

## 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  $\gamma$ -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

<b>Project/mile stone</b>	<b>Year 1</b>	<b>Year 2</b>	<b>Year 3</b>
<b>WP1 Vector production, primary cultures</b>			
Isolation and maintenance of primary cells			
Production of retroviral constructs			
Construction of episomal vectors			
<b>WP2 Establishing porcine iPS</b>			
Transduction of skin fibroblasts			
Establishment of porcine iPS for transplantation experiments			
<b>WP3 Characterizing porcine iPS</b>			
Pluripotency markers			
Teratoma formation			
<b>WP4 Differentiation of porcine iPS</b>			
Spontaneous differentiation			
Targeted differentiation towards cardiomyocytes and respiratory epithelial cells			
<b>WP5 Transplanting porcine iPS</b>			
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.