

Modul 3

Reprogrammieren von Zellen: die Zell-Uhr wieder auf Null stellen

Ist die Entwicklung von Zellen eine Einbahnstrasse?

Seit Jahrhunderten fragen sich Biologen: Wie kann aus einer einzigen, befruchteten Eizelle ein Mensch entstehen, ein unglaublich komplexer Organismus bestehend aus hunderten, verschiedenen Zelltypen? Bis Ende des 19. Jahrhunderts waren die Biologen überzeugt, dass die Entwicklung von einem Embryo zu einem erwachsenen Organismus ein eindirektionaler Prozess ist, und dass dieser Prozess unumkehrbar ist, eine Einbahnstrasse. Die Biologen waren sicher, dass die Entwicklung von einer Stammzelle zu einer spezialisierten Zelle (dieser Prozess heisst Differenzierung), wie zum Beispiel einer Hautzelle, nicht rückgängig gemacht werden kann.

Ende des 19. Jahrhunderts gab es zwei unterschiedliche Hypothesen zur Entwicklung von Zellen. Die erste Hypothese schlug vor, dass sich Zellen durch selektiven Verlust von genetischem Material differenzieren. Wenn wir die Information der DNA mit einem Kochbuch vergleichen würden, dann könnte man diese Hypothese folgendermassen umschreiben: Wird aus einer Stammzelle eine Hautzelle, werden aus dem Kochbuch bestimmte Seiten herausgerissen. Die Hautzelle verfügt dann nur noch über die Rezepte, die sie braucht, um eine Hautzelle zu sein. Die restlichen Rezepte fehlen.

Die zweite Hypothese besagte, dass sich bei der Differenzierung von Zellen nur das Expressionsmuster der DNA ändert, und dass dabei kein genetisches Material verloren geht. Das würde bedeuten, dass die Hautzelle zwar noch immer über ein komplettes Kochbuch verfügt, dass aber bestimmte Seiten abgedeckt sind und diese Zelle nicht mehr in der Lage ist, diese Rezepte zu lesen und nachzukochen. Nur noch die Gene, die der Hautzelle ihre Identität geben, werden abgelesen und übersetzt.

Die Überprüfung der Hypothesen mittels Zellkern-Transfer

Aber welche These stimmt? Eine Möglichkeit, um das herauszufinden, ist ein sogenannter Zellkern-Transfer: Bei diesem Experiment entfernt ein Forscher mit mikroskopisch kleinen Röhrchen den Zellkern einer differenzierten Zelle (z. B. einer Hautzelle) und injiziert diesen in den Zellkern einer Eizelle, deren Zellkern zuvor entnommen wurde. Somit steckt der Zellkern einer Hautzelle im Zellplasma einer Eizelle (Abb. 1). Wenn sich diese manipulierte Eizelle danach zu einem Embryo entwickelt, dann würde dies belegen, dass die zweite Hypothese stimmt. Denn wenn genetisches Material in der differenzierten Hautzelle verloren gegangen wäre (Kochbuch mit herausgerissenen Seiten), dann könnte aus dieser manipulierten Zelle kein neuer Organismus entstehen, weil ja die notwendigen Rezepte fehlen.

Organismen, die aus einem Zellkern-Transfer hervorgehen, nennt man «geklont». Geklonte Organismen sind also nicht aus einer geschlechtlichen Fortpflanzung (Verschmelzung von Eizelle mit Spermium) entstanden, sie sind genetisch identisch.

