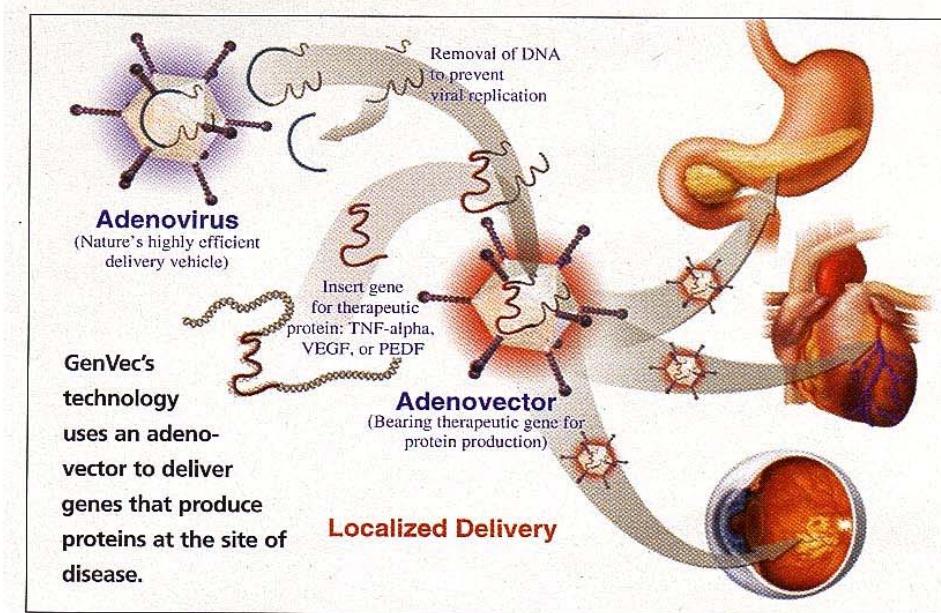


Gentherapie mit Hilfe von Stammzellen



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-

**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

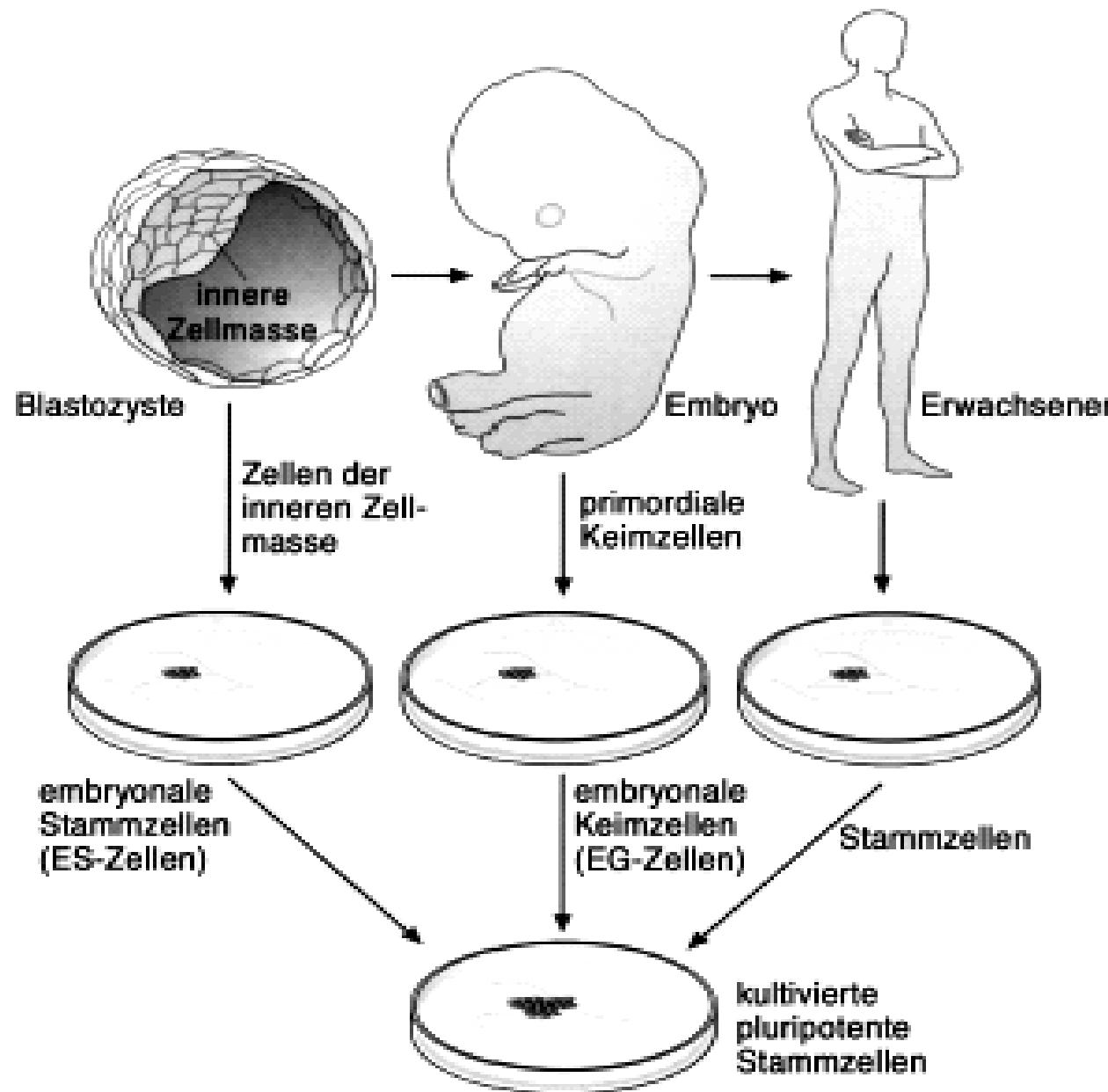


Es gibt verschiedene Arten von Stammzellen:

- 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

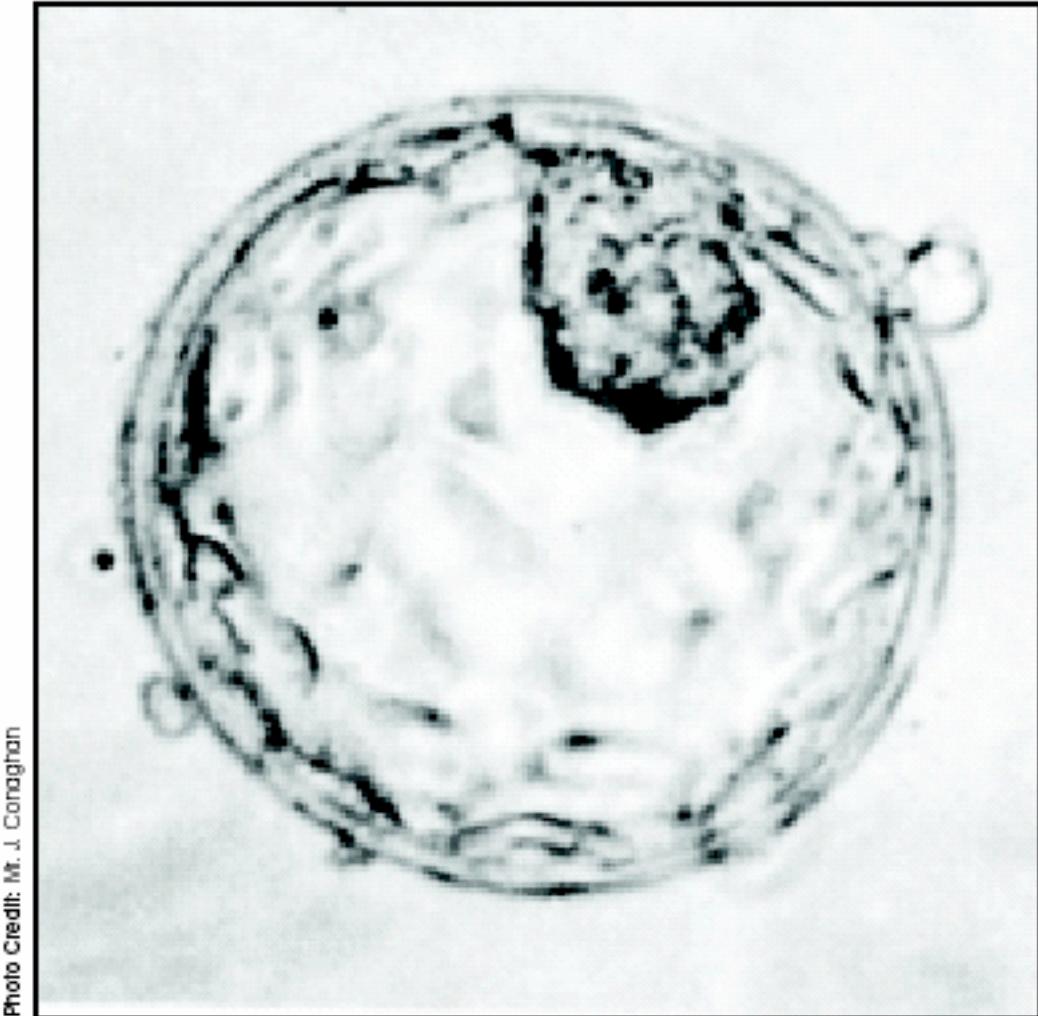


Figure 3.1. Human Blastocyst Showing Inner Cell Mass and Trophectoderm.

Entnahme embryonaler Stammzellen



Entwicklung eines menschlichen Embryos:

