

Thema Gentechnologie

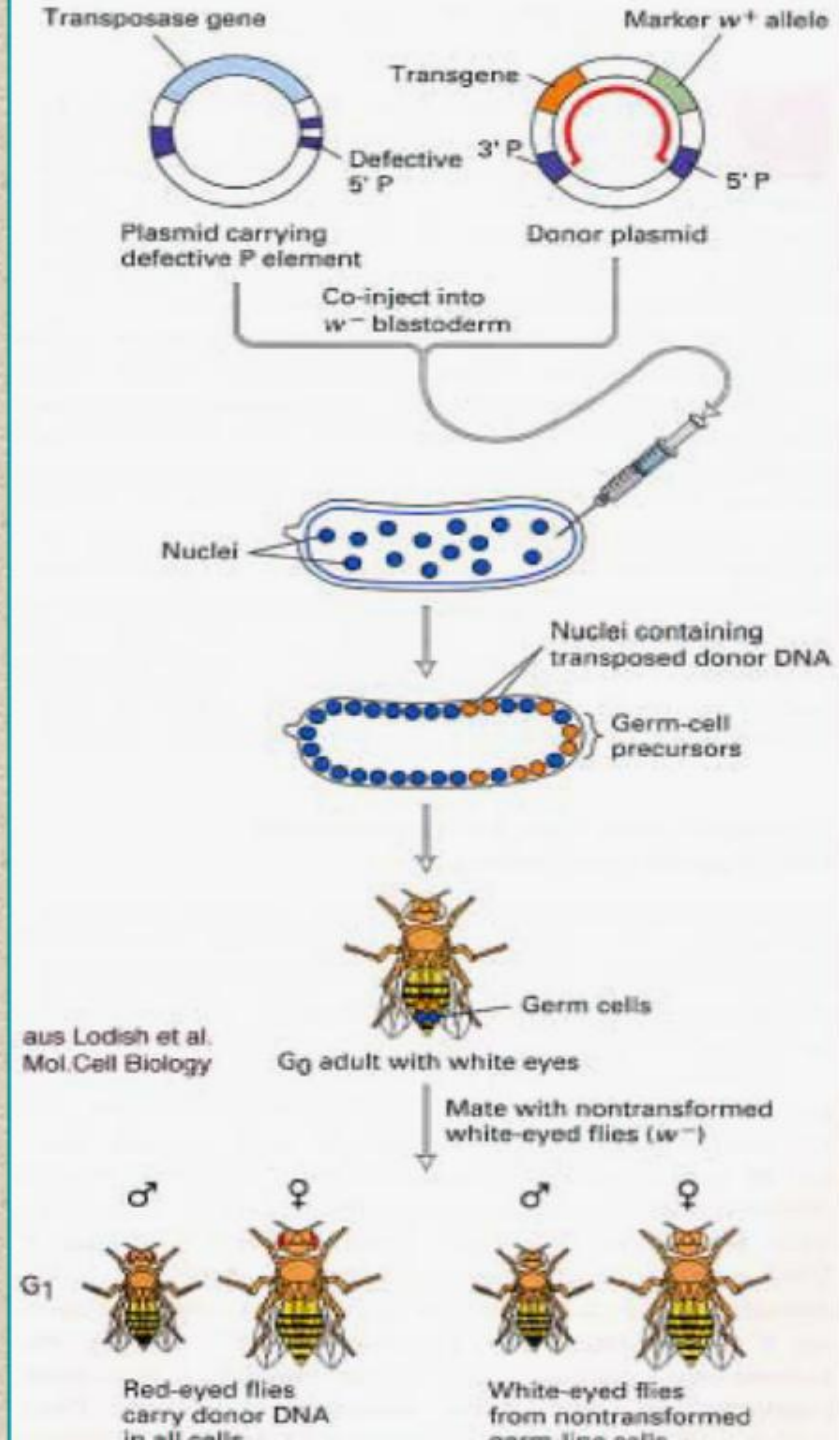
Erwin R. Schmidt

Institut für Molekulargenetik

6. VL

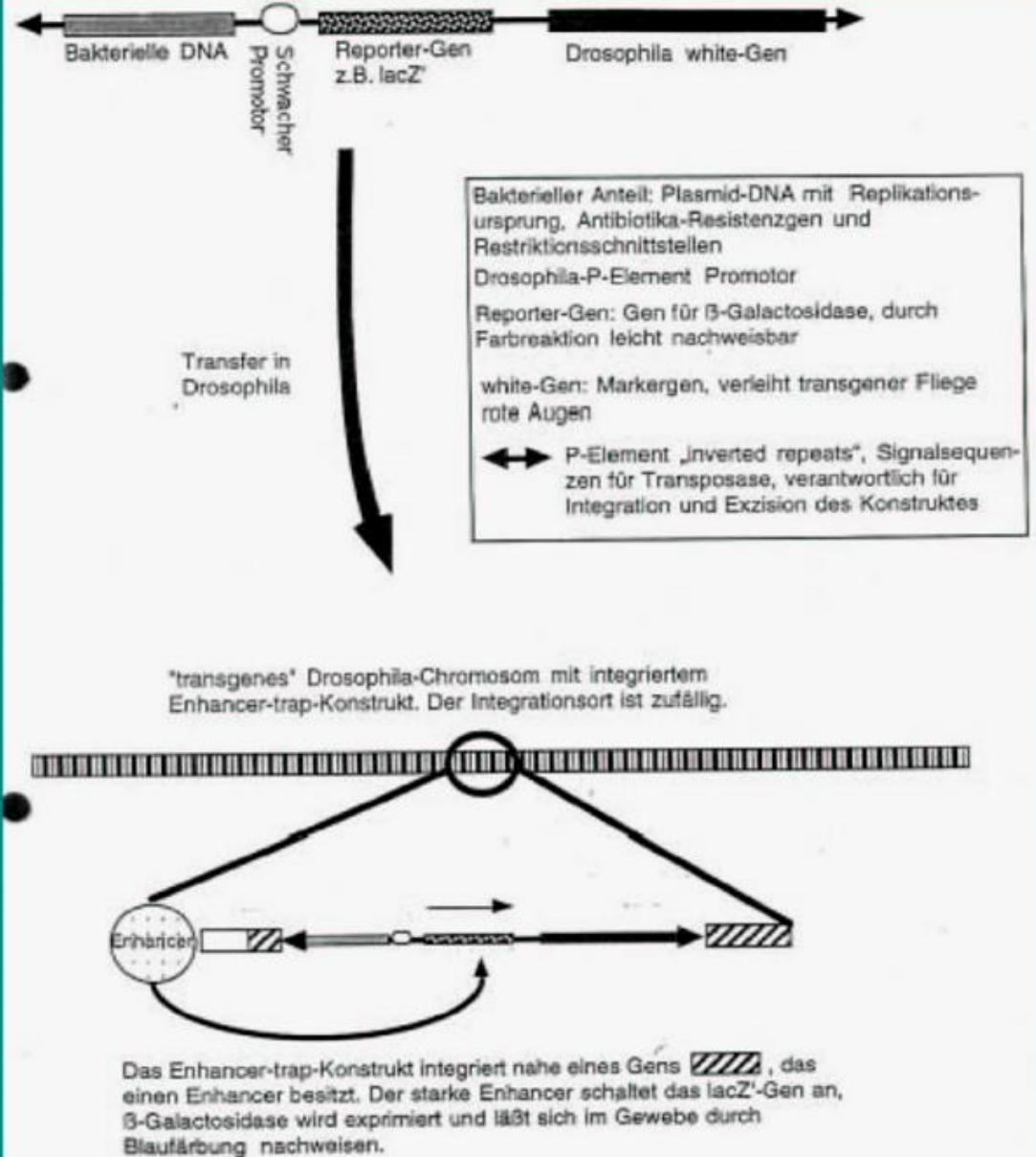
24. 05. 2011

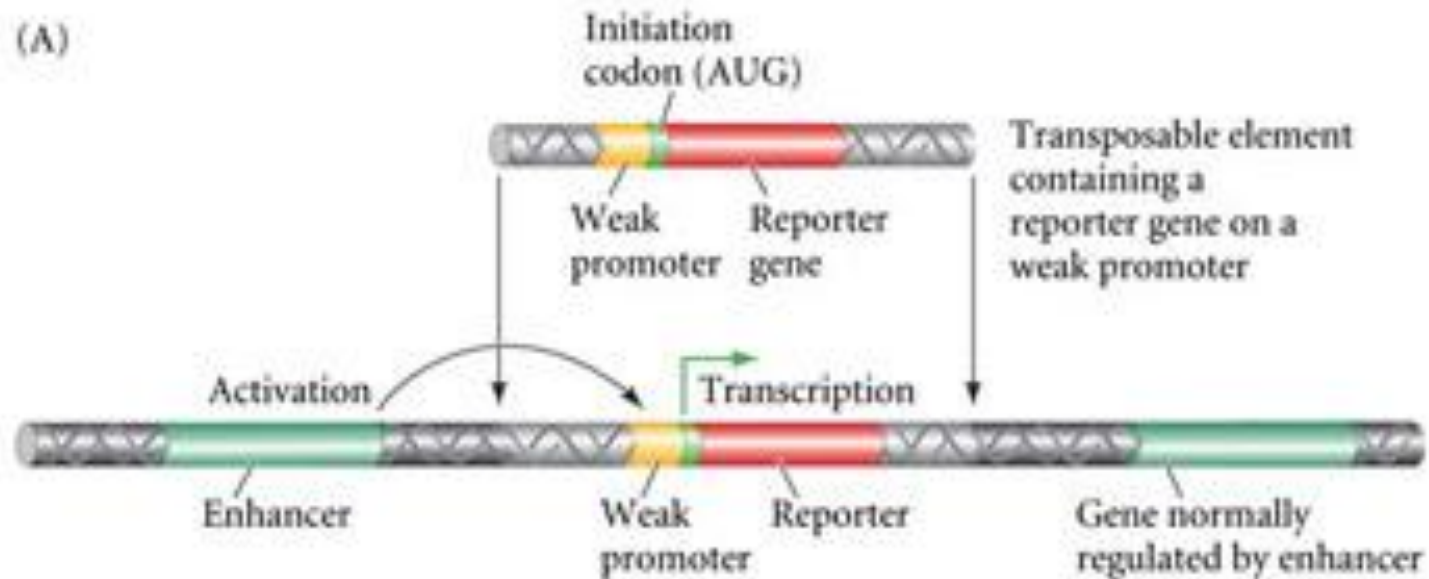
P-Element
vermittelte
Keimbahn-
trans-
formation
ist effizient
und
zuverlässig



„Enhancertrap“-Methode

P-Elemente sind extrem nützlich zum Studium der Genfunktion z. B. beim Nachweis von Enhancer-Elementen