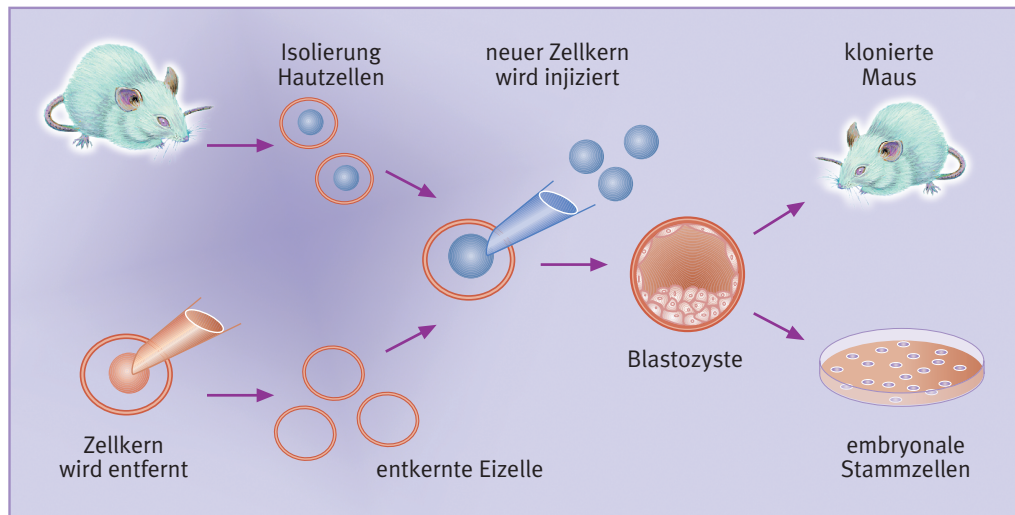
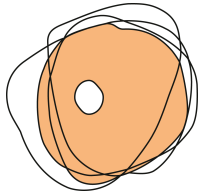


Abbildung 1: Zellkern-Transfer bei Mäusen.

Schematische Darstellung eines Zellkern-Transfers. Aus der klonierten Blastozyste können entweder embryonale Stammzellen oder eine lebende, klonierte Maus entstehen (Quelle: Epigenetics, 2006, Cold Spring Harbor Laboratory Press).

Im Jahre 1952 gelangen Robert Briggs und Thomas J. King die ersten erfolgreichen Zellkern-Transfers mit Zellen des Leopardenfroschs (*Rana pipiens*). Die beiden Forscher entnahmen dazu Zellkerne eines Froschembryos (in einem frühen Entwicklungsstadium; die Zellen sind noch pluripotent) und implantierten die Kerne in das Zellplasma einer Eizelle. Aus solchen Eizellen entstanden klonierte Kaulquappen. Nahmen sie jedoch Zellkerne aus stärker differenzierten Zellen, zum Beispiel von Darmzellen, und implantierten diese in die Eizelle, so entstanden daraus keine Kaulquappen. Briggs und King folgerten aus diesem Resultat, dass während der Zelldifferenzierung genetisches Material verloren geht, Seiten also aus dem Kochbuch herausgerissen werden und demnach, dass die erste Hypothese korrekt ist.

Einige Jahre später wiederholte ein junger, britischer Entwicklungsbiologe namens John B. Gurdon diese Experimente. Anstelle von *Rana pipiens* forschte er jedoch mit Krallenfröschen (*Xenopus laevis*). Im Jahre 1962 benutzte Gurdon Zellkerne aus Kaulquappen-Darmzellen (also differenzierte Zellkerne) und implantierte sie in Eizellen. Und tatsächlich entwickelten sich diese manipulierten Eizellen zu erwachsenen Fröschen (Abb. 2). Dadurch konnte Gurdon zeigen, dass während der Zelldifferenzierung keine genetische Information verloren geht, sondern dass lediglich das Expressionsmuster der Gene in differenzierten Zellen anders ist als in pluripotenten Stammzellen.

Gurdon widerlegte damit die erste Hypothese – und erhielt 50 Jahre später für diese Entdeckung den Nobelpreis für Medizin. In vielen weiteren Experimenten bestätigte sich über die Jahre die Tatsache, dass während der Zelldifferenzierung kein genetisches Material verloren geht (von wenigen Ausnahmen abgesehen). Allerdings nimmt die Erfolgsquote beim Klonieren von Fröschen und anderen Tieren ab, je spezialisierter der Zellkern ist (Abb. 3).

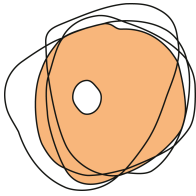


Abbildung 2: Das erste, klonierte, erwachsene Wirbeltier, das durch Zellkern-Transfer entstanden ist. Dieser *Xenopus* Frosch entstand durch die Transplantation eines Zellkerns von einer Vorläuferzelle des Nervensystems in eine Eizelle (Gurdon et al., 1958).