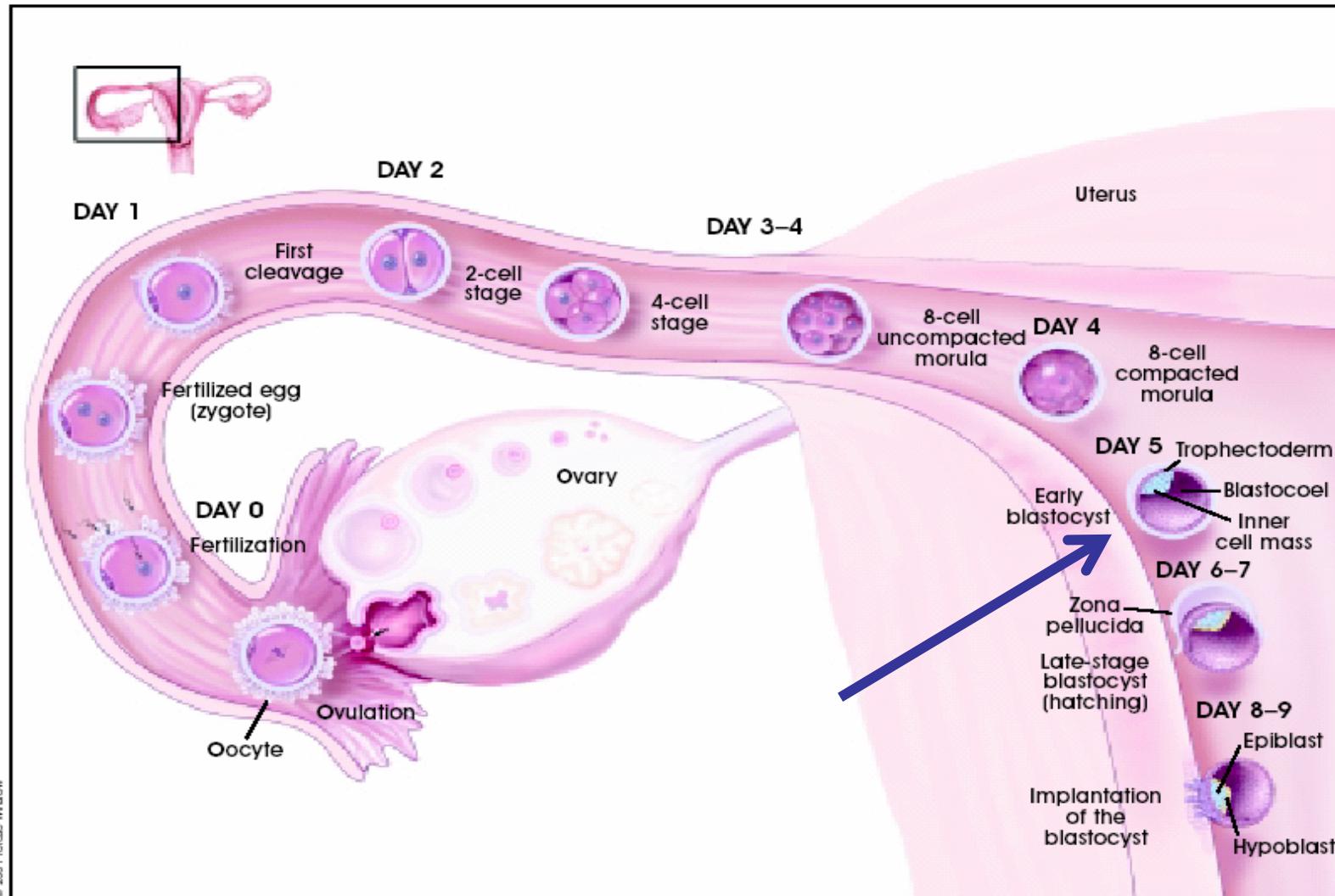


Figure A.2 Development of the Preimplantation Blastocyst in Humans

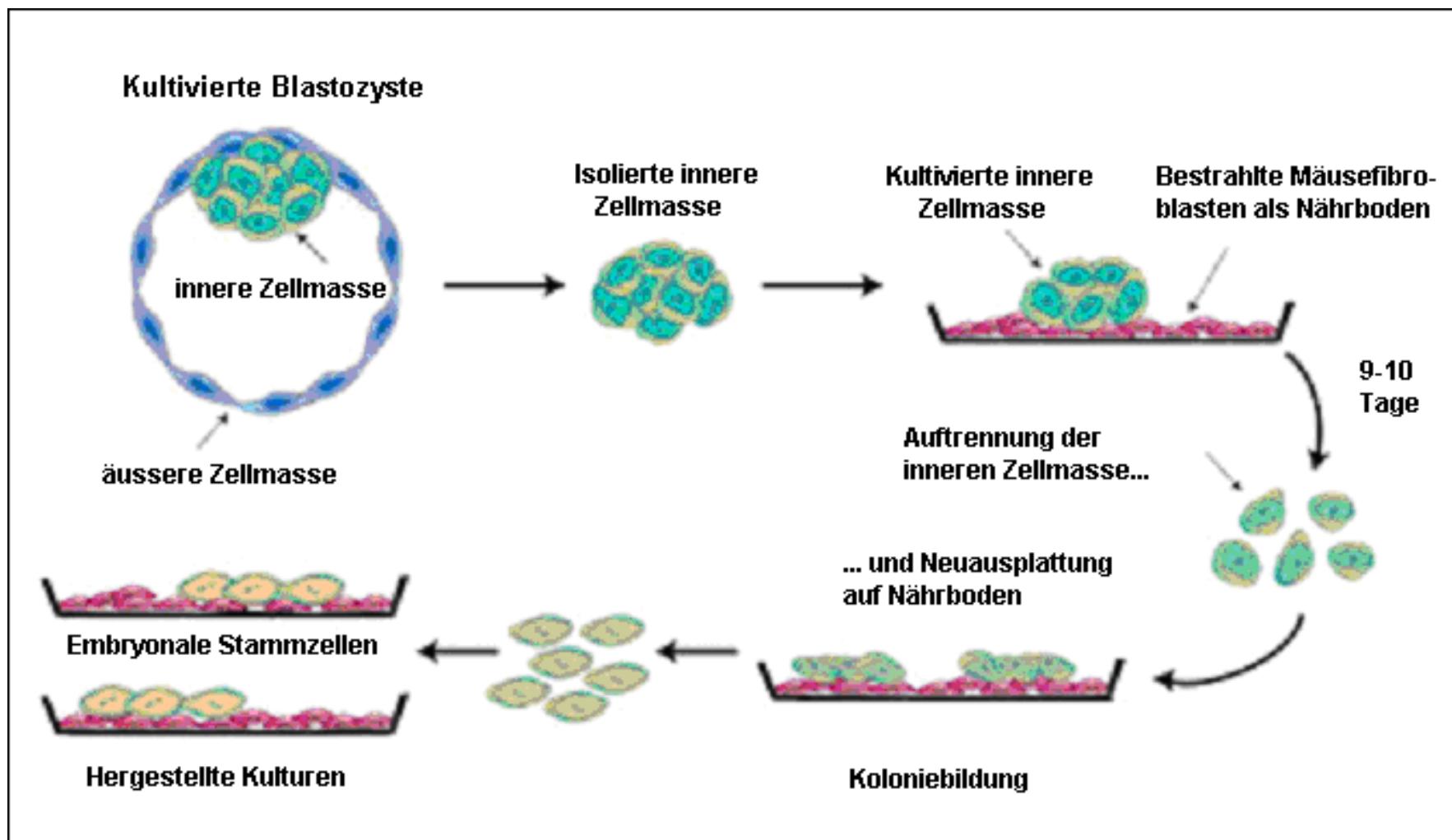
Etablierung einer ES-Zellkultur

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



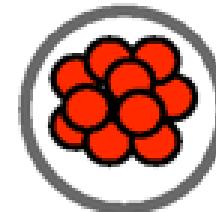
Sind embryonale Stammzellen noch totipotent?

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

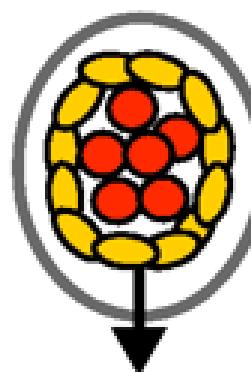
Die früheste Differenzierung der embryonalen Stammzellen:

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

A Morula

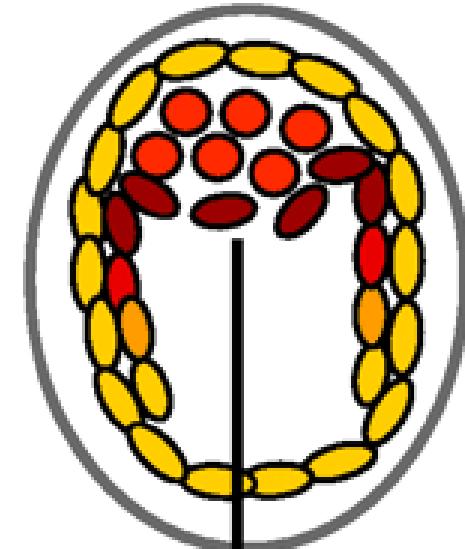


B Compacted morula



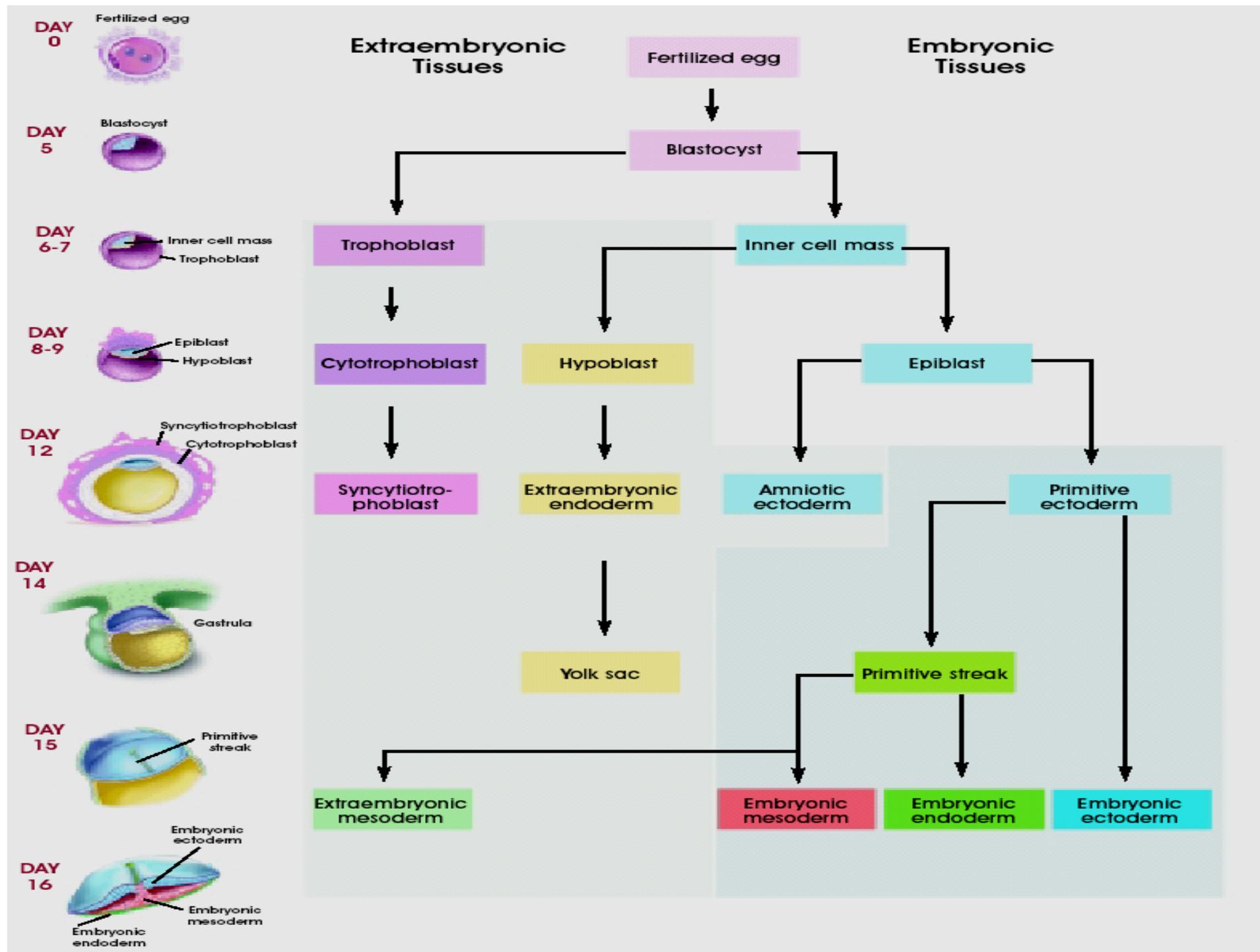
Oct-4 downregulation:
trophectoderm lineage

