

Schlussbericht

Zuwendungsempfänger: Institut für Nutztiergenetik, Mariensee, des Friedrich-Loeffler-Instituts, Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit, Höltystr. 10, 31535 Neustadt, Prof. Dr. Heiner Niemann,

Förderkennzeichen: 01 GN 0814

Verbundprojekt: Induced pluripotent stem cells in large animal models (IPSILAM)

Teilprojekt 1: Generation and characterization of porcine induced pluripotent stem cells.

Laufzeit des Vorhabens: 01.03.2009 – 30.07.2012

I. Kurze Darstellung zu

1. Aufgabenstellung

Hauptziel dieses Teilprojekts war die Entwicklung und Charakterisierung von induzierten pluripotenten Stammzellen (iPS-Zellen) von Hausschweinen und Miniaturschweinen. Diese sollten die Grundlage für Stammzellen sein, aus denen kardiale und pulmonale Zellen für Transplantationsversuche differenziert werden können. Das Schwein ist ein bedeutendes Versuchstier in der modernen Biomedizin, ist nach Größe und Physiologie ähnlich dem Menschen, und die Tiere können unter hohen hygienischen Bedingungen relativ kostengünstig gehalten werden. Alle Methoden der biotechnischen Steuerung der Reproduktion und der Gewinnung von Eizellen und Embryonen, sowie der Erstellung transgener Tiere über das somatische Klonen waren im antragstellenden Labor vorhanden. Im ersten Schritt sollten Fibroblasten verwendet und mit dem bekannten γ -retroviralen Transduktionsprotokoll unter Verwendung der 4 ursprünglichen Transkriptionsfaktoren (sogen. Yamanaka-Faktoren Oct4, Sox2, Klf4 und cMyc) iPS Zellen abgeleitet und charakterisiert werden. Parallel dazu sollten non-virale, episomale Vektoren zur Reprogrammierung von porzinen Fibroblasten eingesetzt werden. Ein solcher Ansatz würde die genomische Integration vermeiden, und damit im Hinblick auf eine möglich klinische Erprobung wesentliche Sicherheitskriterien erfüllen. Im zweiten Schritt nach der Etablierung gut charakterisierter porziner iPS-Zellen waren dann in Kooperation mit Verbundpartner Projekt 3 (LEBAO, MH Hannover), Differenzierungsstudien vorgesehen, um funktionale Kardiomyozyten und pulmonale Zellen abzuleiten, die später in zelltherapeutischen Versuchen eingesetzt werden sollten.

2. Voraussetzungen, unter denen das Vorhaben durchgeführt wurde.

Das Labor am Institut für Nutztiergenetik in Mariensee verfügt über langjährige Erfahrungen und internationales Ansehen in Forschungsarbeiten bei Nutztieren, insbesondere zum somatischen Klonen von Schweinen und Rindern, zur Embryonalentwicklung in vitro und in vivo, zur Analyse der Genexpression von Embryonen und unterschiedlichen fetalen und adulten Geweben, für Studien epigenetischer Mechanismen in der Embryonalentwicklung, sowie in der Kultivierung von primären und permanenten Zellen und Zelllinien. Es stehen vollständig eingerichtete Laboratorien für molekularbiologische Arbeiten, Zellkulturen, Embryonenkulturen und für die Mikromanipulation von Embryonen zur Verfügung. Eine spezifisch pathogenfreie (SPF) Schweineanlage gehört zum Institut in Mariensee. Eine weitere wichtige Voraussetzung war die Verfügbarkeit von Oct4/GFP transgenen Schweinen, als einem weltweit einmaligen Großtiermodell für Reprogrammierungsstudien. In diesen Tieren werden pluripotente Zellen nach Reprogrammierung durch die grüne EGFP-Fluoreszenz,

bedingt durch das Anschalten des Oct4 Promoters, sichtbar gemacht. Damit werden Untersuchungen zur iPS-Ableitung und deren Charakterisierung beim Schwein, also einer Spezies, bei der es bisher keine echten, keimbahngängigen pluripotenten embryonalen Stammzellen gibt, erleichtert.