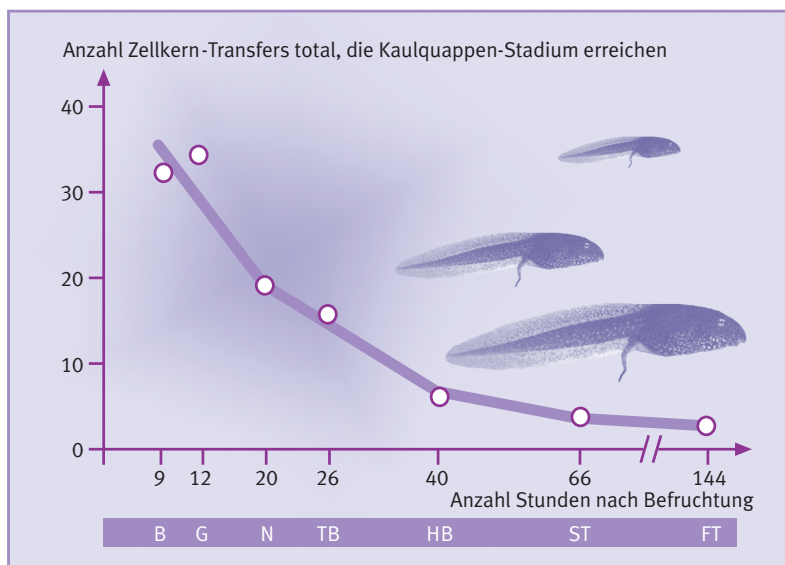
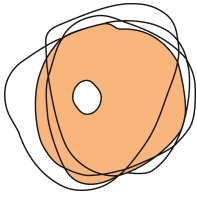


Abbildung 3: Überlebensrate von *Xenopus* Fröschen nach Zellkern-Transfer. Die Abbildung zeigt, dass sich nur eine bestimmte Anzahl an klonierten Froschembryos zu Kaulquappen entwickelt. Je differenzierter die Zellkerne sind, die man dazu gebraucht, umso kleiner ist die Erfolgsquote. Abkürzungen: (B) Blastula, (G) Gastrula, (N) Neurula; (TB) Tail bud; (HB) heart beat, (ST) swimming tadpole, (FT) feeding tadpole. (Quelle: Epigenetics, 2006, Cold Spring Harbor Laboratory Press.)

Es dauerte über 30 Jahre bis Gurdons Experiment in Säugetieren erfolgreich wiederholt werden konnte. Warum so lange? Ein Grund dafür war, dass die Eizellen von Säugetieren viel kleiner sind als jene von Fröschen. Das macht das Experiment technisch viel schwieriger. Zudem befinden sich die Eizellen im Körper der Mutter und nicht ausserhalb, wie bei den Fröschen. Entsprechend sind sie schwerer zugänglich. Im Jahre 1996 aber gelang es den beiden britischen Wissenschaftler Keith Campbell und Ian Wilmut mit derselben Technik ein



Schaf zu klonen, das sie «Dolly» nannten. Sie transferierten dabei Zellkerne von Euterzellen (differenzierte Zellen) eines Schafes in die Eizellen eines anderen Schafes. Doch der Versuch klappte nicht auf Anhieb. Von 227 manipulierten Eizellen entwickelte sich nur eine zu einem lebenden Schaf (Abb. 4).

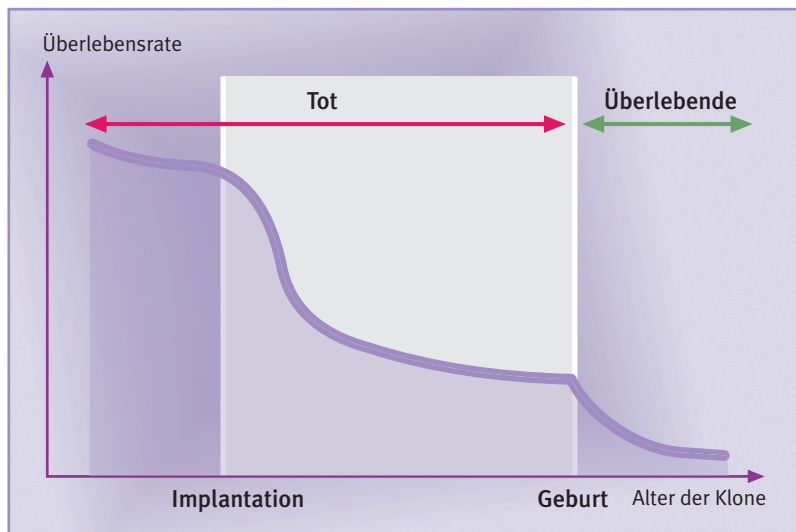
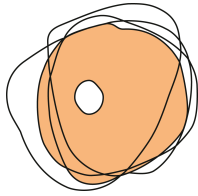


