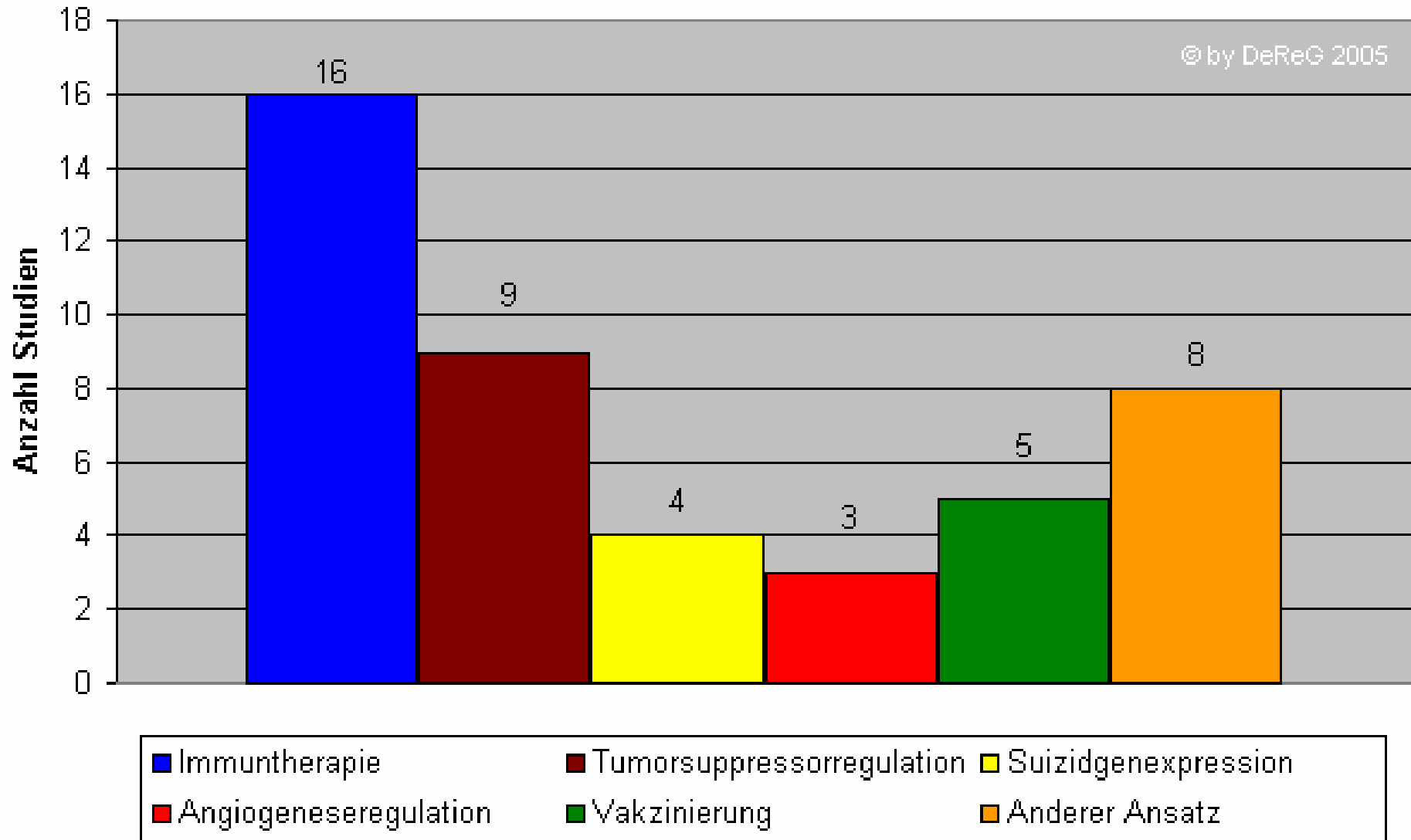
*Stand Februar 2001 [13]*



■ Studie ist initiiert
 ■ Studie wurde abgebrochen (nach Initiierung)
 ■ Studie wurde prüfplangemäß abgeschlossen

# Indikation





## **Tabelle 2**

### **Eigenschaften eines idealen Vektors**

**Hohe Konzentration**

**(>10<sup>8</sup> virale Partikel/ml)**

**Einfache und reproduzierbare Herstellung**

**Fähigkeit zur gezielten Integration in**

**das menschliche Genom oder Fähigkeit zur stabilen episomalen Persistenz**

**Regulierbare Genexpression**

**(regelbarer Promoter)**

**Fähigkeit zum Targeting der Zielzellen**

**Keine Immunantwort gegen den Vektor**



# Erfolgreiche Gentherapie mit tödlichen Nebenwirkungen

- X-linked severe combined immunodeficiency disease (X-SCID), bekannt als "bubble baby syndrome.",
- 11 Patienten fehlte das Gen IL2RG
- Das Gen wurde in Stammzellen der Kinder überführt
- Zwei (inzwischen 3) Kinder entwickelten Leukämie, bzw eine lymphatischen Tumor
- Das Transgen war bei beiden Kindern in das Tumorgen LMO2 hinein gesprungen



Vol. 20, No. 8, April 15, 2000

# Strides in Xenotransplantation

## The Challenge of Overcoming Hyperacute Rejection Examined At BIO 2000 in Boston

**R**esearchers induced graft tolerance in pigs transplanted with a thymokidney, which is a kidney with vascularized autologous thymic tissue under its capsule, reported David Sachs, M.D., of Massachusetts General Hospital in Boston, at the *BIO 2000* conference in that city earlier this month.

“This strategy eventually may be clinically applicable for the induction of transplantation tolerance to xenografts, which is the ultimate goal of these experiments,” said Dr. Sachs, who also works with **BioTransplant** (Charlestown, MA).

The study is the first to demonstrate



# Präimplantationsdiagnose



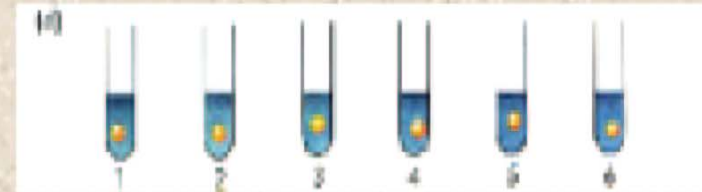
Eizellen werden *in vitro* befruchtet



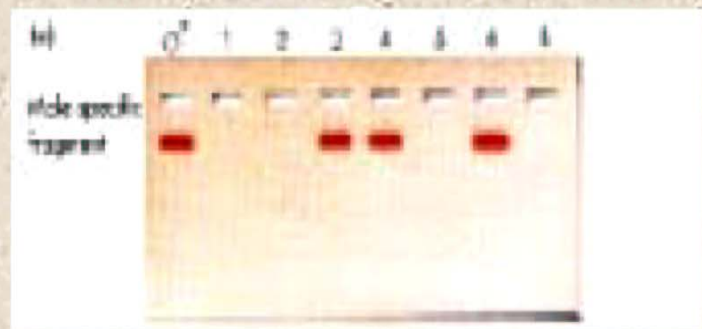
Embryonen werden bis zum 6- bis 10-Zellstadium *in vitro* kultiviert



Von jedem Embryo wird eine Zelle entnommen



Aus jeder Zelle wird die DNA isoliert und das gewünschte Gen mittels PCR amplifiziert



Die PCR-Produkte werden durch Gelelektrophorese analysiert