3. Planung und Ablauf des Vorhabens

| Project/mile stone | Year 1 | Year 2 | Year 3 |
|---|--------|--------|--------|
| WP1 Vector production, primary cultures | | | |
| Isolation and maintenance of primary cells | | | |
| Production of retroviral constructs | | | |
| Construction of episomal vectors | | | |
| WP2 Establishing porcine iPS | | | |
| Transduction of skin fibroblasts | | | |
| Establishment of porcine iPS for transplantation experiments | | | |
| WP3 Characterizing porcine iPS | | | |
| Pluripotency markers | | | |
| Teratoma formation | | | |
| WP4 Differentiation of porcine iPS | | | |
| Spontaneous differentiation | | | |
| Targeted differentiation towards cardiomyocytes and respiratory epithelial cells | | | |
| WP5 Transplanting porcine iPS | | | |
| Myocardial Tx of iPS-derived cardiomyocytes in an autologous setting in cloned pigs | | | |

Die im Antrag genannten ersten drei Workpackages konnten weitgehend vollständig bearbeitet werden. Aufgrund des hohen Maßes an Spezies-Spezifität war es bislang nicht möglich, echte, d.h. keimbahngängige pluripotente iPS-Zellen beim Schwein abzuleiten. Deshalb konnten die in WP4 und 5 skizzierten Forschungsarbeiten nicht ausgeführt werden. Schwerpunkt waren also Experimente zur Ableitung und Charakterisierung von porzinen iPS-Zellen mit verschiedenen in das Genom integrierenden und nicht-integrierenden methodischen Ansätzen.

4. Wissenschaftlicher und technischer Stand, an den angeknüpft werden konnte.

Von mehreren Forschungsgruppen wurde seit 2009 über die Reprogrammierung somatischer Zellen und die Generierung porciner iPS-Zelllinien berichtet. Die meisten dieser Arbeiten haben retrovirale und lentivirale Vektoren mit integrierendem humanen oder murinen Transkriptionsfaktoren verwendet. Allerdings fehlt in diesen Arbeiten der Nachweis einer echten Pluripotenz der beschriebenen Zellen in vivo und in vitro. Kürzlich wurde eine Arbeit publiziert, in der Hinweise auf eine mögliche Chimärenbildung berichtet wurden (West et al., 2011). Eine wesentliche methodische Voraussetzung für dieses Projekt waren ferner episomale Vektoren, die durch Prof. Dr. Jürgen Bode (MHH) zur Verfügung gestellt wurden, sowie neuere Entwicklungen bei Transposon basierten Konstrukten. Letztere waren durch eine Kooperation mit Dr. Zoltan Ivics, früher MDC Berlin, heute PEI Langen, für diese Versuche zur Verfügung gestellt worden.

(West FD, Uhl EW, Liu Y, Stowe H, Lu Y, Yu P, Gallegos-Cardenas A, Pratt SL, Stice SL. 2011. Brief Report: Chimeric Pigs Produced from Induced Pluripotent Stem Cells Demonstrate Germline Transmission and No Evidence of Tumor Formation in Young Pigs. Stem Cells, 29:1640–1643)

5. Zusammenarbeit mit anderen Stellen.

Mike Roberts, University of Missouri (LIF abhängige porcine iPS-like-cells).

Poul Hyttel, Faculty of Health and Medical Sciences, University of Copenhagen (elektronenmikroskopische Untersuchungen an iPS ähnlichen Zellen).

Zoltan Ivics, Paul-Ehrlich-Institut, Langen (Transposon basierte Konstrukte).

Ulrich Martin, LEBAO, MH Hannover (Projekt 3, lentivirale Vektoren und Differenzierungen)

Pentao Liu, Sanger Institute, UK (spezifische Reprogrammierungs-Transkriptionsfaktoren)

II. Eingehende Darstellung

1. Verwendung der Zuwendung und des erzielten Ergebnisses im Einzelnen, mit Gegenüberstellung der vorgegebenen Ziele.

WP 1: Vector production, primary cultures

WP2: Establishing porcine iPS

WP3: Characterizing porcine iPS

Isolierung und Kultivierung primärer porciner Zellen sind fest etabliert im Marienseer Labor. Wir haben für diese Untersuchungen insbesondere Fibroblasten von den Oct4/GFP transgenen Schweinen verwendet. Diese Zellen zeigen eine grüne Fluoreszenz nach Behandlung mit den Reprogrammierungsfaktoren, sodass eine erfolgreiche Reprogrammierung relativ einfach erfasst werden kann. Dies ist von besonderer Bedeutung beim Schwein, da bei dieser Spezies bisher keine echten keimbahngängigen pluripotenten Zellen berichtet wurden. Zeitweilig wurden auch Fettstammzellen eingesetzt, da es Hinweise gab, dass solche Zellen leichter als die üblicherweise verwendeten Fibroblasten zu reprogrammieren sind. Die Fettstammzellen wurden aus dem Abdominalfett von Schlachtsauen gewonnen und die Stammzellen isoliert. Es konnten etwa 1 Million Fettstammzellen aus ca. 100g Fettgewebe isoliert werden. Für dieses Projekt standen episomale Minicircle Plasmide der neuesten Generation aus dem Labor

