



core facilities
genomics and proteomics
genome editing
iPS core units
model organisms
developmental biology
biobanking
stem cell biology
computational stem cell biology
stem cell imaging
genomics and proteomics
bioprinting
iPS core units
biobanking
stem cell factories
genome editing
developmental biology
biobanking
stem cell biology
computational stem cell biology
stem cell imaging
genomics and proteomics
bioprinting
iPS core units
biobanking
stem cell factories
genome editing

Färbung von Stammzellen (rot) und des Nervensystems (grün) des Kopf-Fragments eines Plattwurms, der gerade einen neuen Schwanz regeneriert.

Genome Editing

Designer-Schnitte im Erbgut

Es gibt sie erst seit wenigen Jahren – doch Designer-Nukleasen sind schnell zu den Stars in der Werkzeugkiste der Molekularbiologen avanciert. Weil man mit den Genschere schnell und präzise Veränderungen im Genom vornehmen kann, eröffnen sich für die Biotechnologie und die Gesundheitsforschung enorme Möglichkeiten. Auch Stammzellforscher in Deutschland haben die neuen Werkzeuge rasch für sich entdeckt. Das „Genome Editing“ birgt das Potenzial, stammzellbasierte Krankheitsmodelle zu verbessern. Molekularmediziner träumen bereits von neuen und noch sichereren Gentherapien.

Das Genom von Organismen an einer bestimmten Stelle gezielt und schnell zu verändern, war lange nur ein Traum von Molekularbiologen. Doch es fehlten die passenden Werkzeuge dafür. Stattdessen setzten die Forscher jahrzehntelang auf ein kompliziertes und langwieriges Verfahren, die homologe Rekombination in embryonalen Stammzellen (ES-Zellen), um gezielt Gene bei Mäusen auszuschalten.

Doch in den vergangenen Jahren hat sich das Feld der DNA-Technologien geradezu stürmisch weiterentwickelt. Mit sogenannten Designer-Nukleasen schufen Biotechnologen jene molekularen Präzisionsinstrumente, mit denen sich Genomchirurgie betreiben lässt. Mit den neu entdeckten molekularen Scheren ist es erstmals möglich, das Genom ganz gezielt zu verändern, an einer gewünschten Stelle Mutationen oder ganze DNA-Abschnitte einzuführen oder sie zu korrigieren. Da sich der

DNA-Code damit wie ein Text bearbeiten und umschreiben lässt, wurde der Begriff „Genome Editing“ geboren.

Revolution in der Gentechnik

Nicht nur für den Freiburger Molekularmediziner Toni Cathomen ist dies ein bahnbrechender Fortschritt. „Nach den Restriktionsenzymen in den 1970er Jahren erleben wir ohne Zweifel die zweite Revolution in der Gentechnik“, sagt der Direktor des Instituts für Zell- und Gentherapie am Universitätsklinikum Freiburg. Der Forscher hat diese Revolution in seinem Labor bereits von den Anfängen an begleitet, sie kam in drei Wellen: Vor etwa zehn Jahren wurden die Zinkfinger-Nukleasen (ZFN) entwickelt, 2011 traten dann die TAL-Effektor-Nukleasen (TALEN) auf den Plan. „Den ganz großen Durchbruch für das Feld hat es dann 2013 mit dem CRISPR-Cas-System gegeben“, sagt Cathomen. „Weil es einfach, günstig und universell einsetzbar ist, hat es sich explosionsartig in der Forscherwelt verbreitet.“

Alle drei Designer-Nukleasen-Formate funktionieren nach einem ähnlichen Prinzip: Die Eiweißmoleküle lassen sich auf ein bestimmtes Ziel im Erbgut programmieren. Wird die Genschere an der gewünschten Stelle im Genom aktiv, führt der Schnitt zum Doppelstrangbruch der DNA. „Das aktiviert die Reparaturantwort in der Zelle und diese kann genutzt werden, um die gezielten Modifikationen herbeizuführen“, erläutert Cathomen.

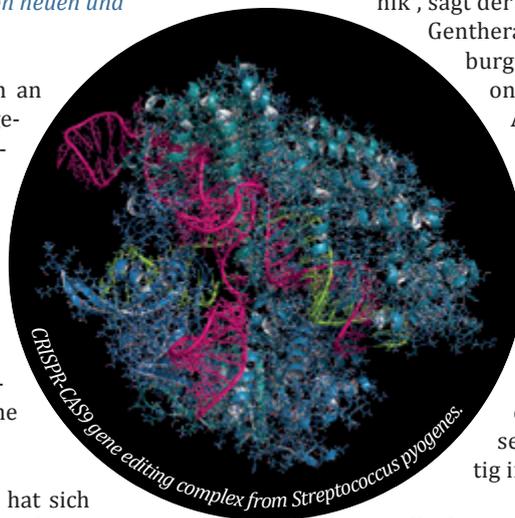


Foto: Fotolia / molekual.be

Lehrstuhl Tissue Engineering und Regenerative Medizin (TERM)

Artifizielle von Blutgefäßen durchzogene Gewebe

Durch Methoden des Tissue Engineering werden Implantate aus körpereigenen Zellen hergestellt, die Abstoßungsreaktionen des Körpers minimieren. Die dabei aktivierten Selbstheilungskräfte führen zur Regeneration von Gewebe (Regenerative Medizin).