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

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

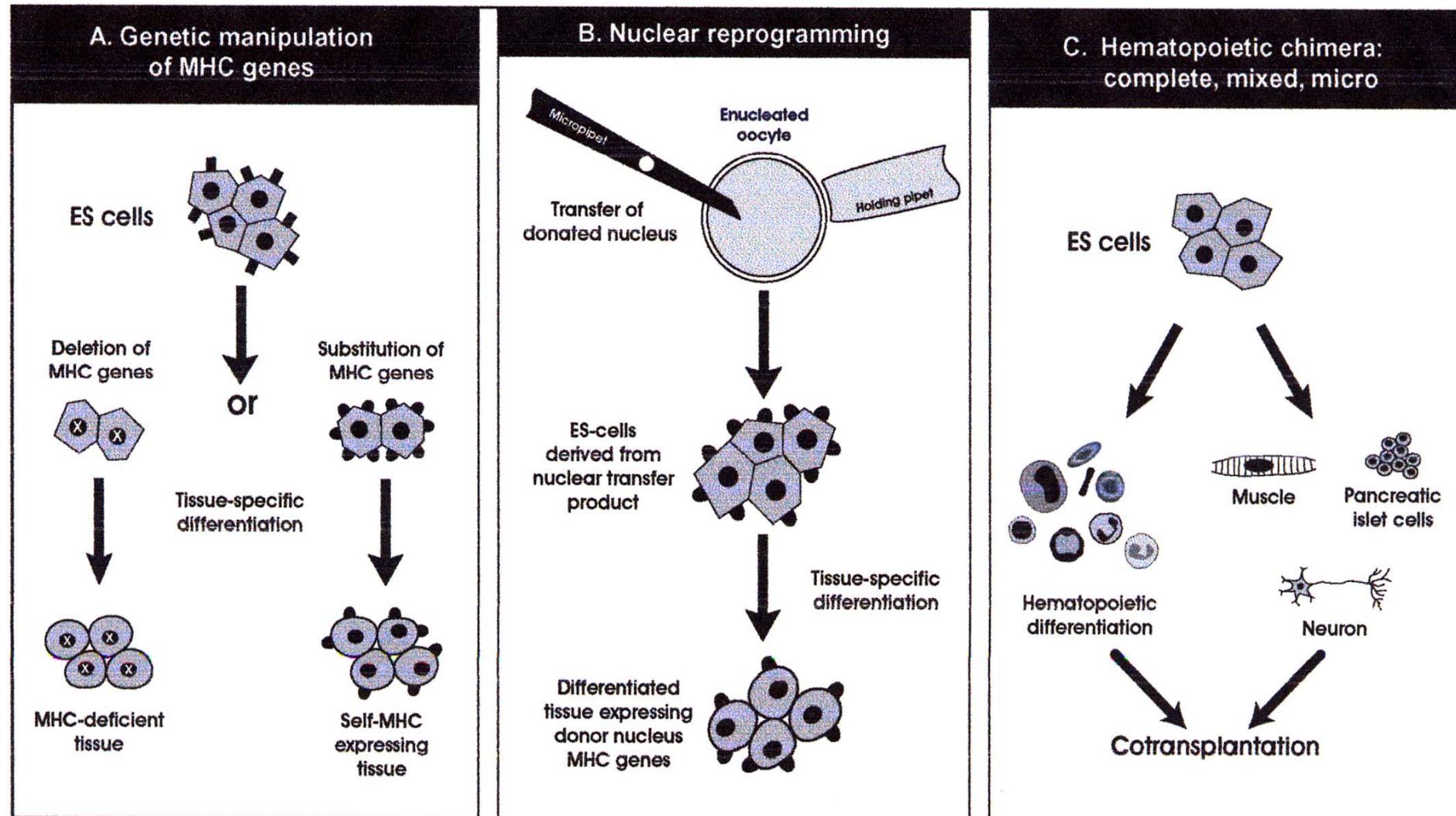


Figure 3.3. Genetic Manipulation of Human Embryonic Stem Cells. (Reproduced with permission from *Stem Cells*, 2001)

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.

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

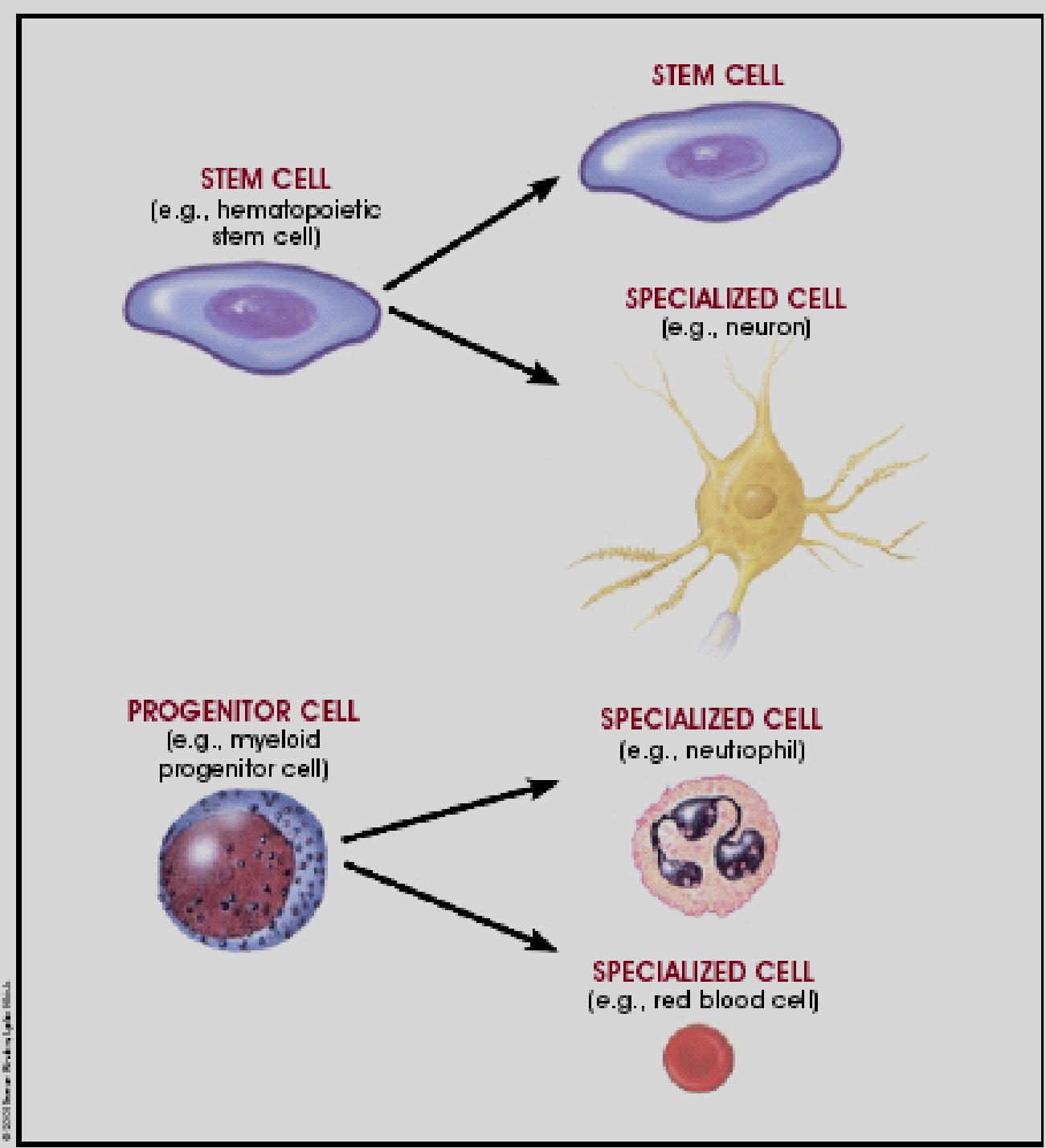
EG Zellen bilden auch **keine Teratome** nach Injektion in Mäuse!

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

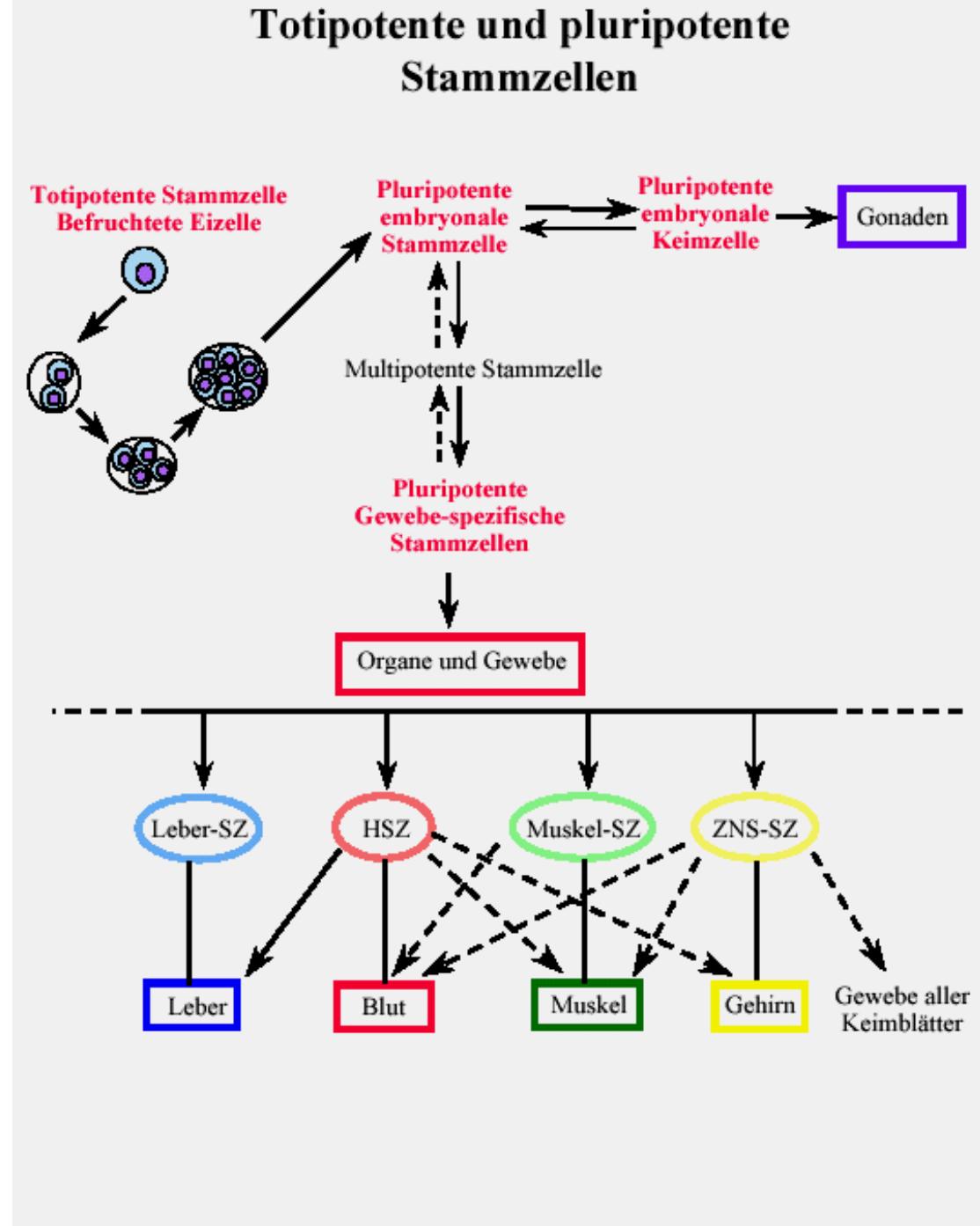
„Adulte“ Stammzellen

- **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?