von Prof. Dr. Jürgen Bode, der als Kooperationspartner für dieses Projekt tätig war, zur Verfügung. Die Plasmide integrieren nicht in das Genom, sondern heften sich an den Zellkern an und werden dort repliziert. Dadurch können Nachteile, die mit der Verwendung integrativer Viren für die Reprogrammierung somatischer Zellen verbunden sind, vermieden werden. Der episomale Status kann durch Southern Blot oder PCR nachgewiesen werden. Nach Aktivierung eines auf dem Plasmid befindlichen Enzyms, FLIP Rekombinase, wird das Plasmid an zwei Schnittstellen, FRT Sites, geschnitten, sodass es sich in zwei kleinere Plasmide aufspaltet. Während eines die Reprogrammierungsgene beinhaltet, enthält der andere Teil nur die bakteriellen Bestandteile, die lediglich zur Vervielfältigung des Plasmids benötigt werden, in der Säugerzelle jedoch nachteilig sind. Diese Verkleinerung des Plasmids stellt einen gravierenden Vorteil gegenüber anderen Plasmiden dar, denn das verkleinerte Plasmid kann sich besser in der Zelle etablieren. Aus diesem episomalen Minicircle Plasmid wurde das ursprünglich vorhanden EGFP, das dort nur als Transfektionskontrolle dient, mittels Restriktionsenzymen herausgeschnitten. Eine erfolgreiche Reprogrammierung wäre sonst nicht mehr erkennbar gewesen. Der Vektor wurde anschließend erfolgreich in die Reprogrammierungskassette kloniert, welche durch Axel Schambach aus der Arbeitsgruppe Experimental Hematology der MHH zur Verfügung gestellt worden war. Die Kassette besteht aus den bekannten Reprogrammierungsgenen Oct4, Sox2, Klf4 und cMyc. Dieses sogenannte All-in-One Plasmid enthielt zusätzlich das rot fluoreszierende Reporter gen „Tomato“, sodass eine erfolgreiche Transfektion durch rote Fluoreszenz angezeigt wird. Die Transfektion der porzinen transgenen Oct4/GFP Zellen mit dem episomalen Plasmid war erfolgreich. Jedoch konnte eine Reprogrammierung weder nach Elektroporation noch nach Lipofektion gezeigt werden. Auch wiederholte Lipofektionen, wie sie von anderen Autoren für somatische Zellen von Maus beschrieben wurde, zeigten bei Schweinezellen keinen durchgreifenden Erfolg. Alle Lipofektionsversuche mit Minicircles und episomalen Plasmiden waren am Ende nicht erfolgreich; eine konsistente Reprogrammierung der porzinen Zellen konnte nicht beobachtet werden.