Abbildung 4: Überlebensrate von geklonten Säugetieren. Die Anzahl an klonierten Embryos, die lebend zur Welt kommen ist verglichen mit der Anzahl der gemachten Zellkern-Transfers sehr gering. Diese Graphik zeigt auf, dass ein Zellkern-Transfer sehr ineffizient ist. Die Gründe dafür sind nur ansatzweise bekannt. Ein Grund ist, dass den Zellkernen nur sehr wenig Zeit bleibt, um zu lernen, die «neuen Rezepte der neuen Umgebung zu kochen». Ein anderer Grund ist die technische Schwierigkeit des Zellkern-Transfers. (Quelle: Epigenetics, 2006, Cold Spring Harbor Laboratory Press).

Aus den Resultaten der Frosch- und Schafexperimente folgerte die Wissenschaftler: Je spezialisierter und älter eine Zelle wird, umso weniger ist sie imstande, alle Rezepte aus dem Kochbuch nachzukochen, sondern sie kann mit ansteigendem Alter nur noch spezifische Rezepte nachkochen. Beispiel: Wird aus einer Stammzelle eine Hautzelle, so weist diese Zelle das spezifische Genexpressionsmuster einer Hautzelle auf. Diese differenzierte Genexpression ist jedoch reversibel, wie die Klonierungsexperimente zeigten: Das heisst, die Hautzelle kann unter bestimmten Bedingungen «umprogrammiert» werden, dass sie wieder alle Rezepte kochen kann. Dieser Vorgang heisst Reprogrammierung. Die Uhr der Zelle wird wieder auf Null gestellt.

Wie kann so etwas geschehen? Verantwortlich ist die Umgebung des Zellkerns: Der Hautzellkern, der in das Zellplasma der Eizelle eingeschleust wird, wird durch bestimmte Proteine (zum Beispiel Transkriptionsfaktoren), die in diesem Plasma schwimmen, so verändert, dass er das Genexpressionsmuster einer totipotenten, befruchteten Eizelle übernimmt.



Neben den Zellkern-Transfer-Experimenten, die zeigten, dass die Zell-Uhr wieder auf Null gestellt werden kann, waren zwei weitere Experimente von grosser Bedeutung:

1.) Master-Gene kontrollieren das Schicksal von Zellen

Im Jahre 1987 entdeckte Walter Gehring, Professor am Biozentrum in Basel, einen Transkriptionsfaktor (TF) in der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster*. Ein TF ist ein Protein und dieser neuentdeckte TF hatte eine ganz spezielle Funktion: Er aktiviert und überwacht die Entwicklung der Insektenbeine. Wenn man diesen TF nun gentechnisch in Insektenantennen einbaut, so werden die Insektenantennen zu Insektenbeinen. Aufgrund dieser Fähigkeiten erhielt der TF den Namen «*Antennapedia*» (Abb. 5).

Im gleichen Jahr machten Forscher ein ähnliches Experiment mit dem TF *MyoD*, der hauptsächlich in Muskelzellen vorkommt. Sie bauten *MyoD* mit gentechnischen Methoden in Bindegewebszellen ein und untersuchten anschliessend die Auswirkungen. Tatsächlich veränderten sich durch die Präsenz von *MyoD* die Bindegewebszellen zu Muskelzellen.

Damit konnten Forscher zeigen, dass der TF *MyoD*, der hauptsächlich in Muskelzellen vorkommt, bei künstlicher Expression in Bindegewebszellen, dieses Bindegewebe zu Muskelgewebe werden lässt (vergleiche Modul 1-2, Seite 5).