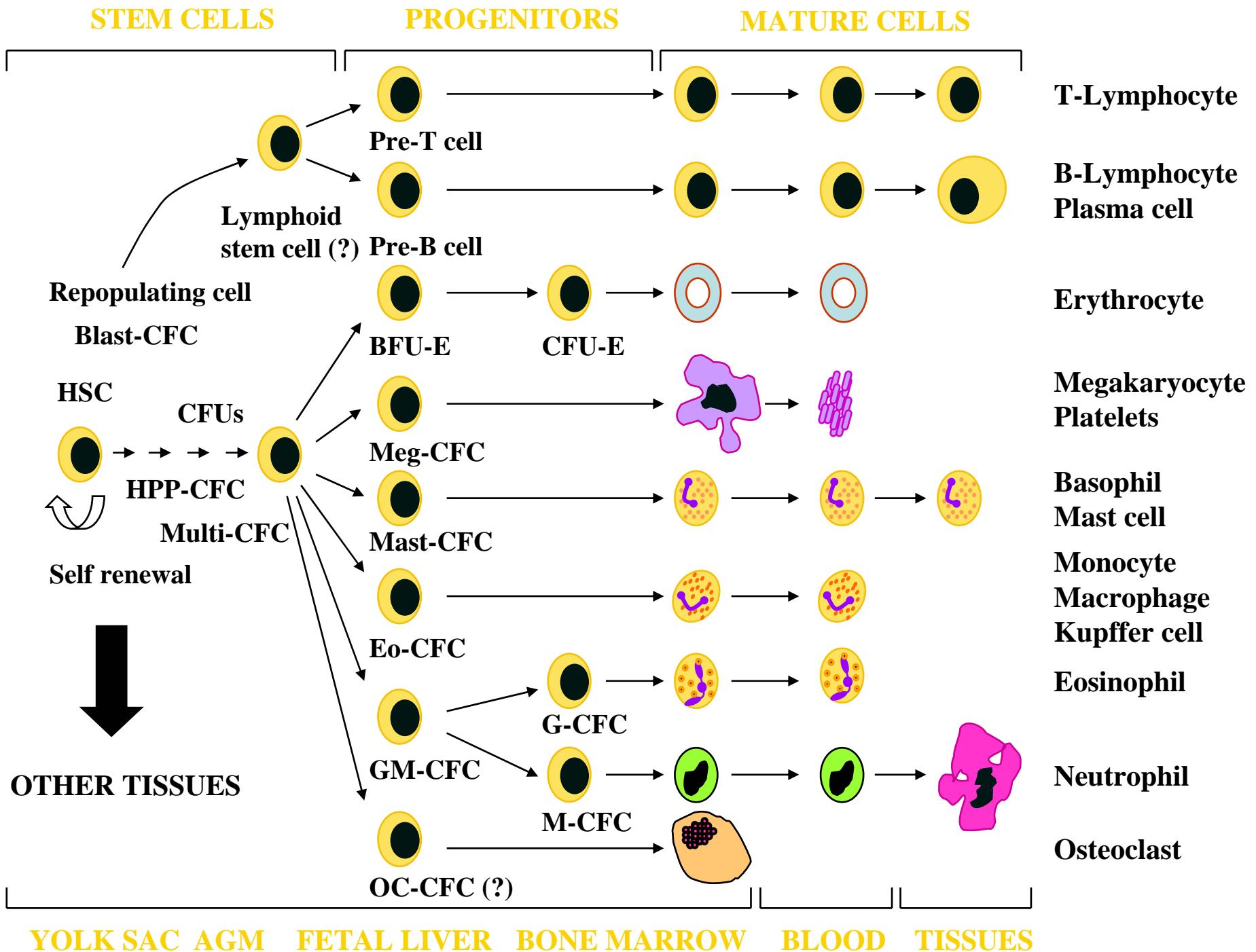


„Adulte“ Stamm- zellen oder Vorläufer- zellen?



Beispiel: Stammzellen des Knochenmarks

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



Gewinnung adulter Stammzellen

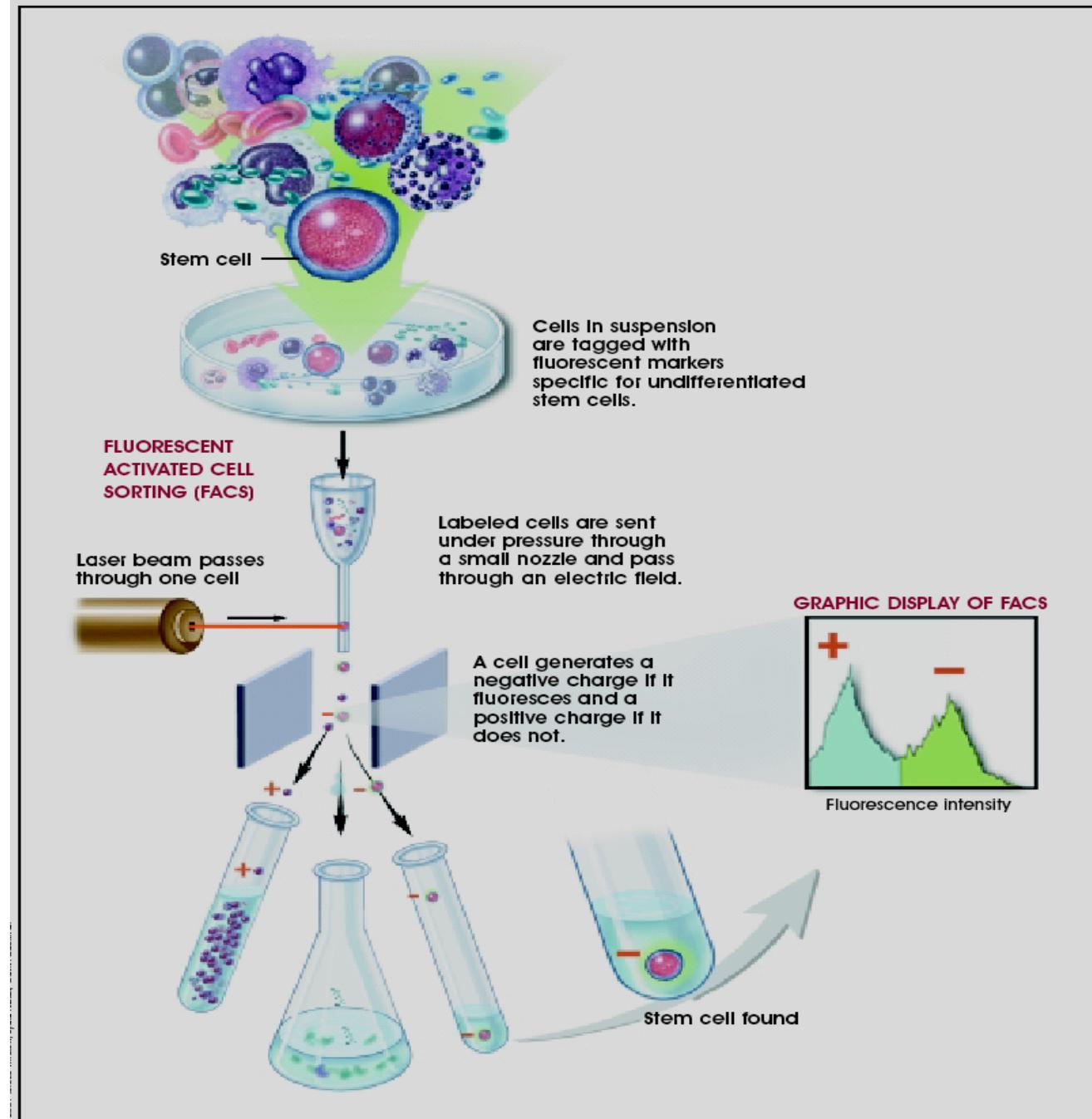


Figure E.I.2. Looking for a Needle in a Haystack: How Researchers Find Stem Cells.

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:

Bisher ist unklar,
ob eine einzelne
Zelle die
beobachtete
Plastizität hat
oder ob
verschiedene
Zellen die
verschiedenen
Differenzierungs-
wege
ermöglichen

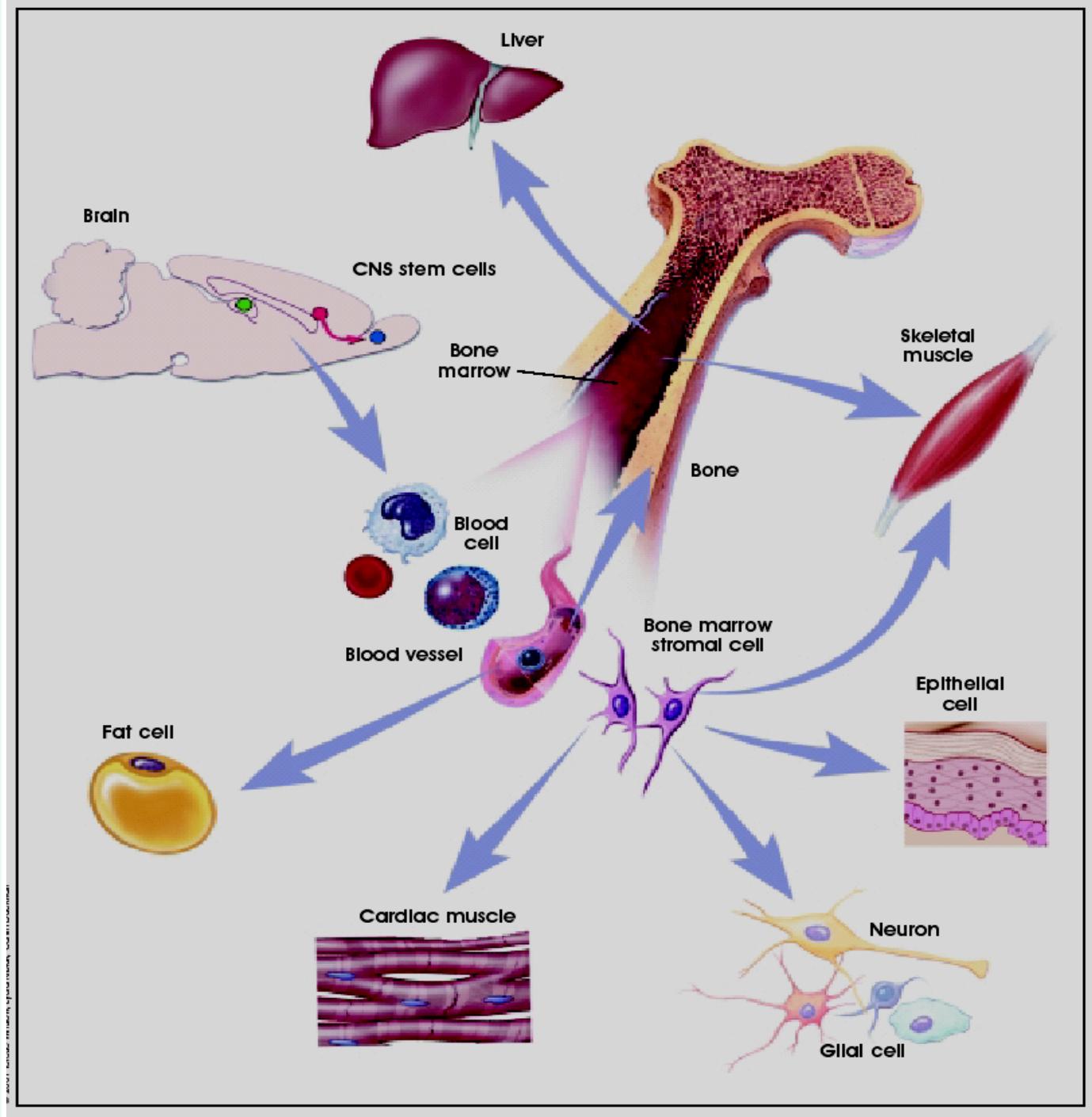


Figure 4.2. Preliminary Evidence of Plasticity Among Nonhuman Adult Stem Cells.

Was könnten adulte Stammzellen schon heute leisten?

schon seit über 40 Jahren werden Knochenmarks-transplantationen 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