(B)



Mit der Enhancer-Trap-Methode lassen sich sehr spezifisch exprimierte Gene erkennen
Gene erkennen

Cell

Volume 71 Number 1

October 2, 1992



hedgehog and Segmentation

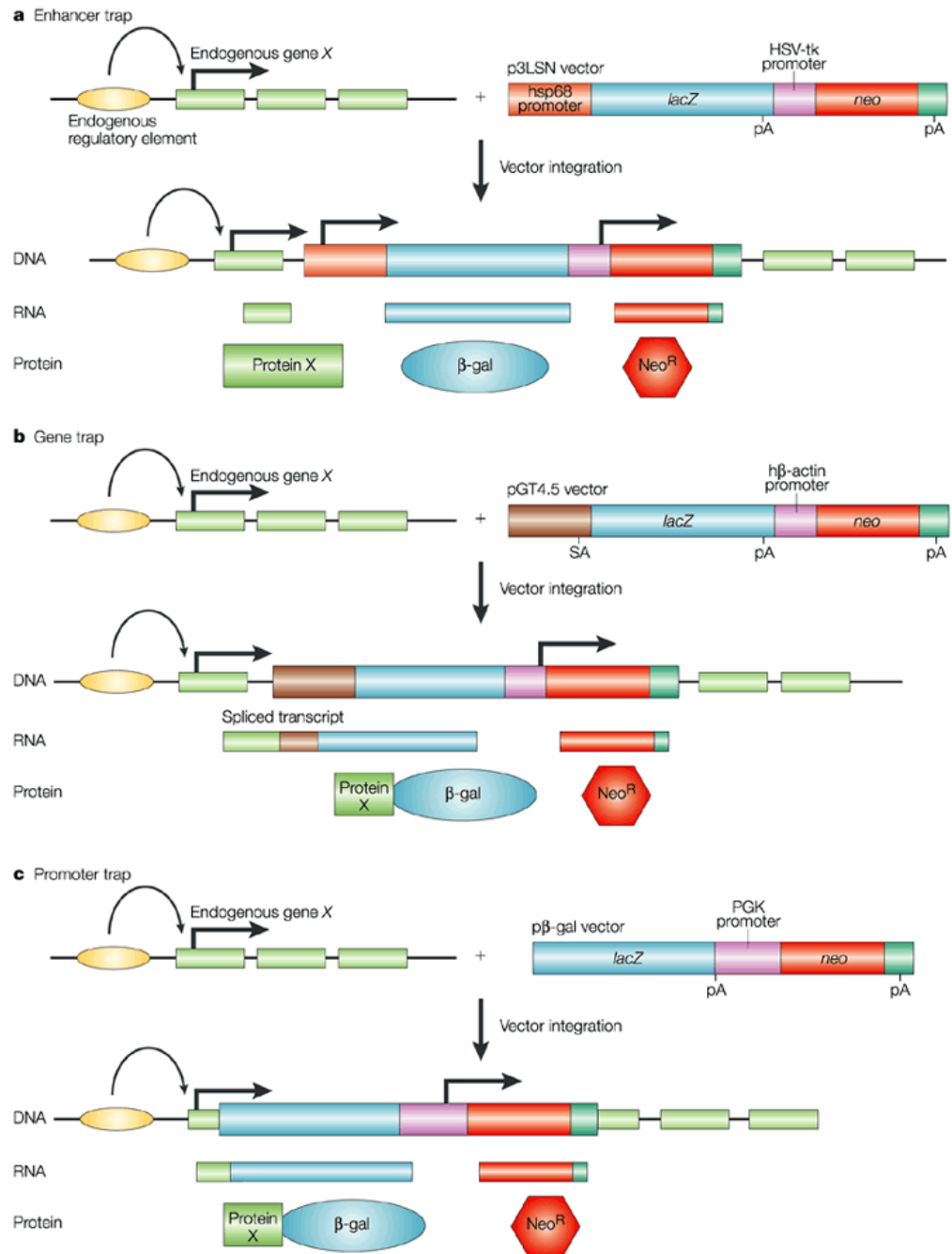
Cell

Volume 74 Number 1

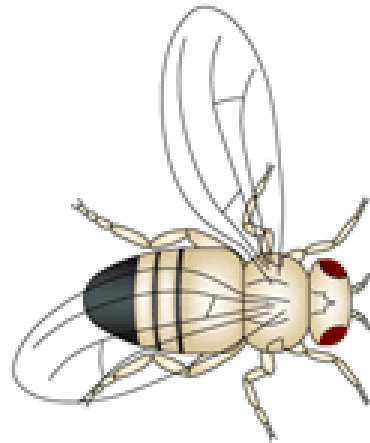
July 16, 1992



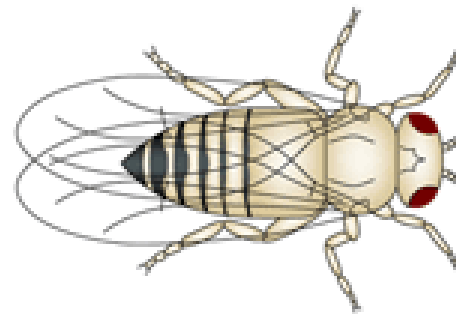
Enhancer, Gen, Promotor- Trapping



Enhancer-trap GAL4



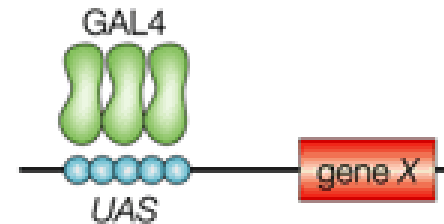
UAS-gene X



x

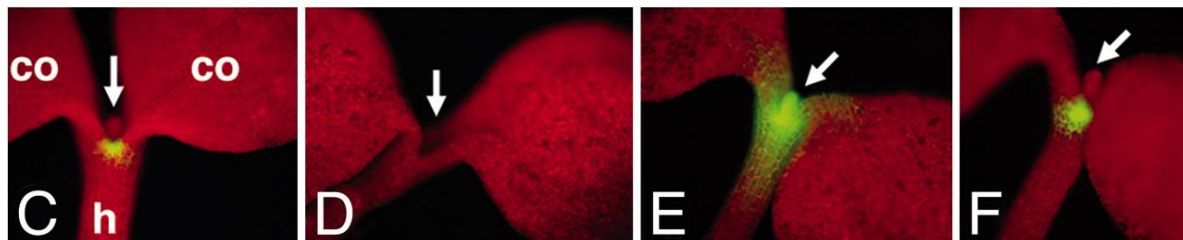
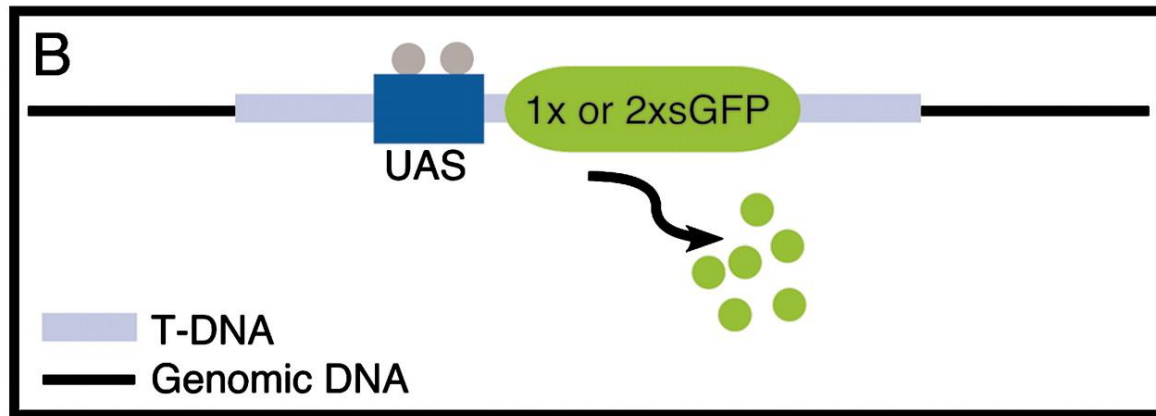
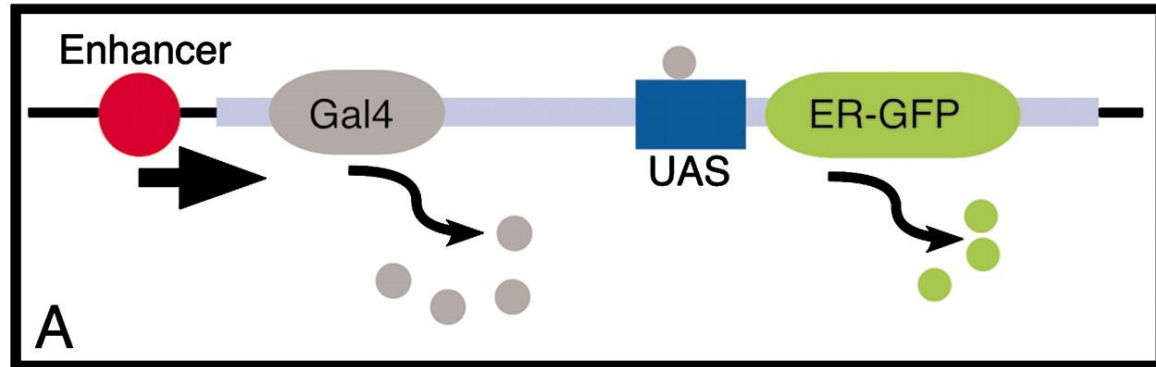