Deshalb wurde in weiteren Versuchsreihen ein neuer methodischer Ansatz gewählt, in dem Transposon basierte Konstrukte eingesetzt wurden. Das Sleeping Beauty Transposon von Dr. Zoltan Ivics stand für diesen Zweck zur Verfügung. Nach Kotransfektion mit einem zusätzlichen Plasmid, der Transposase, schneidet die Transposase an den inverted repeats und integriert das Fremdgen in das Genom der Wirtszelle. Ohne Kotransfektion der Transposase zeigen Transposons jedoch keine Tendenz zu integrieren und verhalten sich wie normale Plasmide. Mit solchen Versuchen könnte ein direkter Vergleich von integrierenden und nicht-integrierenden Vektoren möglich werden. Bei Verwendung von Sleeping Beauty basierten Reprogrammierungsvektoren unter Verwendung von Transposase konnten erstmals porzine iPS ähnliche Zellen (iPS-like-cells) erstellt und diese im Detail charakterisiert werden. Dieser methodische Ansatz führte zu porzinen Zellen, die einen pluripotenten Status aufwiesen, zumindest basierend auf der Zellmorphologie und der Reaktivierung des Oct4/EGFP Reporters. Die Zellen zeigten zudem eine lange Proliferation in vitro von mehr als 40 Passagen, exprimierten typische Transkriptionsfaktoren, einschl. Oct4, NANOG, Sox2, Rex-1, EPPA5 und UFT-1, sowie verschiedene Oberflächenmarker, die Pluripotenz anzeigen wie SSEA-1 und TRA-1 60. Durch in vitro Differenzierung ergaben sich zudem Hinweise auf die Anwesenheit von Abkömmlingen der drei Keimblätter. Als wesentlichen neuen Befund wurden nach Injektion von iPS Zellen unter die Haut von immun-defizienten Mäusen in drei von sechs Fällen Teratomas beobachtet. Nach unserer Kenntnis ist dies bisher in der Literatur bisher kaum beschrieben worden. Die Ergebnisse dieser Untersuchung sind in einer Publikation (Kues et al., Stem Cells and Development, 22, 2013) erschienen. Eine Kopie dieser Publikation ist diesem Bericht angehängt und enthält alle notwendigen methodischen Details sowie die Interpretation der erarbeiteten Ergebnisse.

2. Wichtigste Positionen des zahlenmäßigen Nachweises.

Die genauen Angaben zum zahlenmäßigen Nachweis sind dem Schreiben der Drittmittelabteilung des Friedrich-Loeffler-Instituts zu entnehmen.

3. Notwendigkeit und Angemessenheit der geleisteten Arbeit.

Obwohl mit den Arbeiten das ursprünglich vorgesehene ehrgeizige Ziel der Transplantation von aus porzinen iPS Zellen abgeleiteten Kardiomyozyten nicht erreicht wurde, stellen die Ergebnisse einen wesentlichen Fortschritt in der Generierung echter pluripotenter porziner iPS-Zellen dar. Sie sind eine wesentliche Basis für weitergehende Untersuchungen, die bereits begonnen wurden, wo zum einen der direkte Vergleich von Transposon basierten Konstrukten mit und ohne Transposase durchgeführt werden soll und zum anderen Tetrazyklin induzierbare Reprogrammierungsvektoren eingesetzt werden.

4. Der voraussichtliche Nutzen, insbesondere die Verwertbarkeit des Ergebnisses im Sinne des fortgeschriebenen Verwertungsplans.

Trotz der oben kurz geschilderten methodischen Schwierigkeiten und der nicht erfolgreichen Verwendung episomaler Vektoren in der Etablierung echter iPS Zellen ist mit der erstmaligen Beschreibung von iPS Zellen nach Verwendung von Transposon basierten Konstrukten aus porzinen iPS Zellen ein wesentlicher Schritt im Hinblick auf die Etablierung echter pluripotenter Zellen bei dieser Spezies gelungen. Dementsprechend konnten die Ergebnisse in einer renommierten peer-reviewten wissenschaftlichen Zeitschrift publiziert werden (siehe oben).

5. Während der Durchführung des Vorhabens dem ZE bekannt gewordener Fortschritt auf dem Gebiet des Vorhabens an anderen Stellen.

Im Verlauf der Arbeit sind weitere Publikationen zur Generierung porziner iPS-Zellen erschienen. Bis auf die Arbeit von West et al., 2011, die Hinweise auf Chimärenbildung basierend auf PCR enthält, sind aber keine neuen Ergebnisse im Hinblick auf keimbahngängige porzine iPS-Zellen publiziert worden. Dies spricht für ein hohes Maß an Spezies-Spezifität im Reprogrammierungsmechanismus. Ähnliches trifft wahrscheinlich auch auf die Generierung von embryonalen Stammzellen bei dieser Spezies zu, die trotz aller bisher bekannten Protokolle nicht beschrieben werden konnten.

6. Erfolgte oder geplante Veröffentlichungen des Ergebnisses nach Nr. 6

Kues WA, Herrmann D, Barg-Kues B, Haridoss S, Nowak-Imialek N, Buchholz T, Streek M, Grebe A, Grabundzija I, Merkert S, Martin U, Hall VJ, Rasmussen MA, Ivics Z, Hyttel P, Niemann H. 2013. Derivation and Characterization of Sleeping Beauty Transposon-Mediated Porcine Induced Pluripotent Stem Cells. *Stem Cells and Development*, 22: <http://dx.doi.org/10.1089/scd.2012.0382>