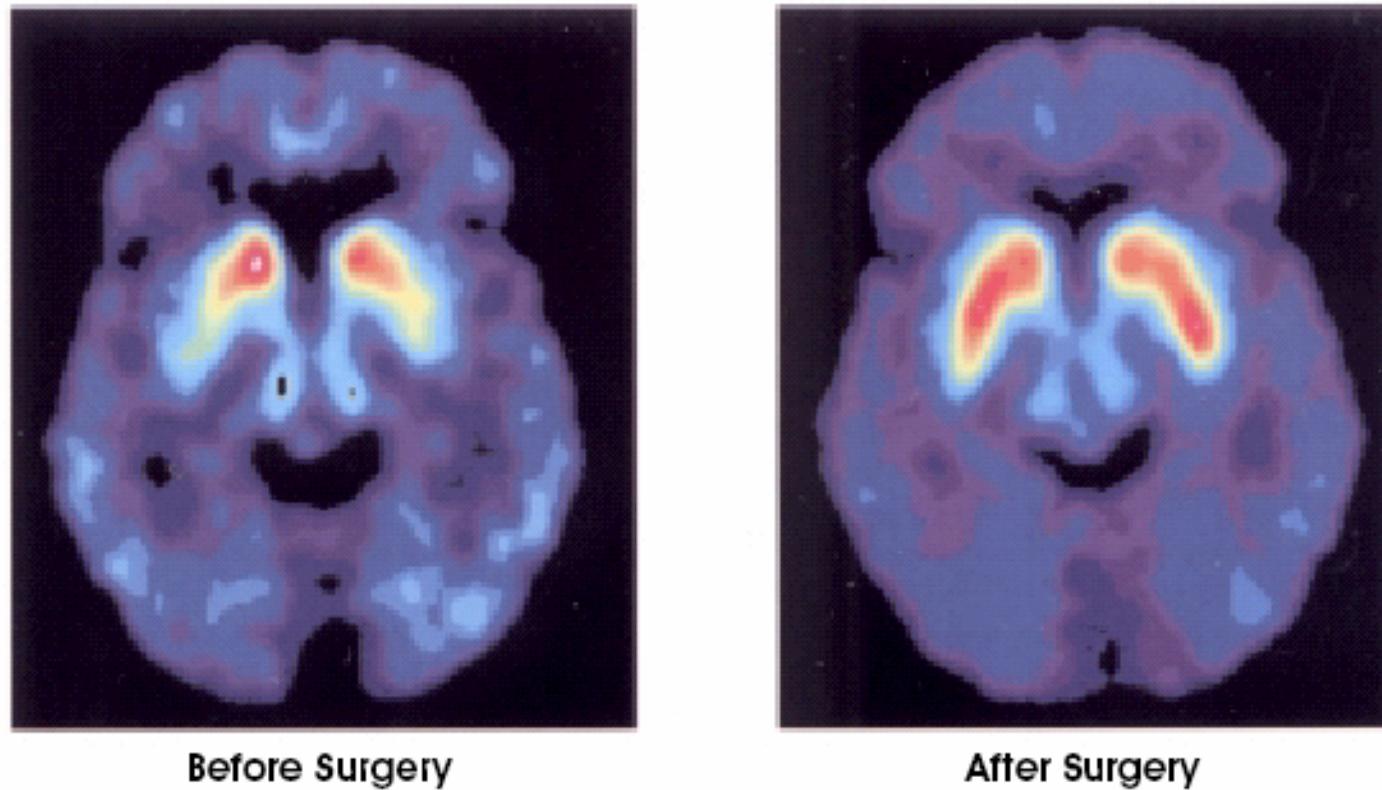


Figure 8.3. Positron Emission Tomography (PET) images from a Parkinson's patient before and after fetal tissue transplantation. The image taken before surgery (left) shows uptake of a radioactive form of dopamine (red) only in the caudate nucleus, indicating that dopamine neurons have degenerated. Twelve 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)

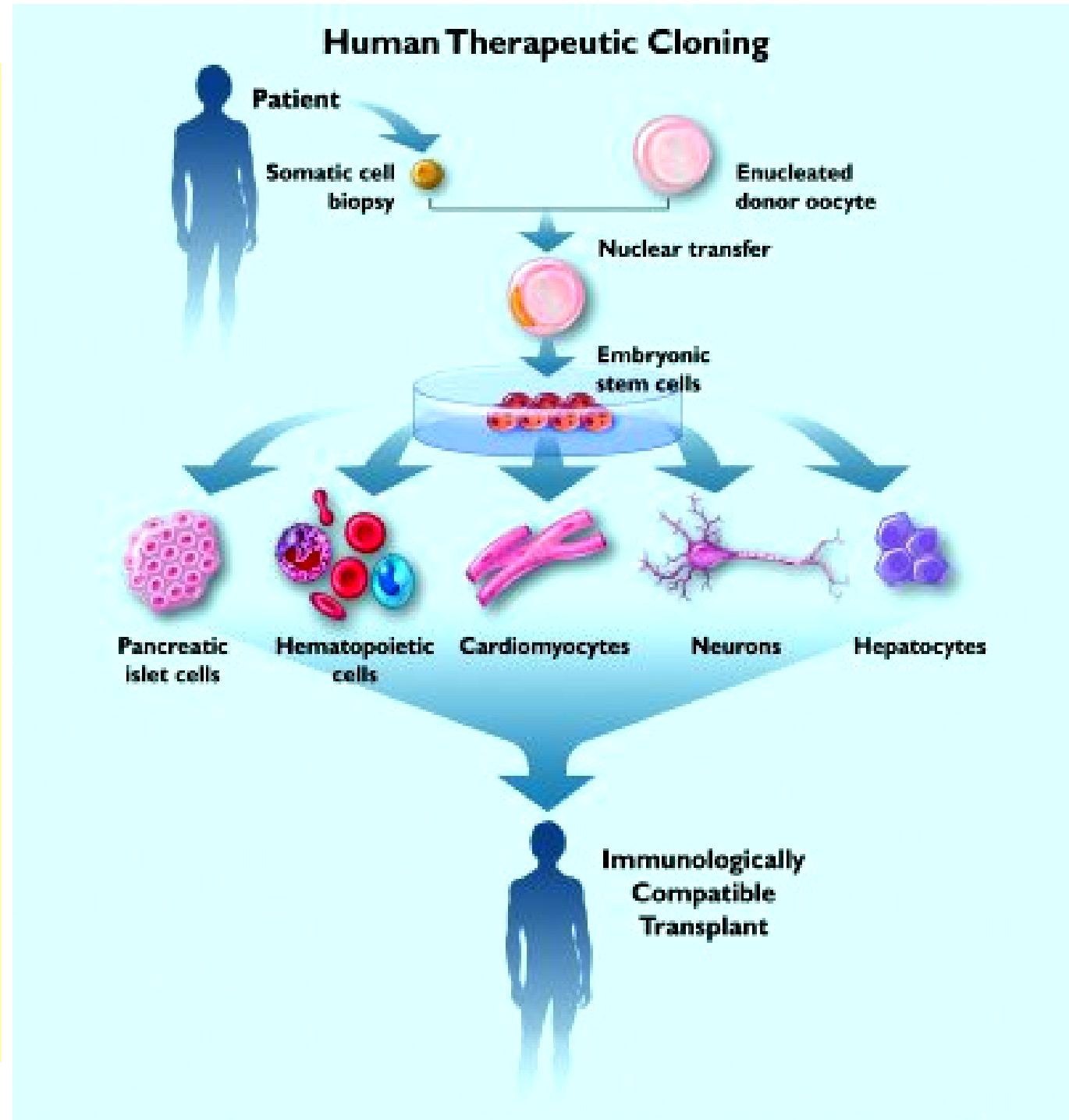
Nachteile fetaler (EG-Zellen) gegenüber ES-Zellen?

- 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?



Dolly

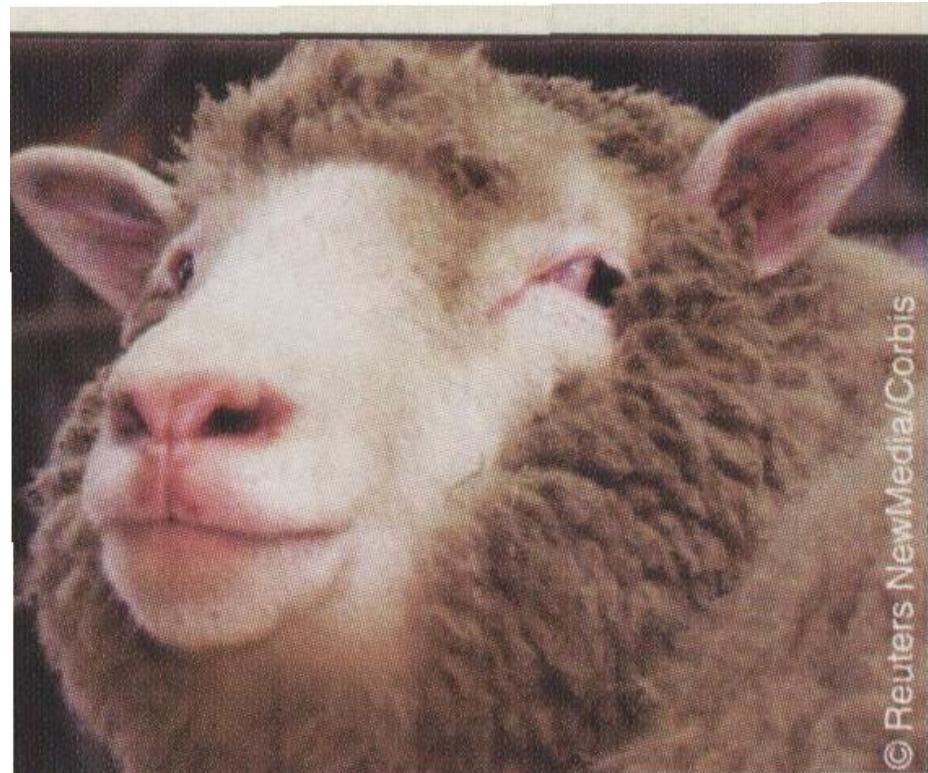
Dolly with her first newborn, Bonnie



- 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 ¹ |
|---------------|----------------------------|------------------------------------|
| 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% |

¹Cloning 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

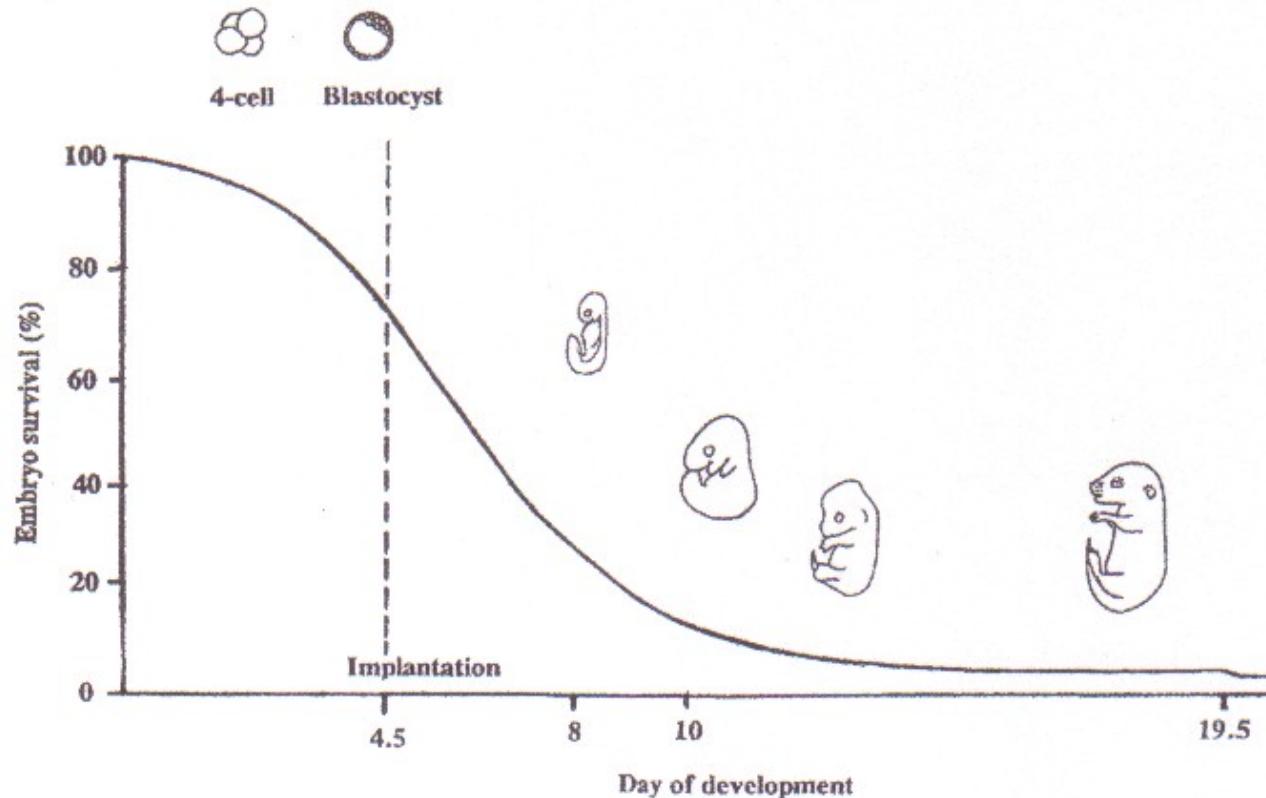


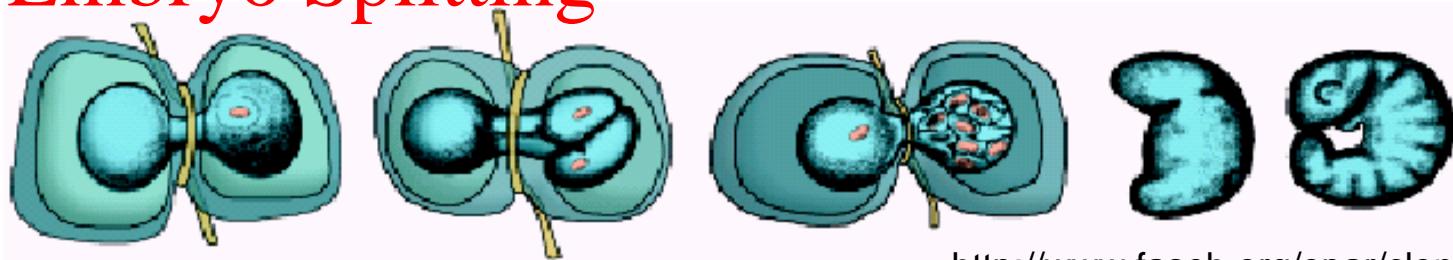
Fig. 1. Development and survival cloned mouse embryos.