Tissue-specific expression of GAL4

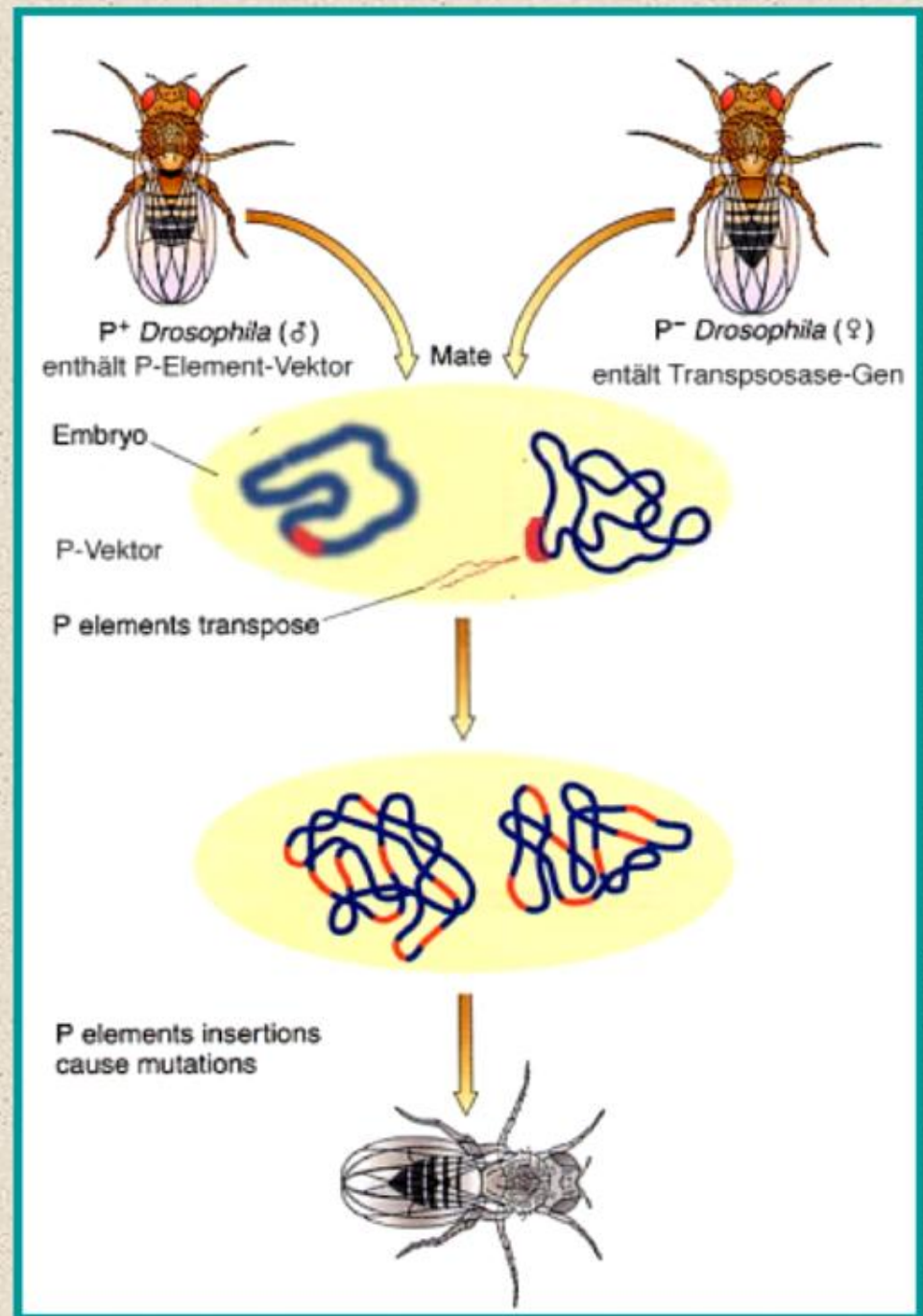


Transcriptional activation of gene X

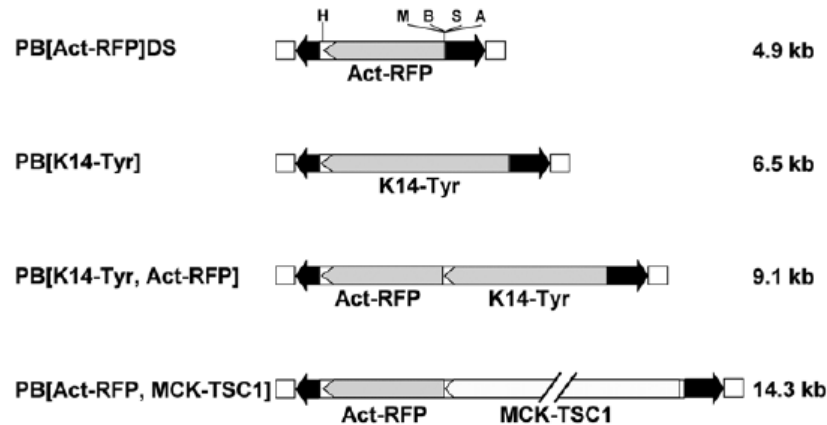
Enhancer Trap mit GAL4 Aktivatorprotein



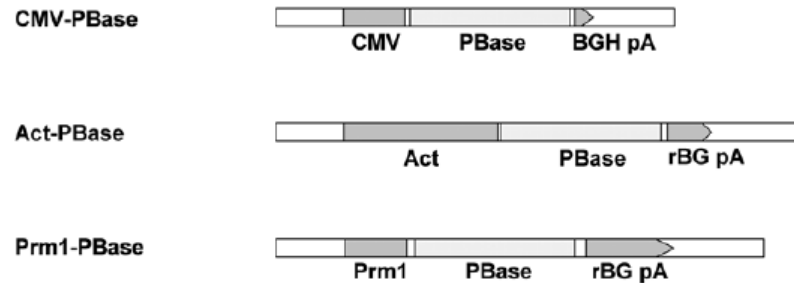
Künstlich
eingeführte P-
Elemente
können zur
Mutagenese
verwendet
werden



PiggyBac-Transposon aus *Trichoplusia ni* (Schmetterling) funktioniert in einer großen Bandbreite von Organismen inklusive der Maus



B



(A) *PB* donor constructs. Marker or endogenous genes (shaded boxes with arrows denoting transcription direction) driven by various promoters were placed between a pair of *PB* repeat termini (PBL and PBR, black arrows). Arrowheads above the termini show the relative positions of primers used for inverse PCR. Total lengths of the transposons are also indicated. Open boxes represent the plasmid backbone sequences. M: MfeI, B: BamHI, S: SmaI, A: AscI, H: HindIII.

(B) *PB* transposase helper constructs. The *piggyBac* transposase gene (*PBase*) driven by cytomegalovirus (*CMV*), β -actin (*Act*), or Protamine 1 (*Prm1*) promoters were followed by either bovine growth hormone polyA (*BGH pA*) or rabbit β -globin polyA (*rBG pA*).

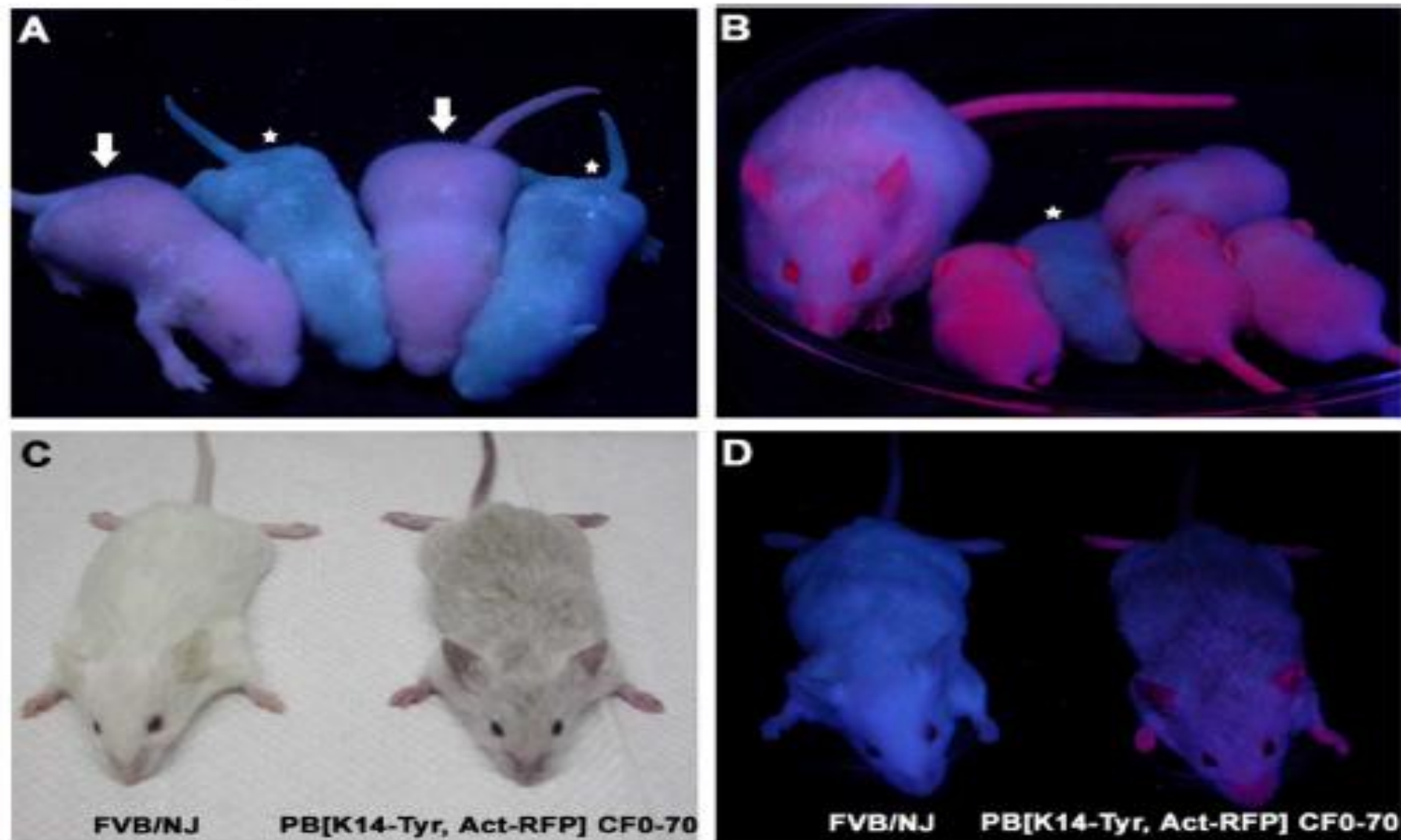


Figure 5. Expression of Transgenes in *piggyBac* Vectors



GFP-Expression in transgener Maus als ts-Mutante

Neues Feld der Gentechnologie:

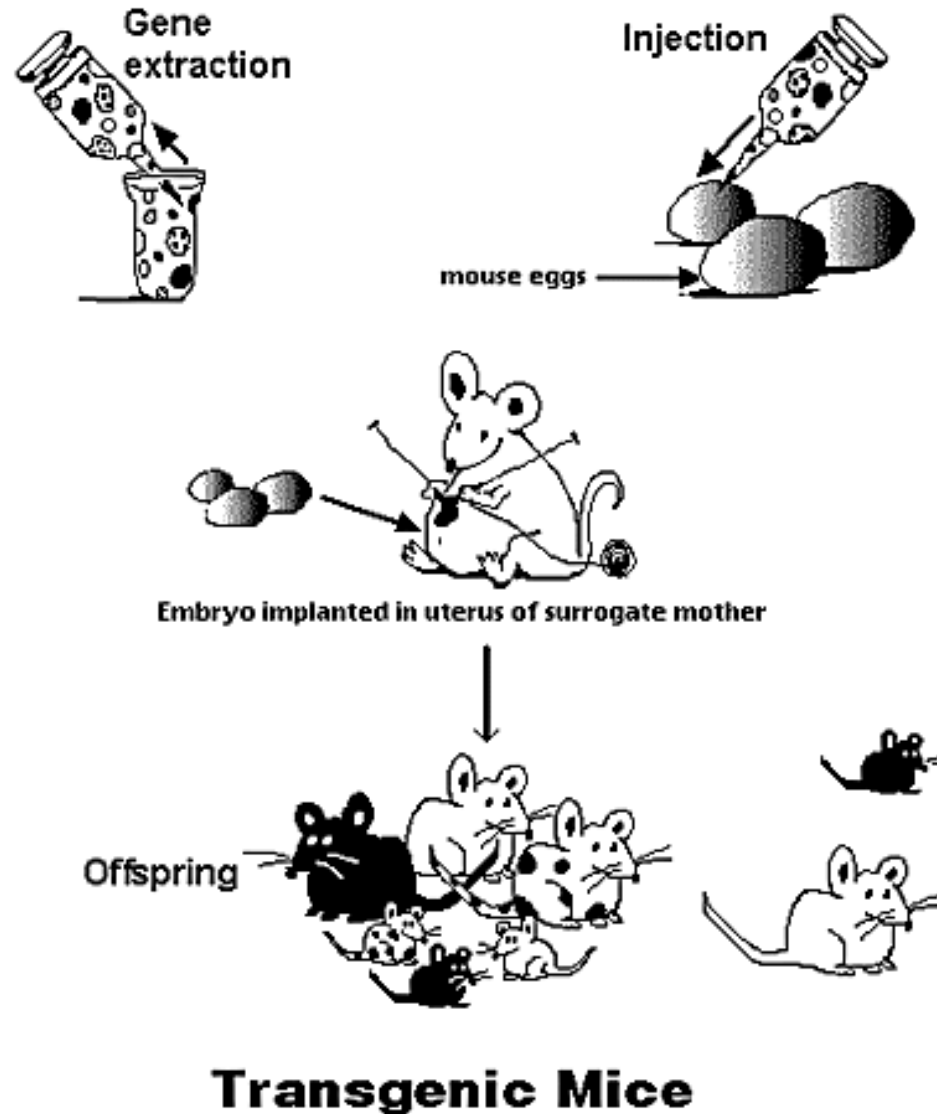
die Optogenetik

<http://www.spektrumdirekt.de/artikel/1069557>

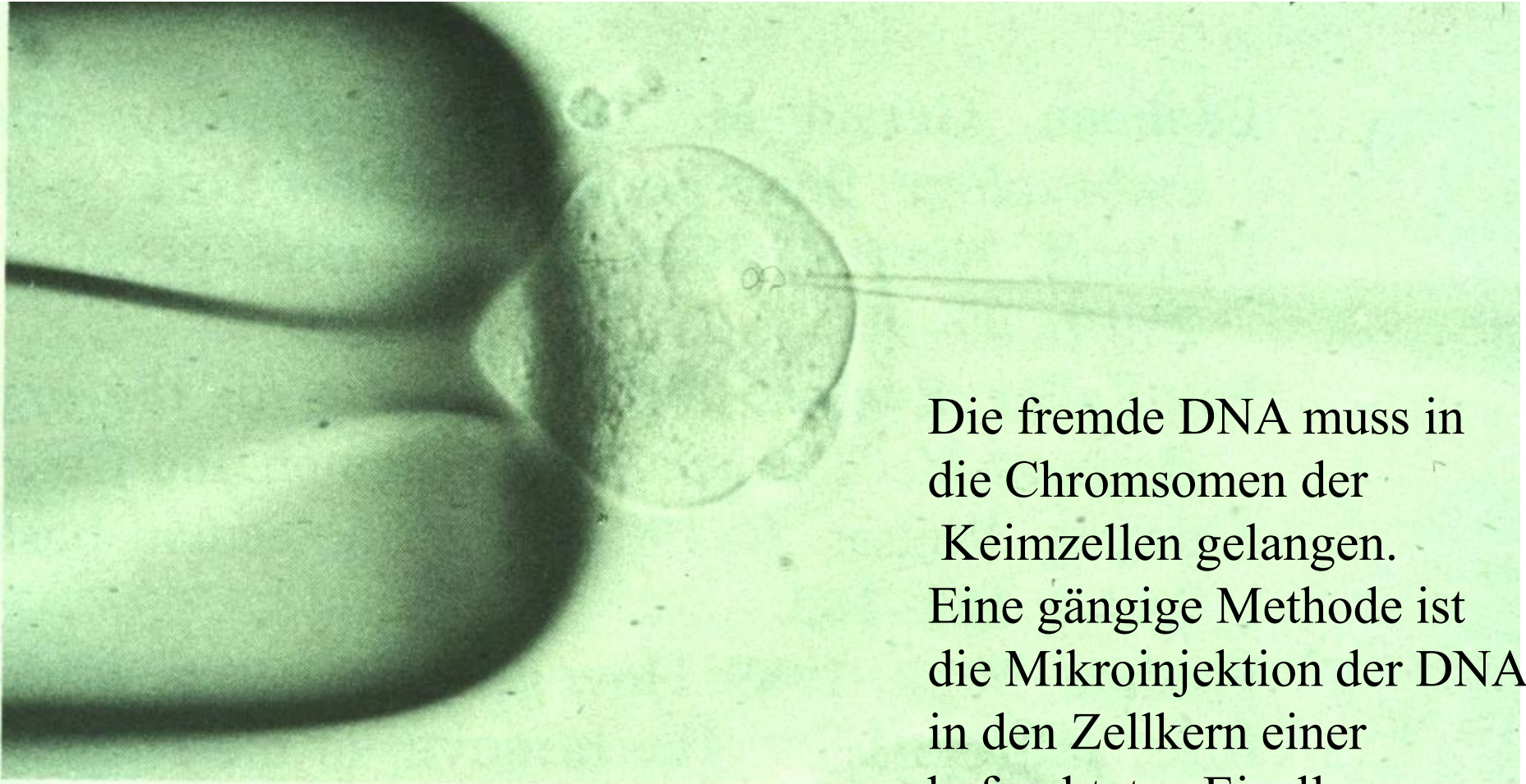
„Klassische“ DNA-vermittelte Transformation von Säugern

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

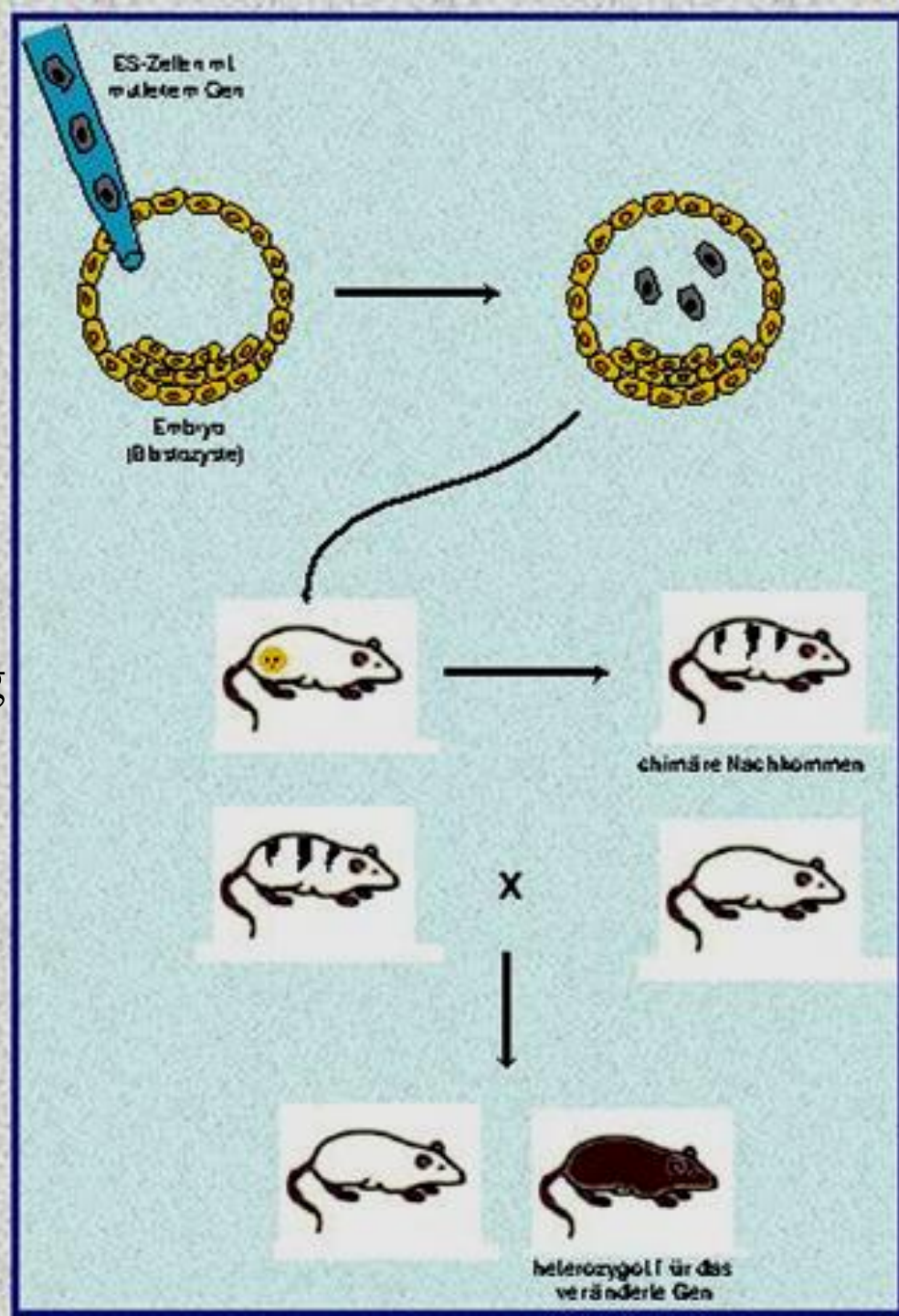
(Courtesy of Mark Steinhelper, Cold Spring Harbor Laboratory.)