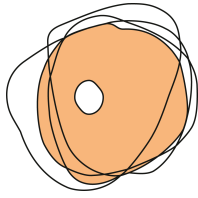
Aufgrund dieser beiden Resultate entstand das Konzept der «Masterregulatoren». Das sind Proteine, die das Differenzierungsschicksal einer Zelle bestimmen können. Sie können entscheiden, ob aus einer Stammzelle eine Haut- oder eine Leberzelle entsteht. Sie entscheiden darüber, welche Rezepte die Zelle noch kochen kann und welche nicht mehr.



Abbildung 5: Kopf einer normalen Fliege *Drosophila melanogaster* (links) verglichen mit einer sogenannten *Antennapedia* Mutante (rechts). Man erkennt deutlich, dass der rechten Fliege in ihrem Gesicht Beine anstelle von Antennen gewachsen sind. (Quelle: <http://www.gehring.biozentrum.unibas.ch/index.html> 14.03.2013)

2.) Stammzellen ausserhalb des Körpers am Leben erhalten

Die allermeisten Zellen in einem Organismus sind keine Stammzellen. Wenn ein Forscher im Labor mit Stammzellen arbeiten möchte, dann besteht die erste Hürde darin, überhaupt an Stammzellen zu gelangen und sicherzustellen, dass es sich tatsächlich um Stammzellen handelt. Die zweite Hürde besteht darin, dass die entnommenen Stammzellen in der Petrischale nicht absterben und sich nicht differenzieren. In jahrzehntelanger Arbeit wurden solche Kulturen entwickelt und verbessert, sodass Experimente mit Stammzellen ausserhalb des Körpers heute möglich sind (Abb. 6). So gelang es dem Wissenschaftler James Thomson



im Jahre 1998 zum ersten Mal, menschliche Stammzellen ausserhalb des Körpers zu kultivieren.

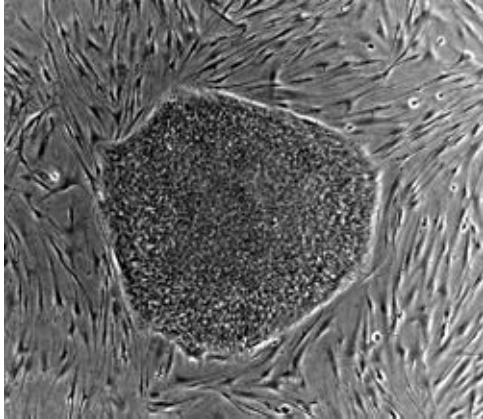


Abbildung 6: Menschliche Stammzellenkolonie, die auf Bindegewebe von Mäusen ausserhalb des Organismus in einem 37 Grad Celsius warmen Wärmeschrank wächst. Man erkennt die runde Form der Stammzellenkolonie (ein typisches Merkmal von Stammzellenkolonien). Eine solche Kolonie besteht aus mehreren tausend Stammzellen. Ursprünglich bestand diese Kolonie aus nur einer Stammzelle. Diese Stammzelle hat sich dann unzählige Male geteilt, die Kolonie wuchs.

Die Zellen um die Stammzellenkolonie herum zeigen eine ganz andere Struktur als Stammzellen. Sie haben eine längliche Form. Das sind die Bindegewebszellen. Durch etliche Experimente hat sich gezeigt, dass Stammzellen am besten auf solchen Bindegewebszellen wachsen.

(Quelle: http://en.wikipedia.org/wiki/Stem_cell)

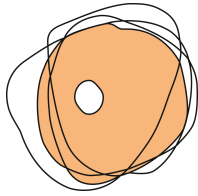
Wissen nutzen, um Krankheiten zu behandeln

Heute geht es darum, all dieses Wissen zu nutzen, um Krankheiten zu behandeln. Die ursprüngliche Idee bestand darin, von einem erkrankten Menschen (z. B. einem Patienten mit einer Herzkrankheit) den Zellkern einer Hautzelle zu entnehmen und diesen dann in eine menschliche Eizelle zu überführen. Aus der daraus entstehenden Blastozyste könnten dann embryonale Stammzellen gewonnen werden, aus denen neue, gesunde Herzzellen entstehen, die eingesetzt werden könnten, um die Herzkrankheit zu behandeln. Dies wäre eine sogenannte personalisierte Stammzellentherapie (vgl. Abb. 1).