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

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

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

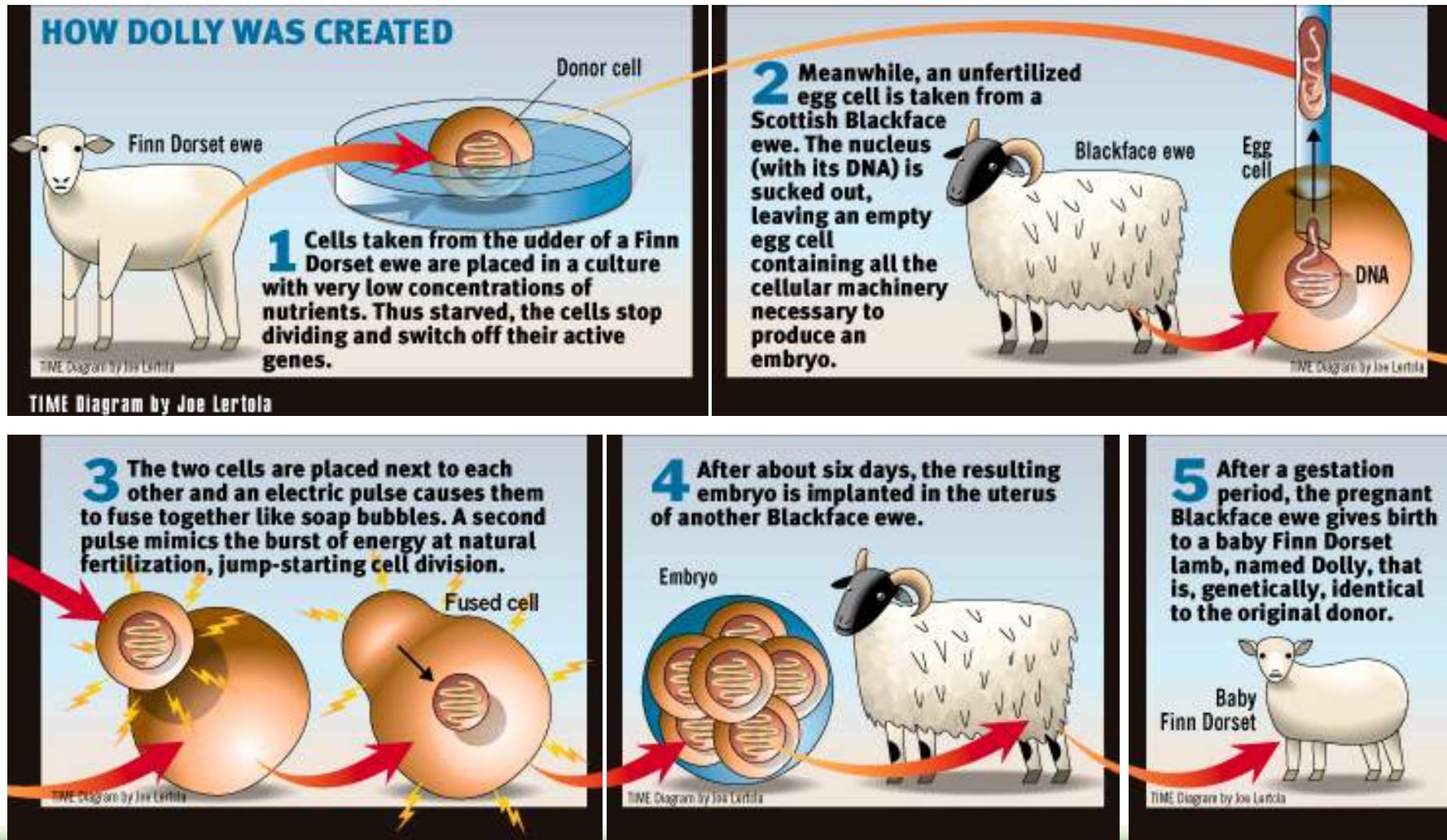
Parthenogenesis

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

Nuclear transplantation

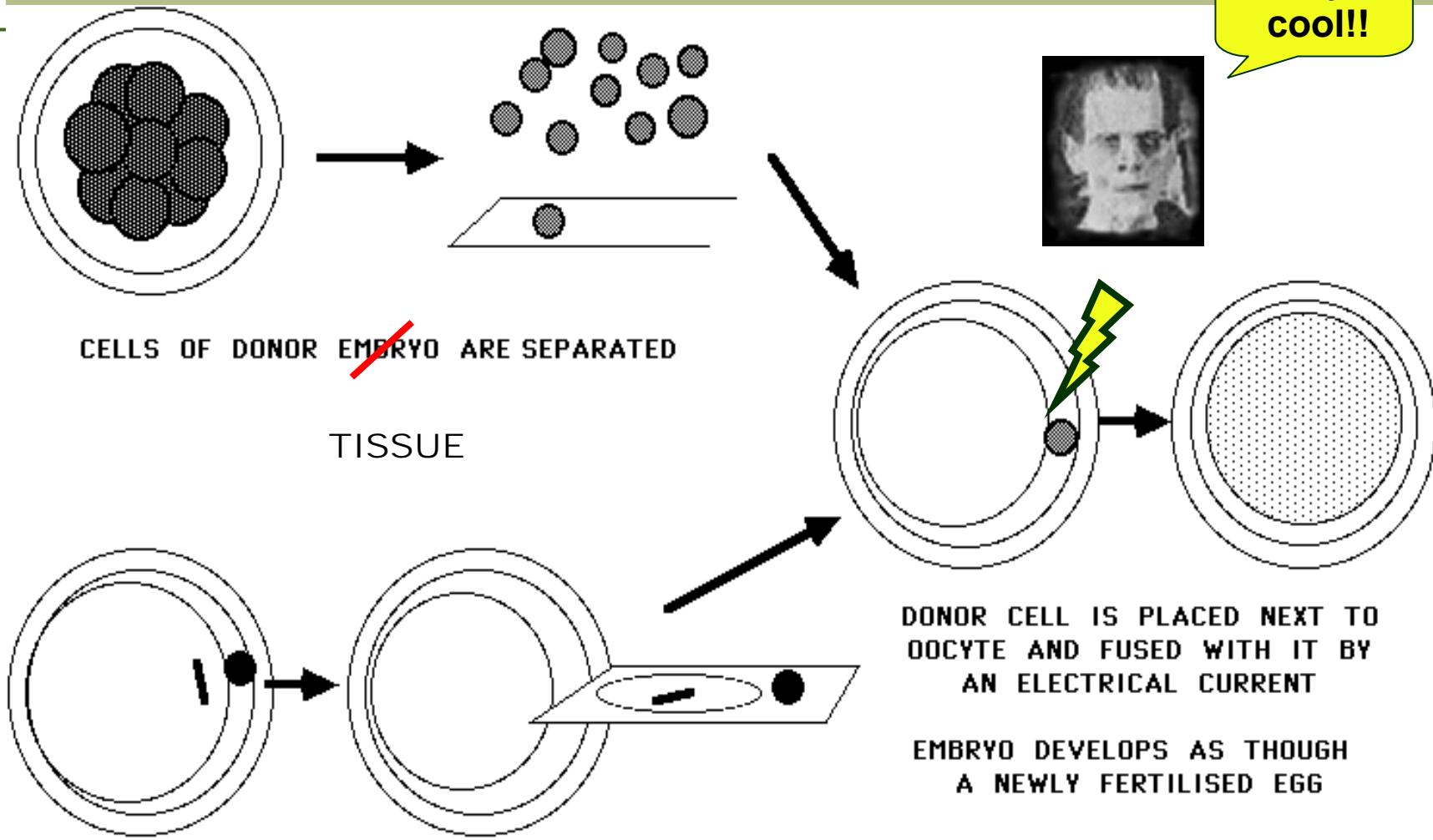
- main technique in current cloning experiments

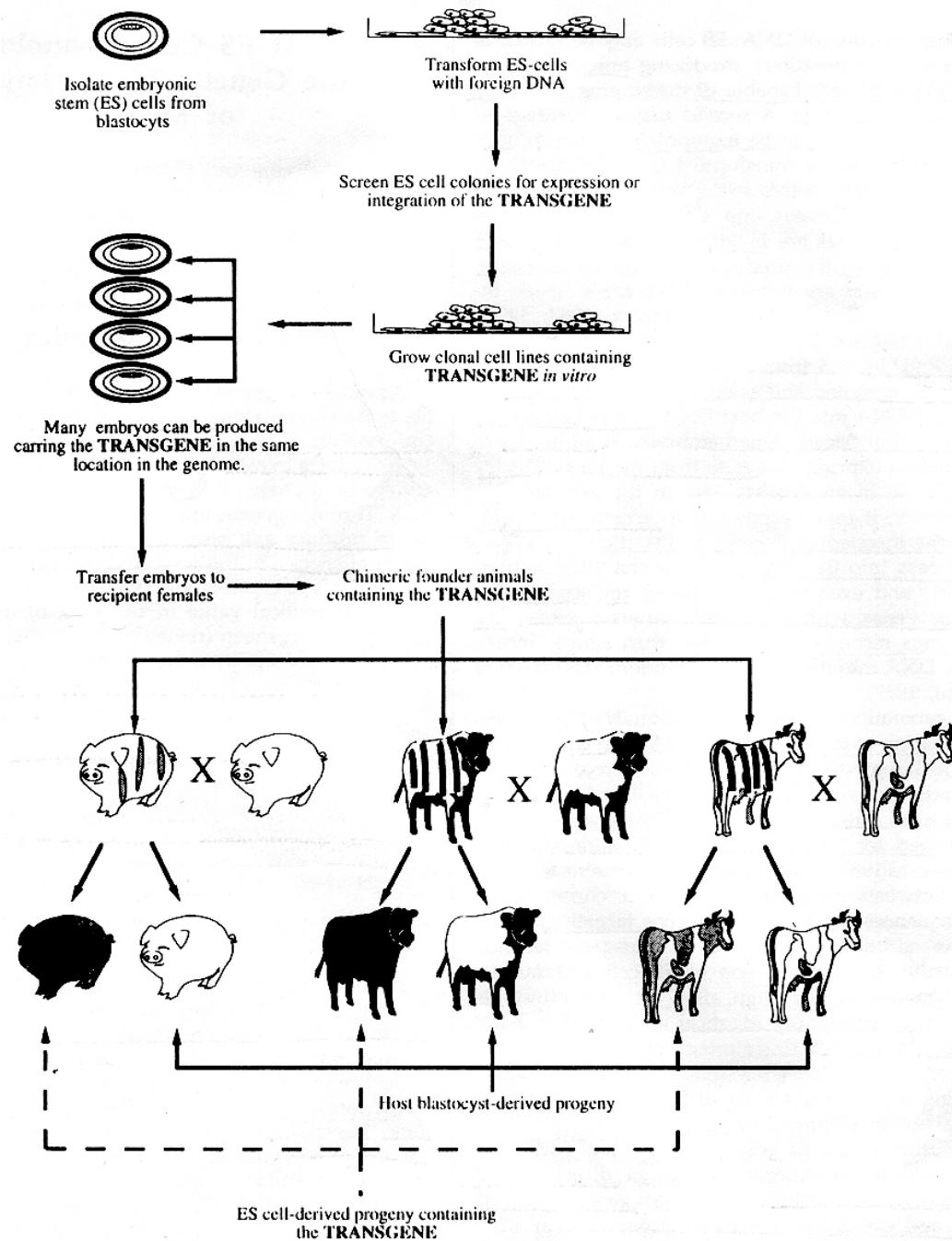
Verfahren zur Klonierung von Säugetieren



Nuclear Transfer Procedure

Way cool!!