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

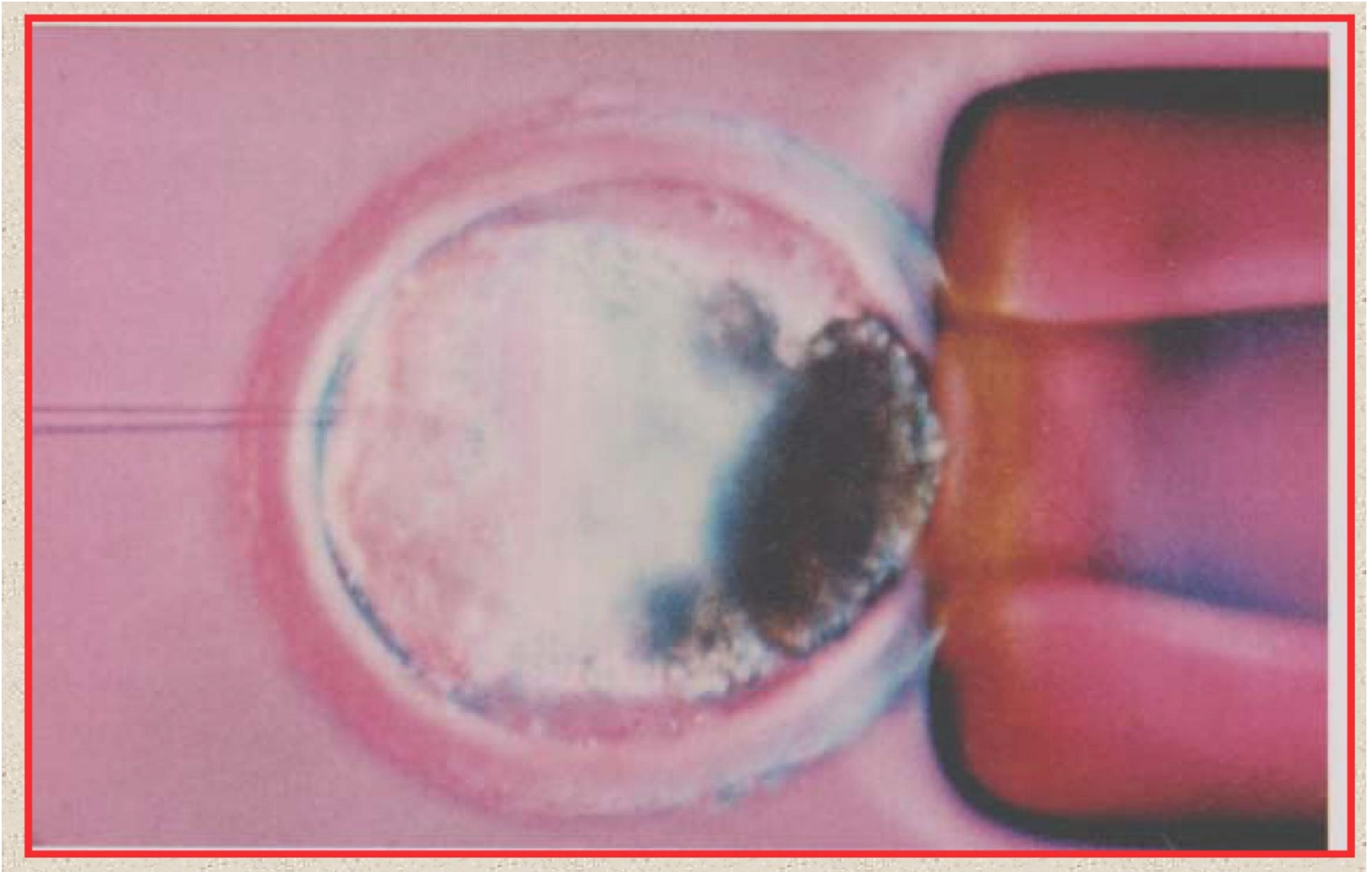
- Maus
- Rind
- Schwein
- Kaninchen
- Pferd
- Schaf

- 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).



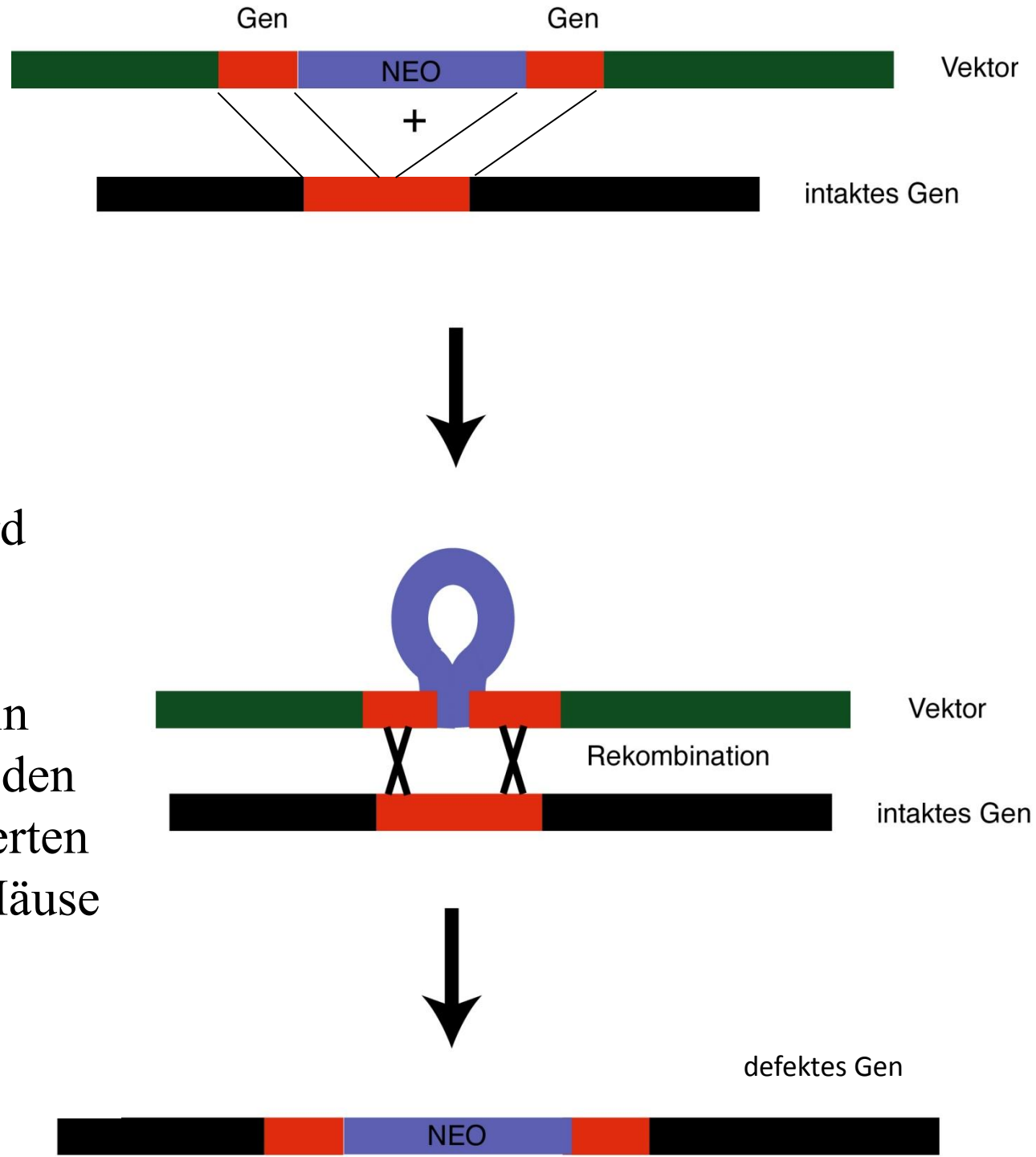
Injektion von embryonalen Stammzellen in eine Maus Blastozyste



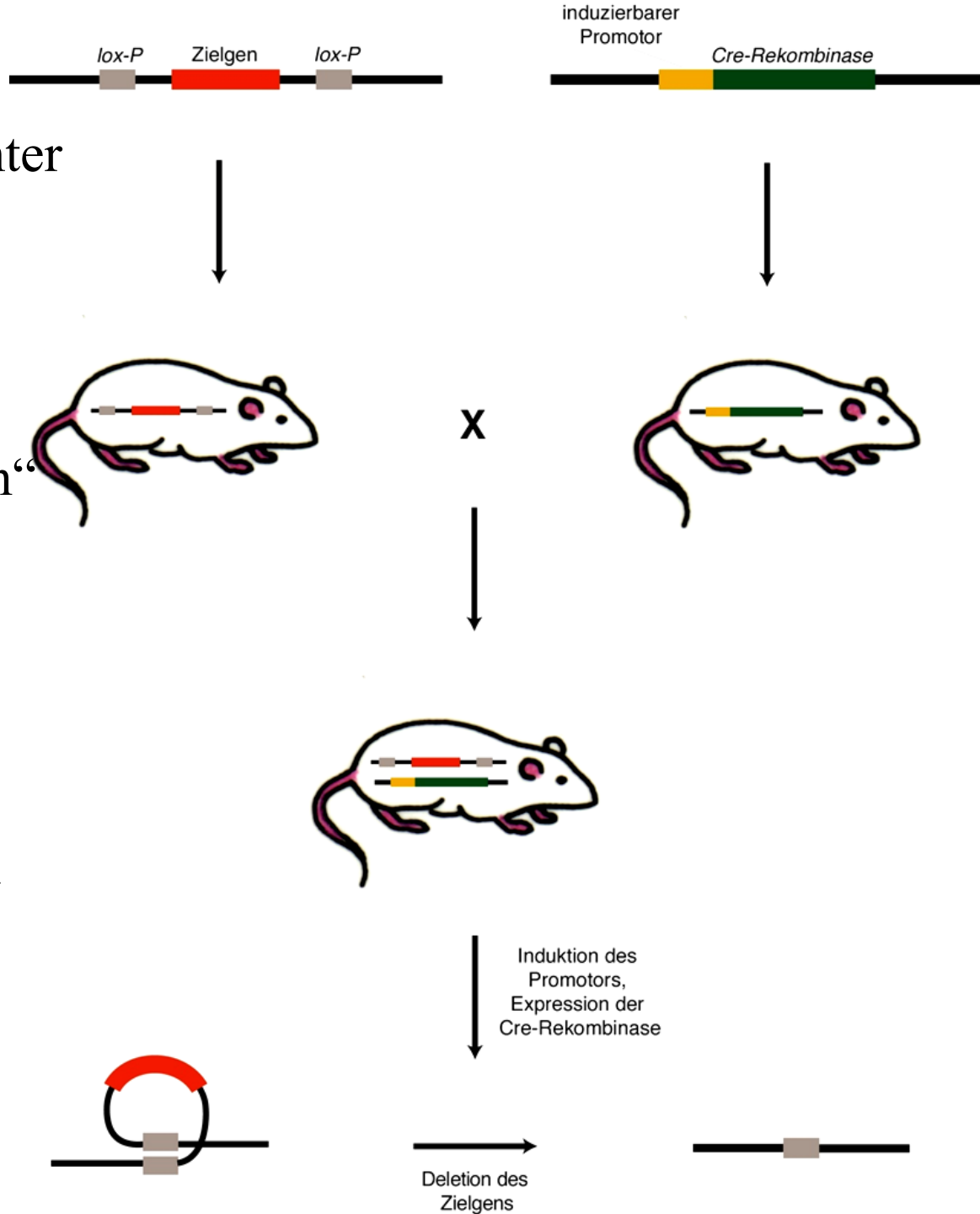
Maus-Chimären aus embryonalen Stammzellen-Transplantaten