Dieser Ansatz ist jedoch technisch sehr aufwendig und ethisch sehr umstritten. Schliesslich benötigt man zur Gewinnung der embryonalen Stammzellen zuerst Eizellen sowie klonierte, menschliche Embryonen. Daher hat die Forschung nach Alternativen gesucht.

Sind iPS Zellen (induzierte pluripotente Stammzellen) der erhoffte Durchbruch?

Im Jahr 2006 revolutionierte ein japanischer Forscher namens Shinya Yamanaka die Stammzellenforschung. Von den ursprünglichen Klonierungsexperimenten von Gurdon und dem Konzept eines Masterregulators von Gehring inspiriert, untersuchte Yamanaka differenzierte Zellen und verglich deren Genexpressionsmuster mit dem Genexpressionmuster von Stammzellen (er verglich die unterschiedlichen Kochkünste des Kochbuches). Dabei fand er 24 Proteine, die vor allem in Stammzellen produziert werden. Yamanaka entwickelte Bindegewebszellen, in denen diese 24 Proteine künstlich überproduziert wurden. Tatsächlich gelang es mit diesem «Proteincocktail», aus einer



Bindegewebezelle eine pluripotente Stammzelle zu erzeugen. Das bedeutet: Yamanaka fand Mastergene, die Transkriptionsfaktoren produzieren, die differenzierte Zellen zu Stammzellen reprogrammieren können.

Eine differenzierte Zelle kann also in einen Zustand rückprogrammiert werden, der dem einer embryonalen Stammzelle gleicht – und das ohne Zellkern-Transfer!

Es müssen dazu aber die richtigen Proteine in der Umgebung vorhanden sein und in weiteren Schritten versuchte Yamanaka herauszufinden, welche Proteine das sind. Es gelang ihm, die Anzahl Proteine bis auf vier unbedingt notwendige Proteine zu reduzieren: Oct4, Sox2, Klf4 und c-Myc (Abb. 7, 8). Diese neue Spezies von Stammzellen nannte er: induzierte, pluripotente Stammzellen (englisch: induced pluripotent stem cells, iPS).

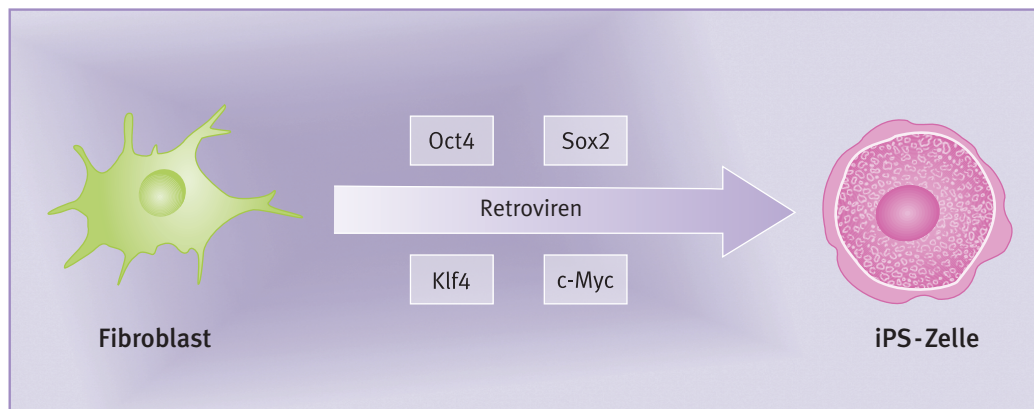


Abbildung 7: Induzierte, pluripotente Stammzellen (iPS-Zellen) kann man durch die Einführung von vier Genen, den Transkriptionsfaktoren Oct4, Sox2, Klf4 and c-Myc, in Fibroblasten (Bindegewebszellen) erhalten. Links ist eine solche Bindegewebszelle dargestellt. Durch die Einführung der vier Faktoren wird die Bindegewebszelle zu einer iPS-Zelle reprogrammiert. (Quelle: S. Yamanaka, 2009, Nature).