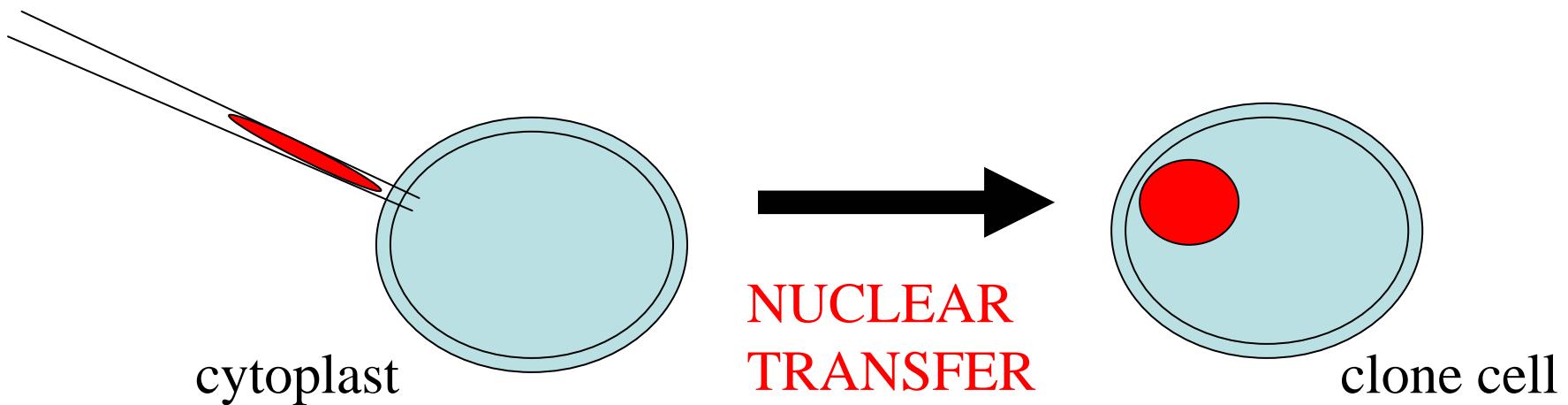
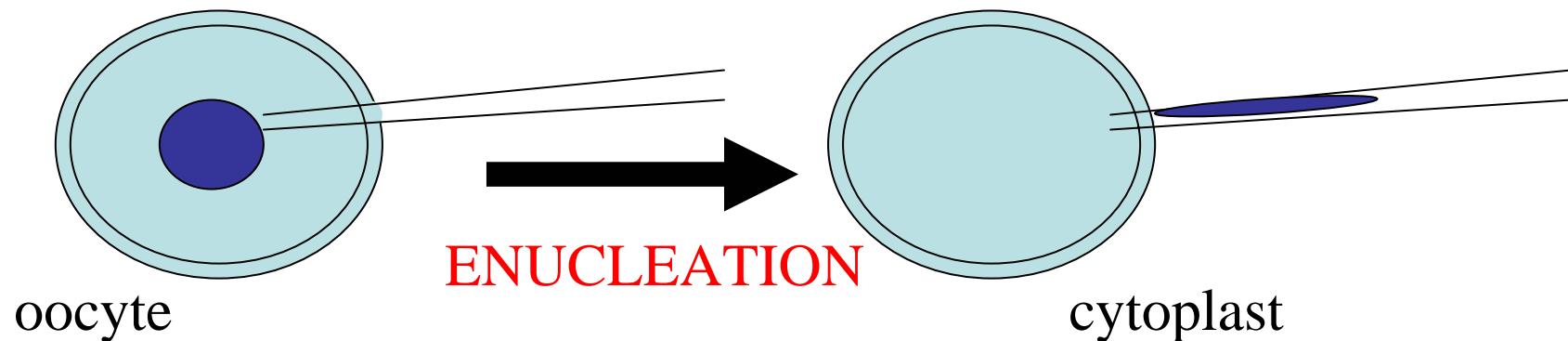
Kern - Transplantation