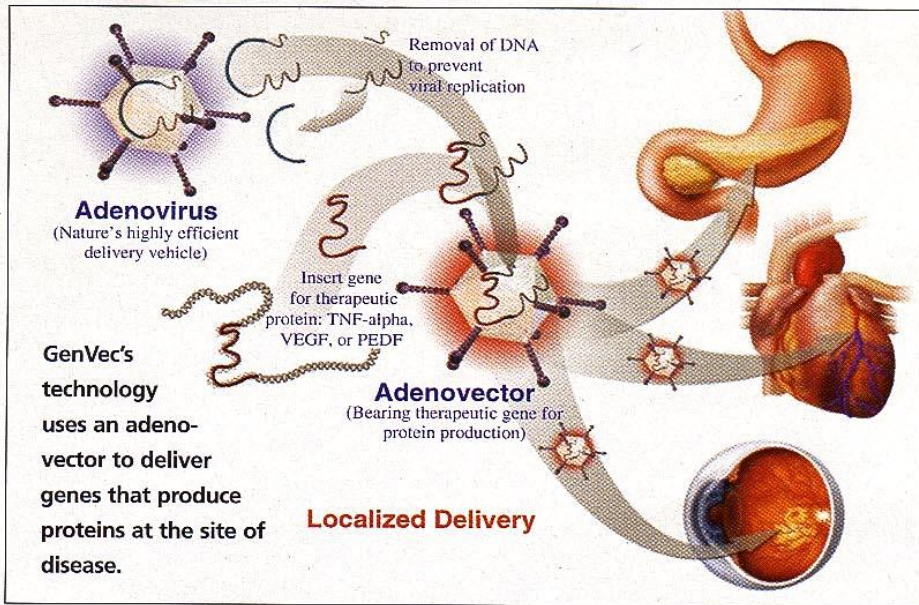
Ein besonderes Verfahren ist die Herstellung von so genannten „**knock out**“ (k.o.)-Mäusen: In einer ES-Zelle wird durch **homologe Rekombination** ein intaktes Gen durch ein defektes ersetzt. Aus den gentechnisch veränderten ES-Zellen werden Mäuse regeneriert mit dem defekten Gen (siehe vorherige Folie)



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 Immunodeficiency) 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-

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

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**

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



Eizelle



Zweizellstadium



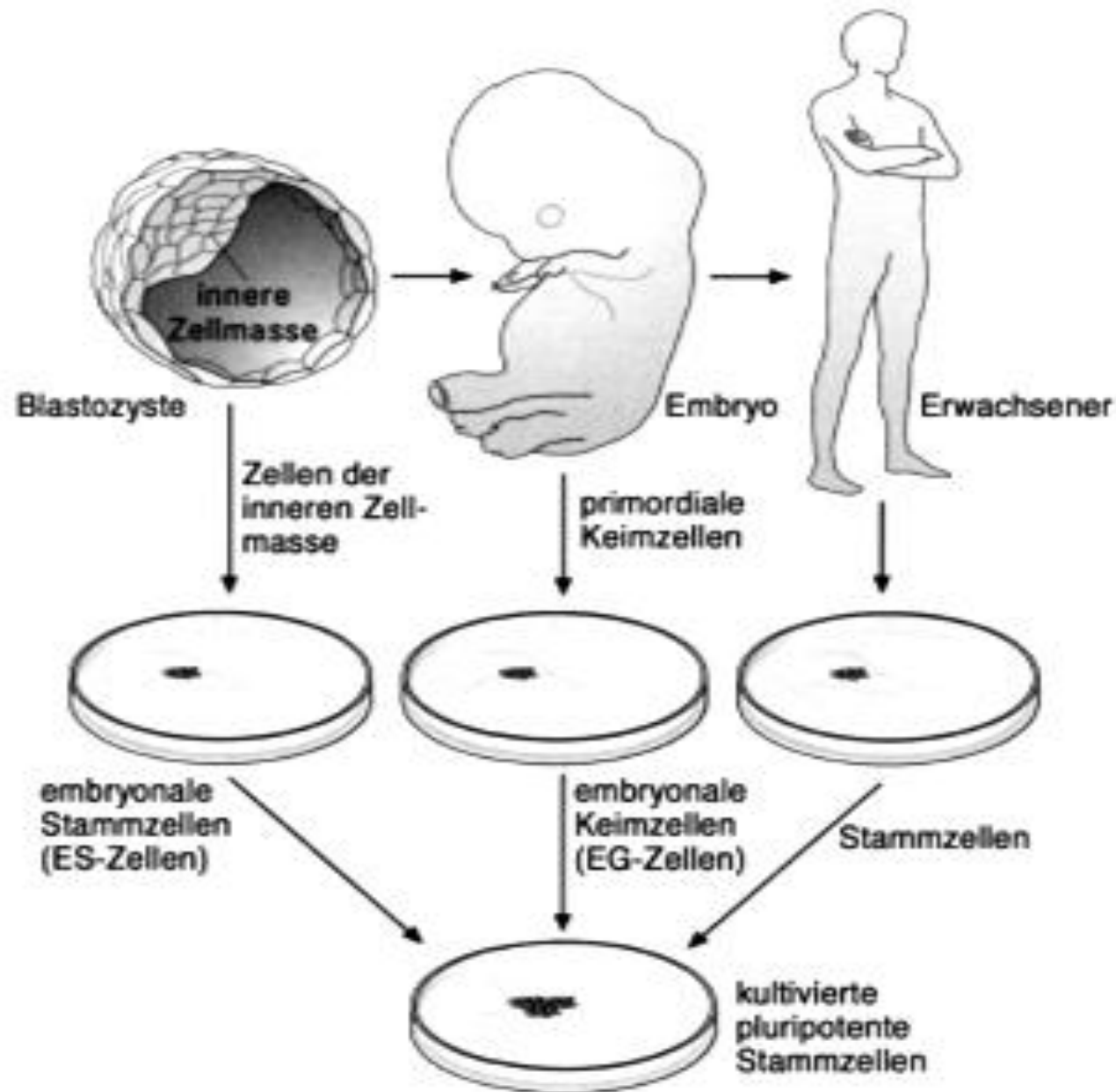
Achtzellstadium

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
Blastocysten-
stadium gewonnen

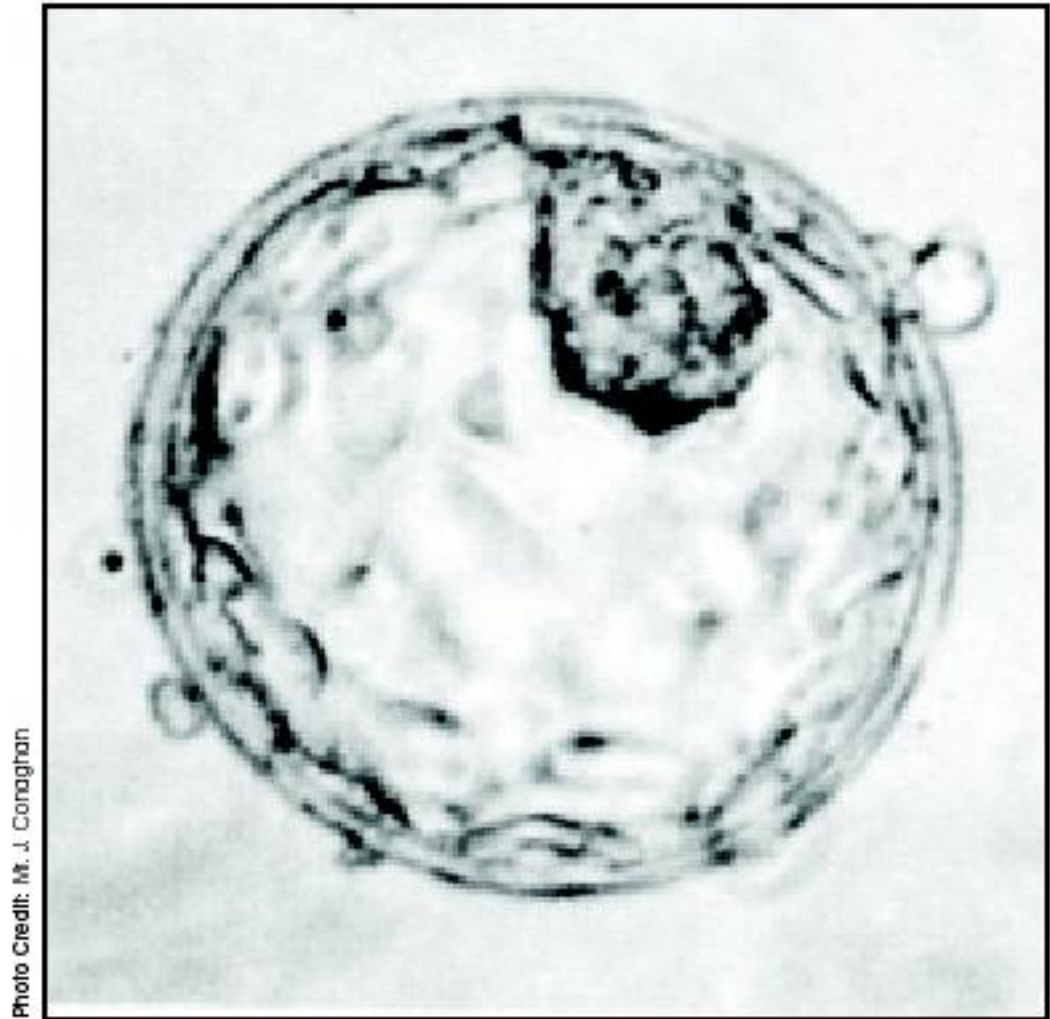
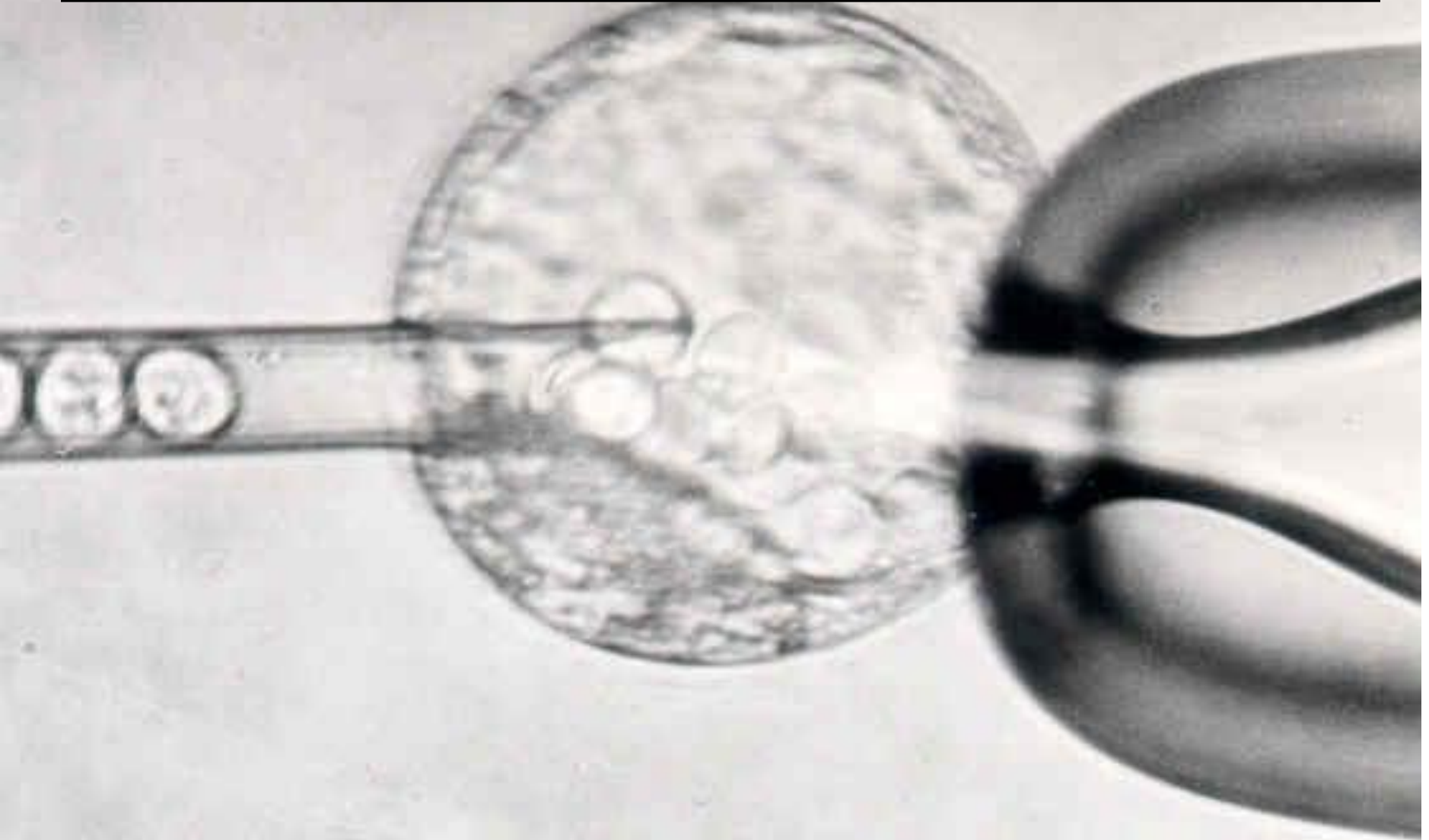