Es ist nicht erstaunlich, dass unter diesen vier Proteinen Oct4 und Sox2 sind, da es sich dabei um bekannte Proteine handelt, die für die Selbsterhaltung der Stammzellidentität notwendig sind. Die anderen beiden Faktoren jedoch überraschen, da es sich bei ihnen um sogenannte Onkogene handelt, also Gene, deren Proteine in verschiedenen Krebsarten in unnatürlich hohen Konzentrationen vorkommen, und die daher womöglich für die Krebserkrankung verantwortlich sind. Später stellte sich jedoch heraus, dass die Überexpression dieser beiden Onkogene nicht direkt für die Reprogrammierung notwendig sind. Vielmehr helfen sie, die Reprogrammierung effizienter zu vollführen.

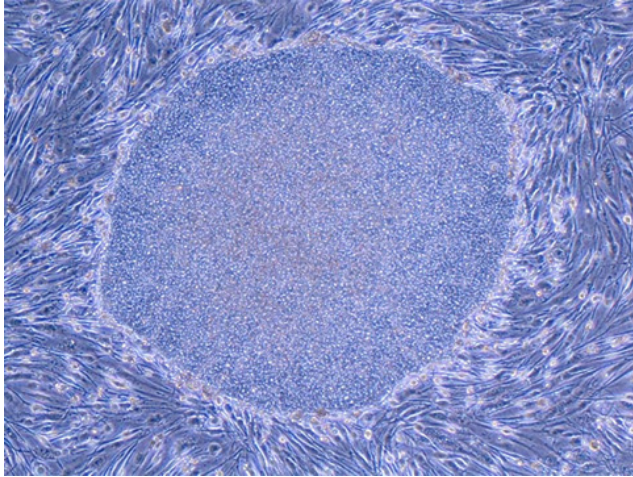
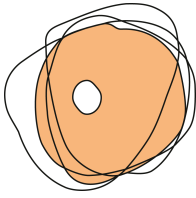


Abbildung 8: iPS-Zellkolonie, hergestellt von menschlichem Hautbindegewebe durch die Einführung der vier Transkriptionsfaktor Gene (Oct4, Sox2, Klf4 and c-Myc). Wie herkömmliche Stammzellenkolonien (siehe Abbildung 6) bilden iPS-Zellen runde Kolonien (die Farbe hier ist durch das Mikroskop entstanden). Diese Kolonie ist ursprünglich aus einer einzigen iPS-Zelle entstanden. Durch unzählige Zellteilungen ist sie gewachsen. Ebenso wie die Stammzellen wachsen auch iPS-Zellen am besten auf Bindegewebszellen. (Quelle: S. Yamanaka, 2009, Nature).

Können iPS-Zellen in der Medizin verwendet werden?

Die medizinischen Anwendungsmöglichkeiten der iPS-Zellen sind vielfältig und wecken viele Hoffnungen. Dank der Reprogrammierung von differenzierten Zellen zu iPS-Zellen ist es nun nicht mehr notwendig, via Zellkern-Transfer Embryonen zu generieren. Falls die iPS-Methode auch zur Behandlung von Krankheiten funktioniert, ist es möglich, differenzierte Zellen (z. B. Hautzellen) eines Menschen, der an einer Herzkrankheit leidet, zu entnehmen und die Hautzellen in iPS-Zellen zu verwandeln. Aus diesen iPS-Zellen könnten dann neue Herzzellen entstehen, die die erkrankten Herzzellen des Patienten ersetzen (Abb. 9). Der Vorteil der iPS-Methode: Sie kommt ohne menschliche Eizellen aus, die Zerstörung eines klonierten, menschlichen Embryos ist nicht mehr notwendig.