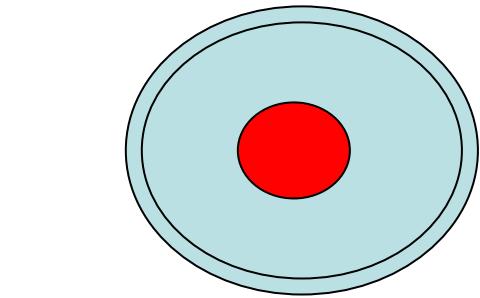
— Enucleation of donor cell

— 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

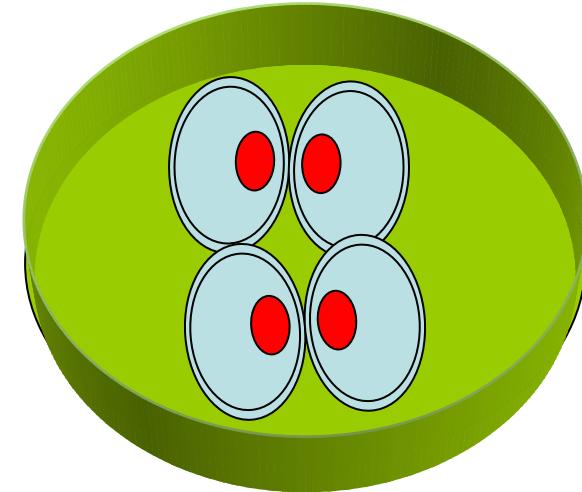




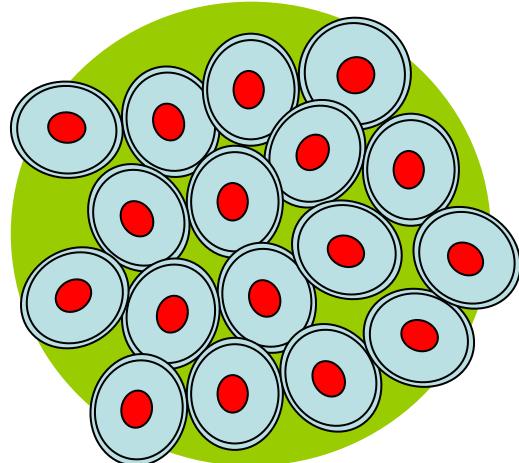
genetic
reprogramming



Induktion der
Embryo-
Entwicklung



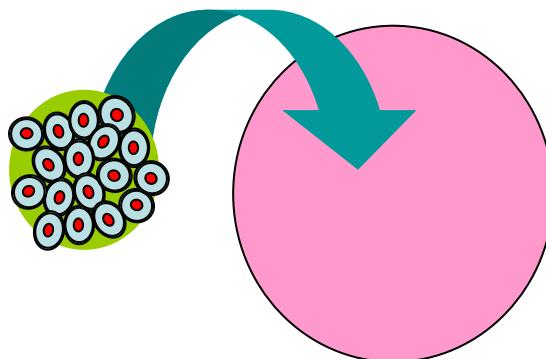
developing embryo in culture



embryo



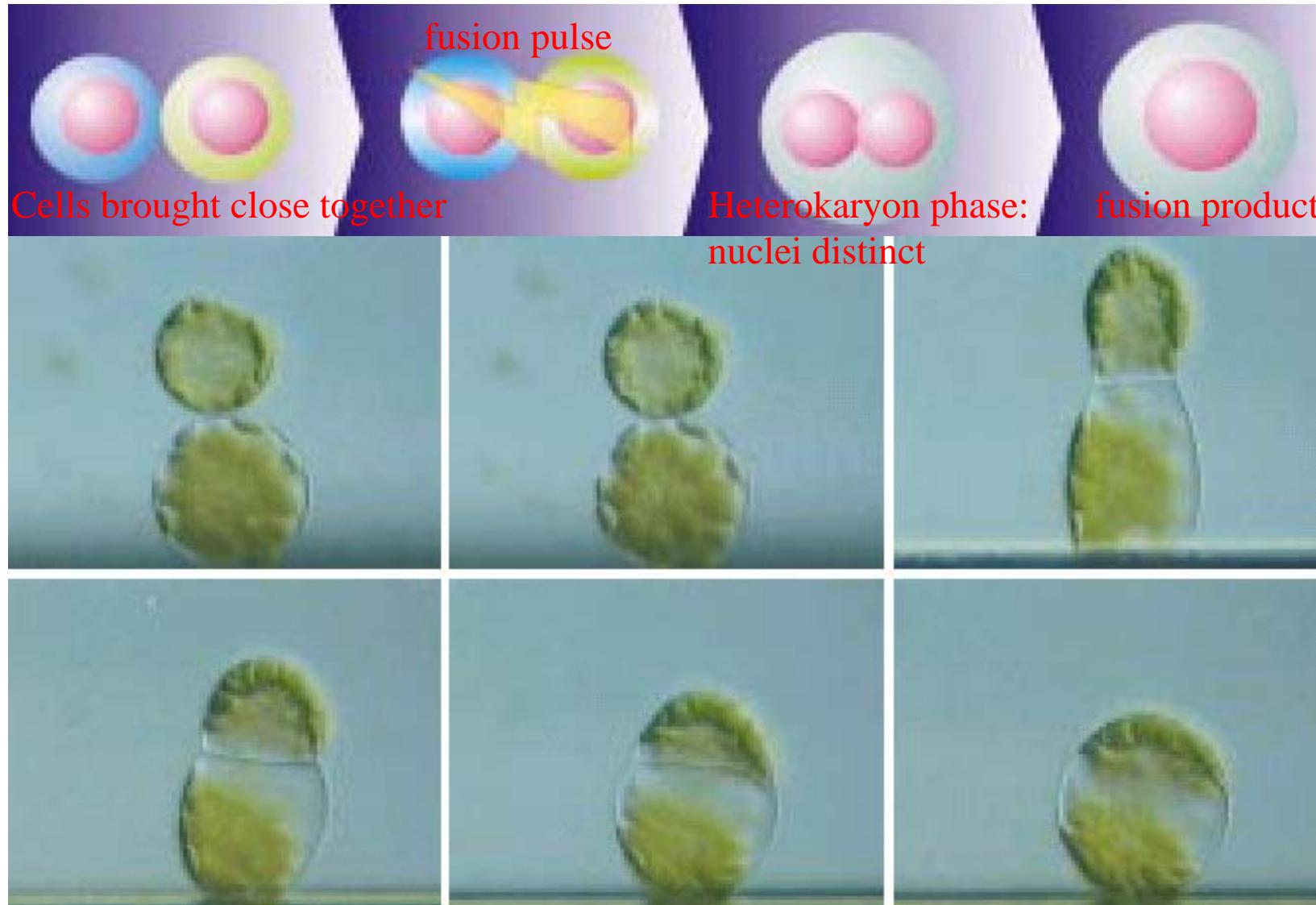
Implantation



uterus of
surrogate mother

Electrofusion

http://www.brinkmann.com/pdf/cell_fusion.pdf



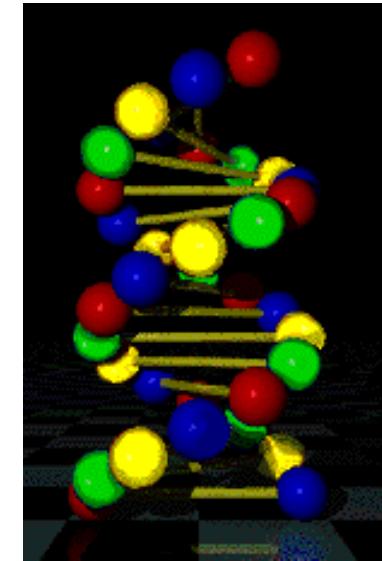
Fusion induced by electric pulse

Enucleation of donor cell

Nuclear Transfer

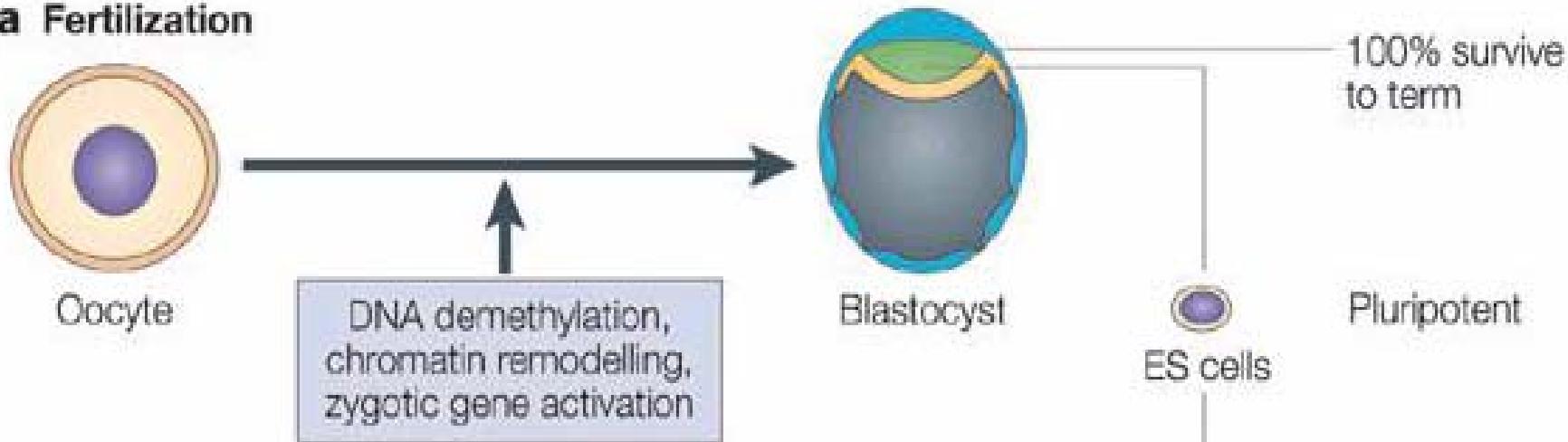
Genetic Reprogramming

- “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

a Fertilization



b Nuclear cloning

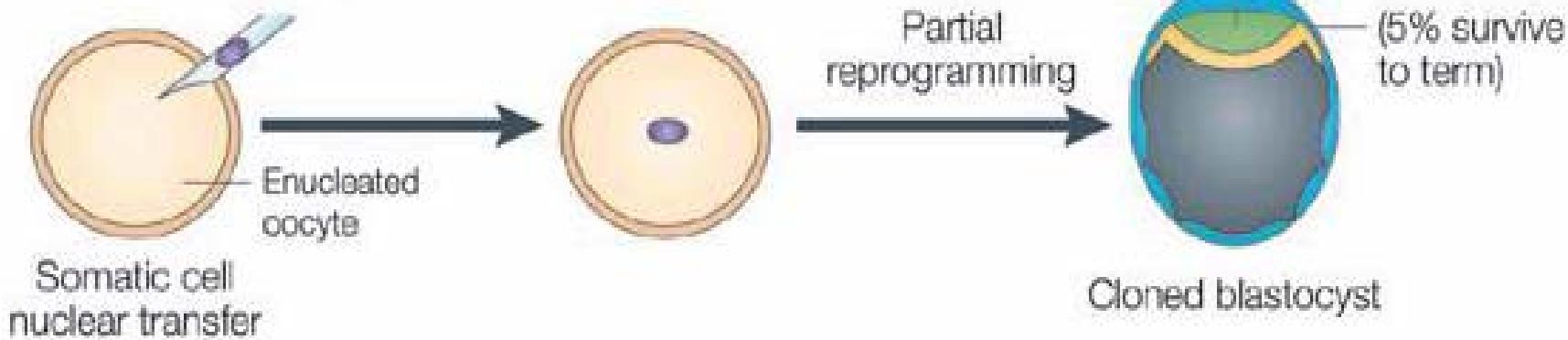
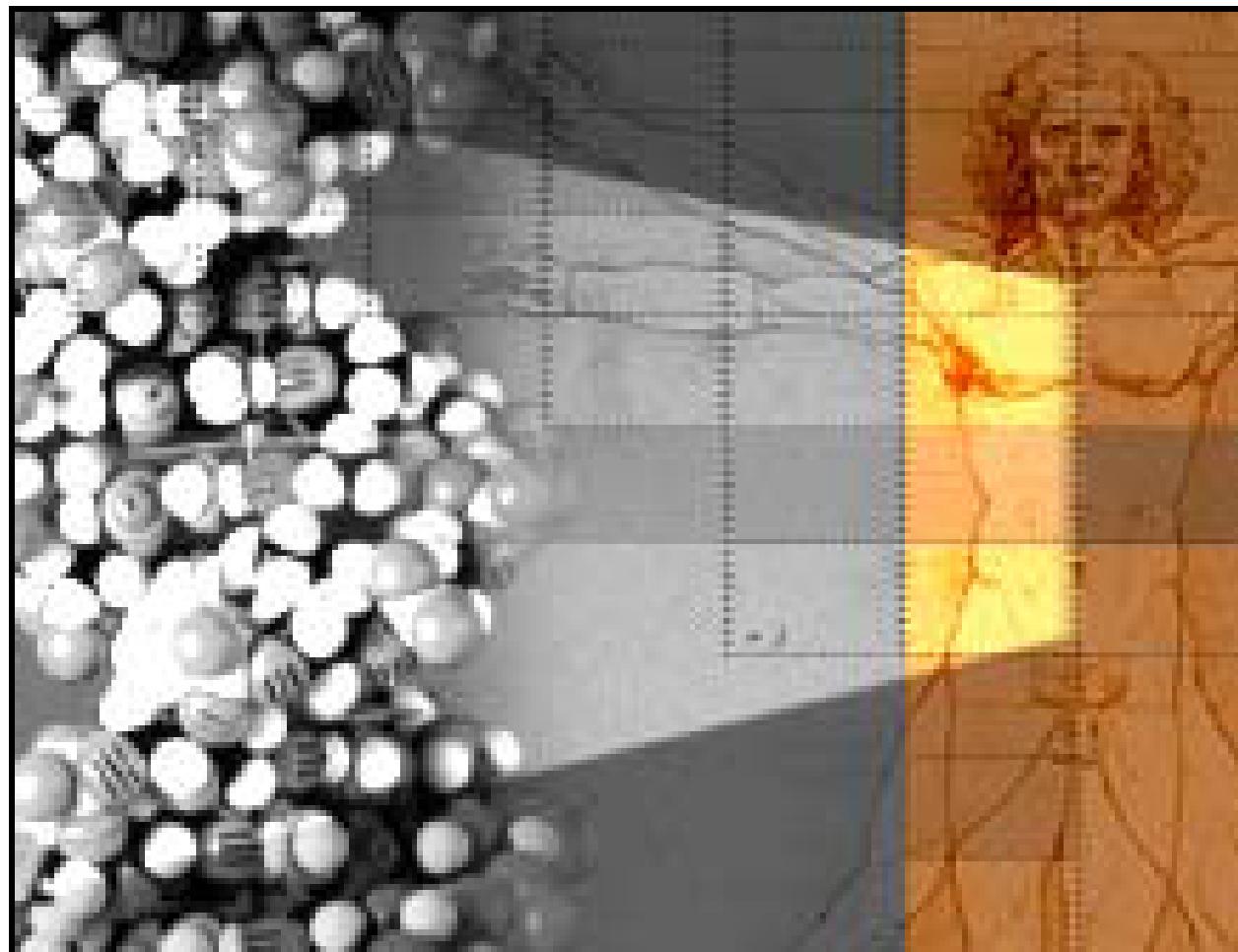


Fig. 5 from *Nature Reviews Genetics* 3: 671

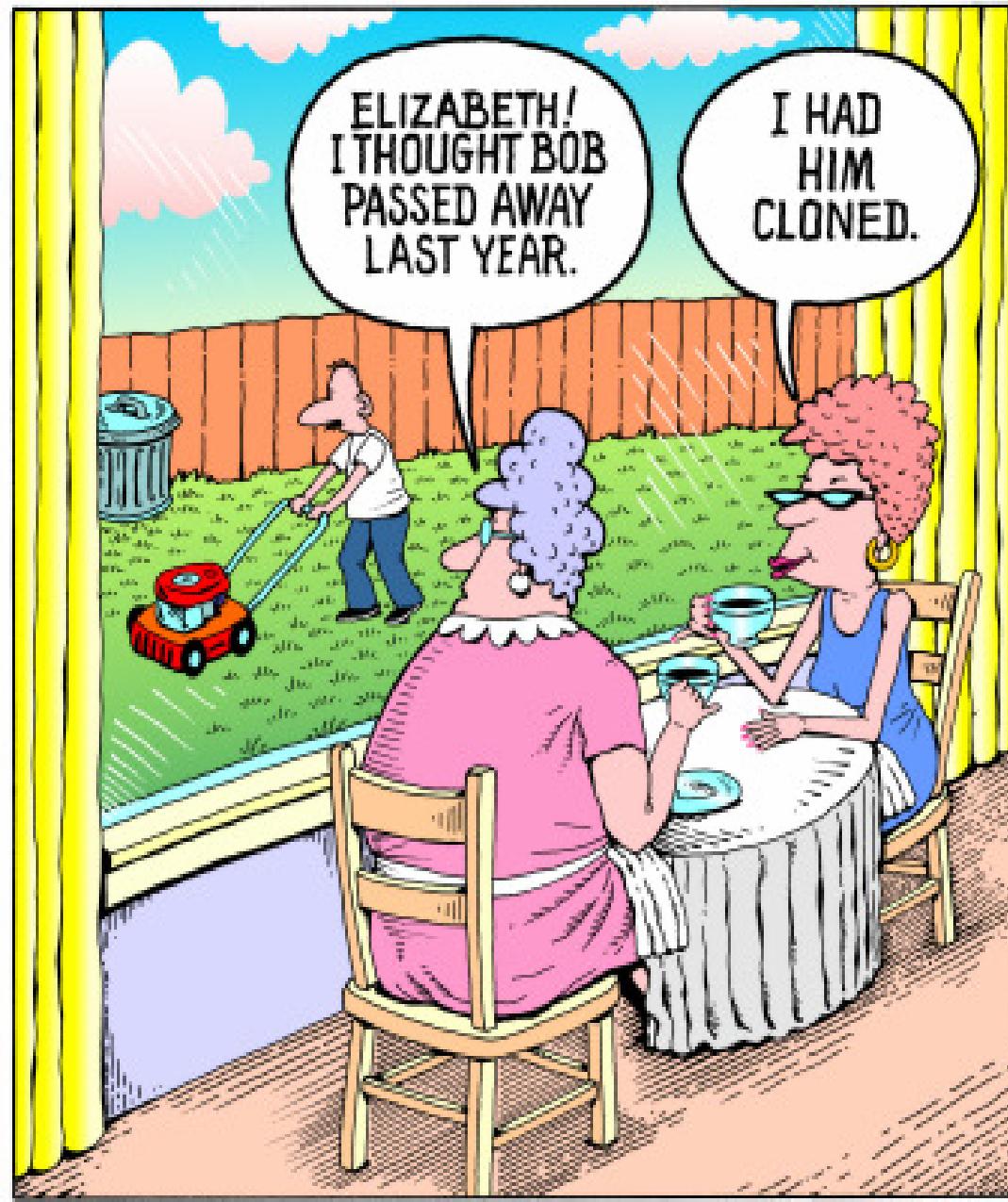
Cloning Humans



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

Klonierung von Menschen? therapeutisch oder reproduktiv?







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 .