Photo Credit: Mr. J. Coraghan

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

Entnahme embryonaler Stammzellen



Entwicklung eines menschlichen Embryos:

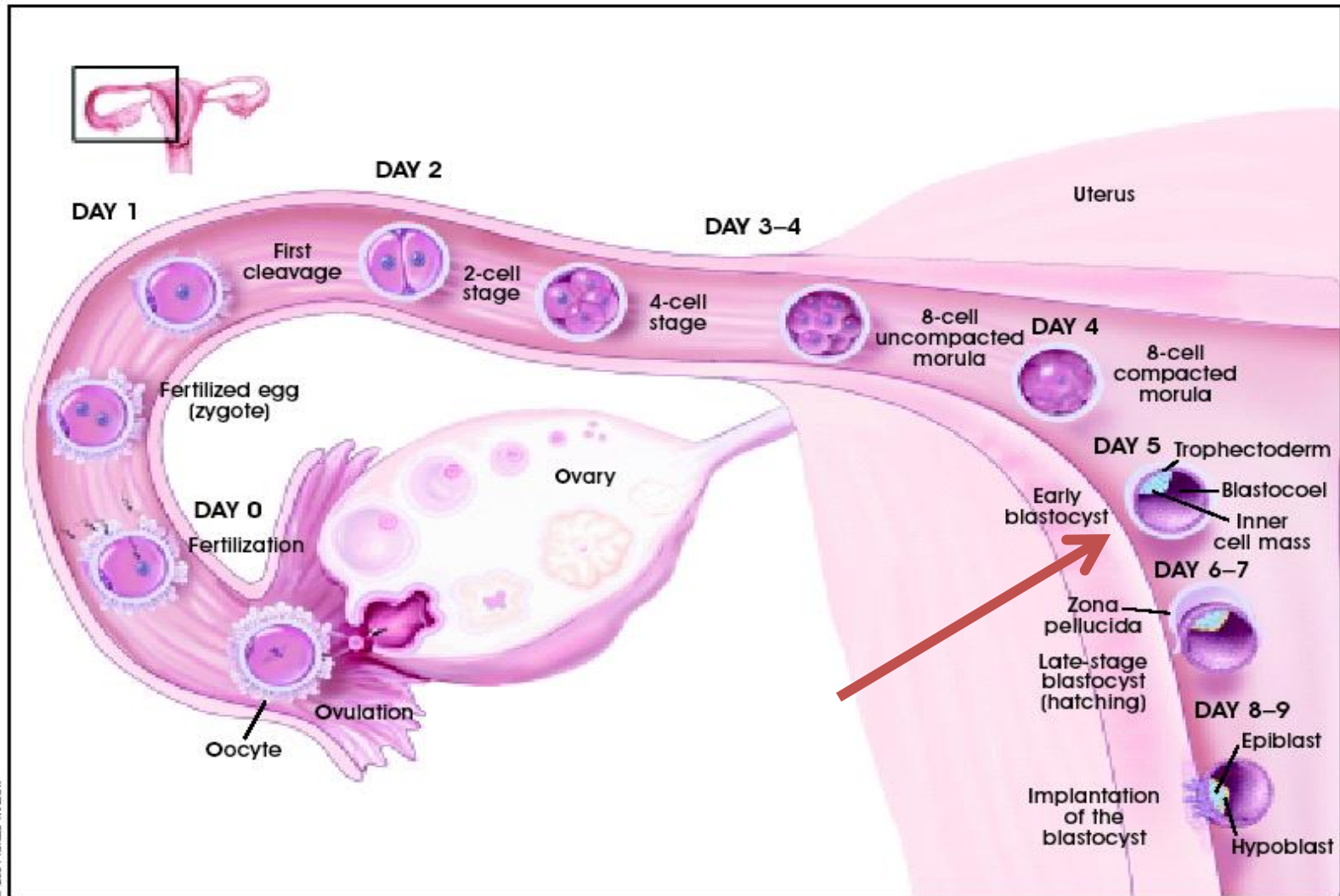


Figure A 2. Development of the Preimplantation Blastocyst in Humans

Verfügbare ES-Zelllinien

Zur Zeit gibt es zwischen mehr als 60 humane ES-Zelllinien;
aus der „National Stem Cell Bank“ (USA) können zurzeit
21 verschiedene ES-Linien bezogen werden;

NIH hES Cell Registry finden sich 64 Zelllinien
weitere 103 sind zur Prüfung eingereicht

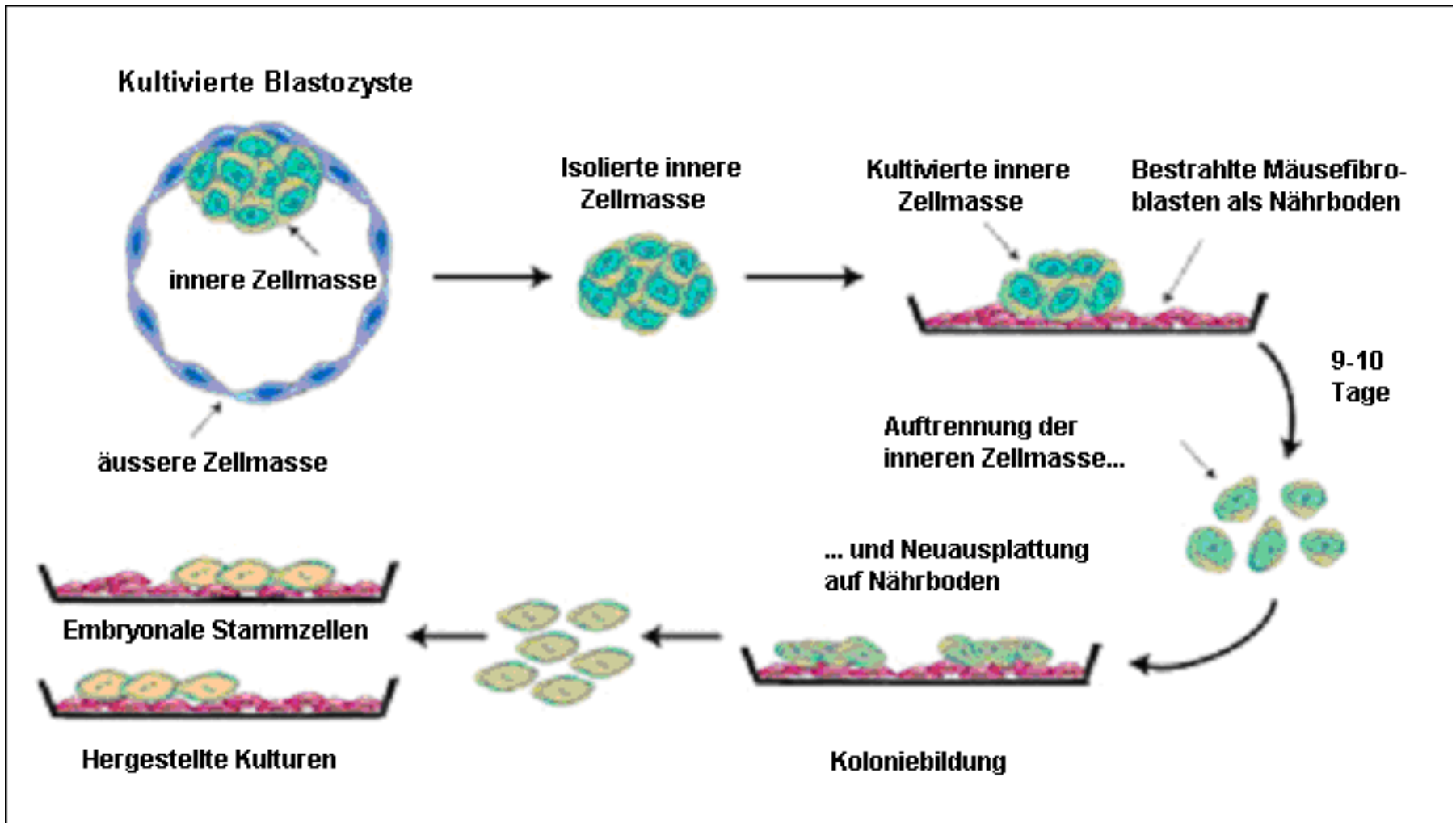
(Stand 11. 05. 2010)

[http://grants.nih.gov/stem_cells/registry/current.
htm](http://grants.nih.gov/stem_cells/registry/current.htm)

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



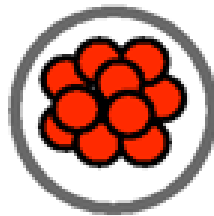
Sind embryonale Stammzellen noch totipotent?