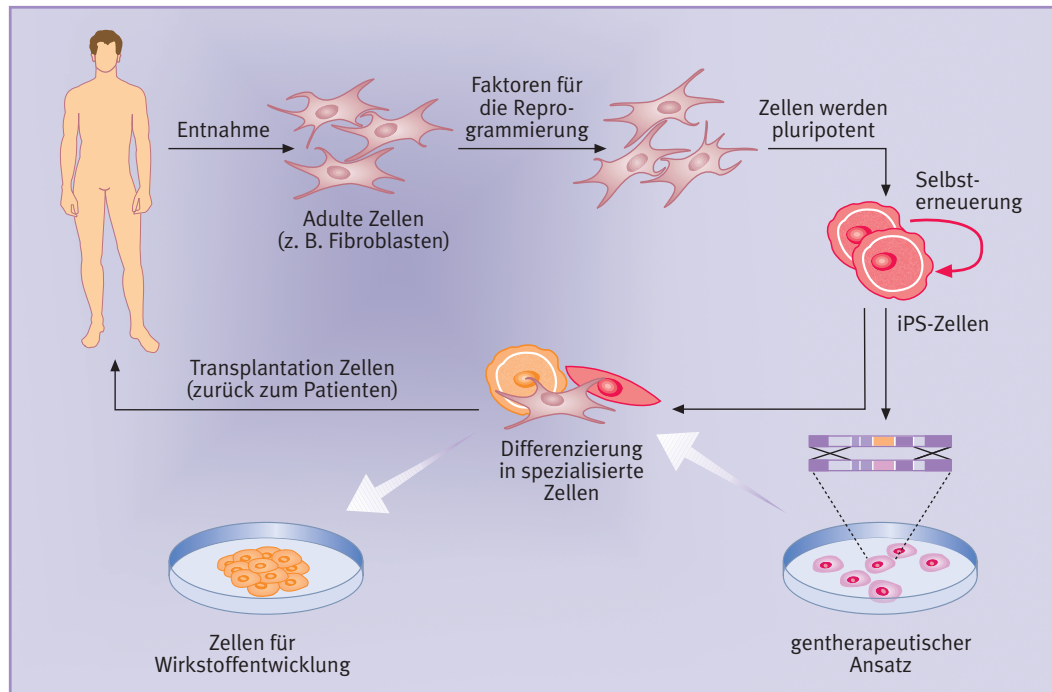
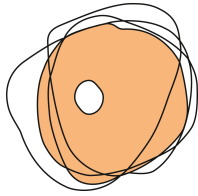


Abbildung 9: Schema einer personalisierten Stammzellentherapie mit iPS-Zellen. Die gewonnenen Zellen des Patienten (oben links in der Graphik), vorzugsweise Hautzellen (Fibroblasten), werden mittels der vier Faktoren zu iPS-Zellen reprogrammiert. Dadurch entstehen patientenspezifische iPS-Zellen. Diese werden in der Petrischale vermehrt. Anschliessend können die Zellen gentechnisch verändert werden (dies wäre zum Beispiel notwendig bei der Behandlung genetischer Krankheiten, wie zum Beispiel bei der Phenylketonurie, wo ein Gen nicht funktionsfähig ist). Die gentechnisch veränderten Zellen werden in den gewünschten Zelltyp differenziert (oder die iPS-Zellen werden direkt differenziert) und für die Behandlung eingesetzt. Die differenzierten Zellen können auch benutzt werden, um neue Medikamente zu testen.

Noch ist jedoch unklar, ob iPS-Zellen erfolgreich medizinisch eingesetzt werden können. Ein Problem stellt zum Beispiel die Verwendung der Onkogene Klf4 und c-Myc dar. Denn die Frage stellt sich: Können iPS-Zellen im Patienten aufgrund der Verwendung dieser Onkogene allenfalls Krebs hervorrufen? Eine abschliessende Antwort darauf gibt es noch nicht, daher haben verschiedene Forschungsgruppen in der jungen Vergangenheit daran gearbeitet, die beiden Onkogene zu ersetzen, da sie ja nicht unbedingt für die Reprogrammierung notwendig sind. Tatsächlich gibt es heute Wege und Möglichkeiten, um iPS-Zellen herzustellen, ohne Onkogene zu verwenden. Eine erste Hürde ist genommen und die nächsten Jahre werden zeigen, ob auch die weiteren Hürden überwunden werden können. Die Vergangenheit hat aber auch jeden Fall gezeigt: Bis zur breiten Anwendung von iPS-Zellen in der Medizin könnten noch Jahrzehnte vergehen.