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

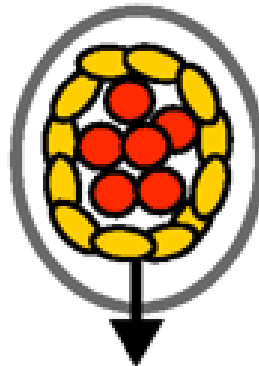
Die früheste Differenzierung der embryonalen Stammzellen:

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

A Morula

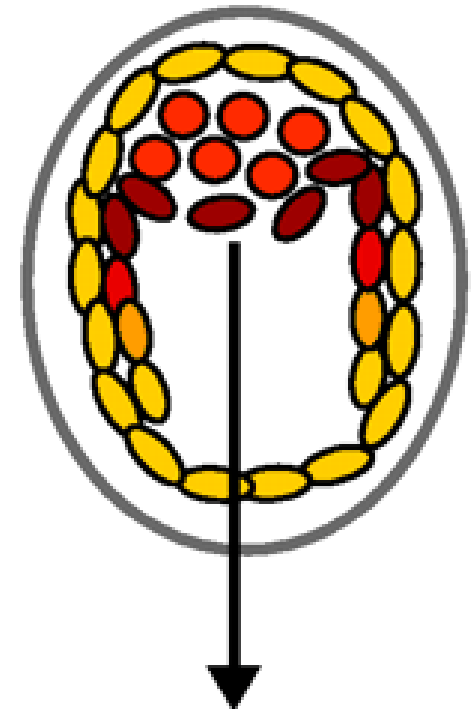


B Compacted morula



Oct-4 downregulation: trophoectoderm lineage

C Blastocyst



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

(aus Pesce and Schöler)

Etablierung einer Stammzelllinie:

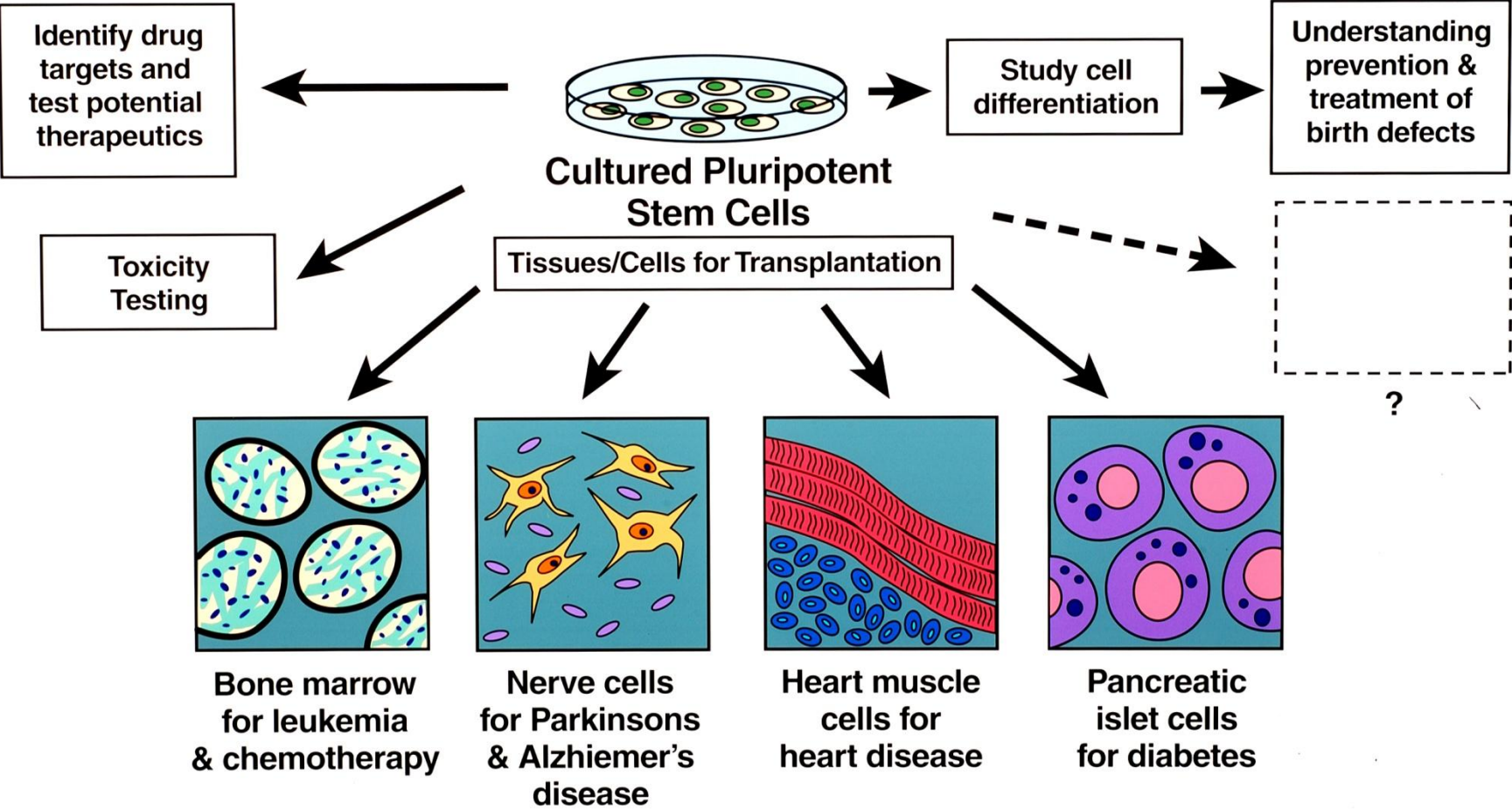
Wie viele Eizellen werden für eine Stammzelllinie benötigt?

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

The Promise of Stem Cell Research



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

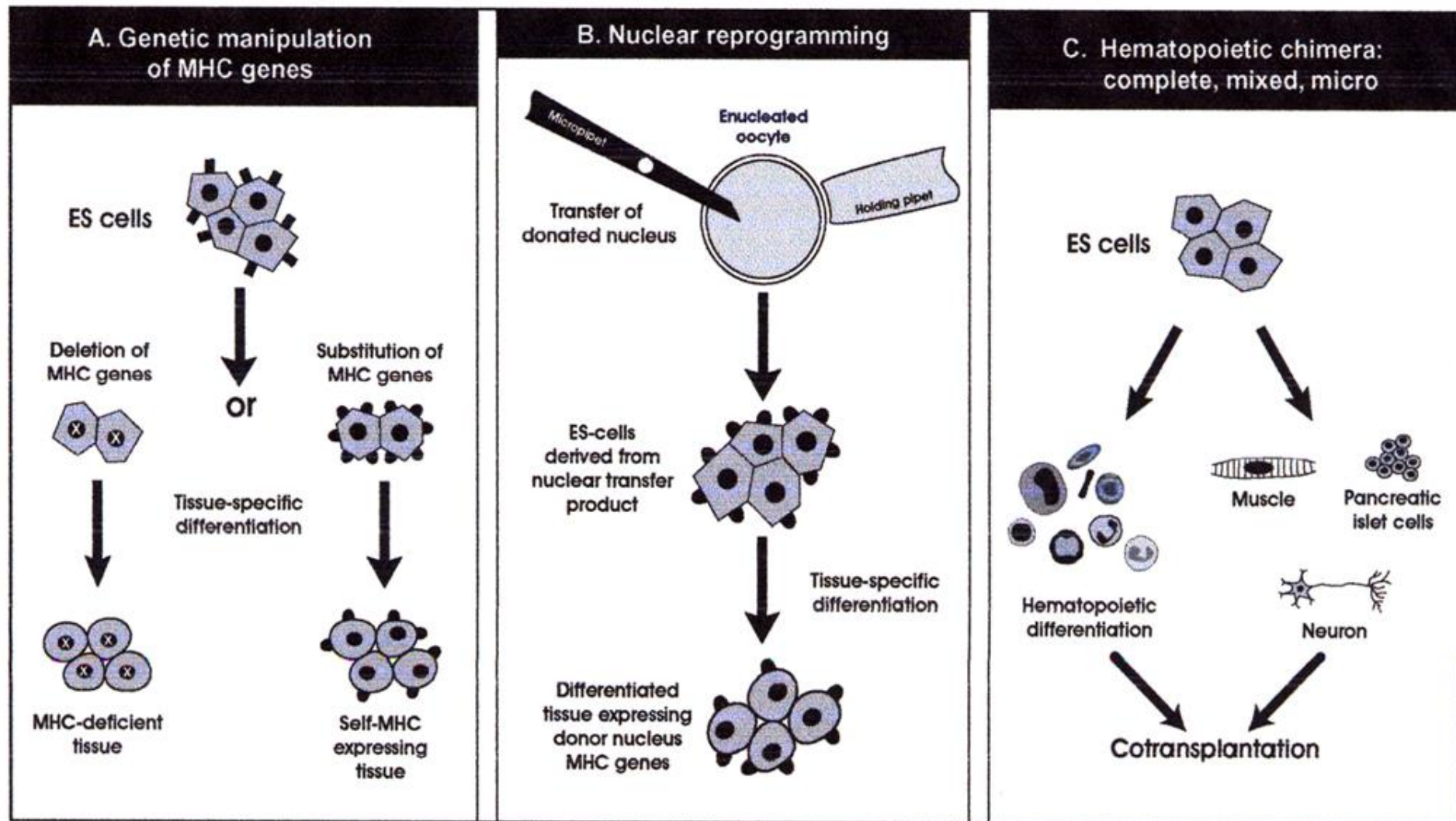


Figure 3.3. Genetic Manipulation of Human Embryonic Stem Cells. (Reproduced with permission from Stem Cells, 2001)

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