Wir entwickeln humanisierte Gewebemodelle als Alternative zum Tierversuch. Die zellspezifische Integrität und Funktionalität wird dabei durch gewebespezifische Bioreaktoren gewährleistet, worin Kulturbedingungen ähnlich der natürlichen Mikroumgebung der Zelle im Körper geschaffen werden. Zur Erzeugung von vaskularisierten

Geweben in vitro wird eine von Blutgefäßen durchzogene Trägerstruktur genutzt: Die BioVaSc (Biological Vascularized Scaffold). Damit wurden erfolgreich Gewebemodelle und Modelle für Krebs oder (Infektions-) Krankheiten aufgebaut.

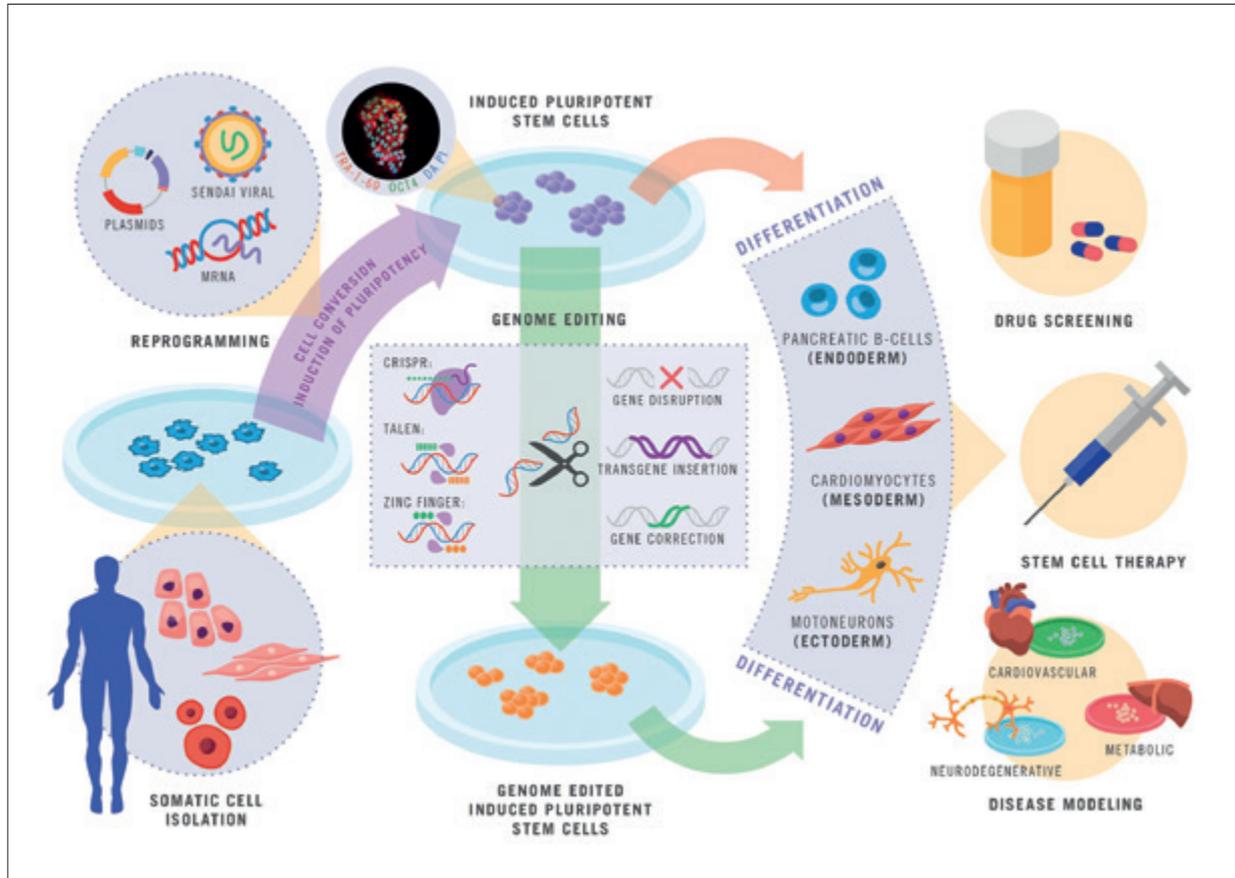
Lehrstuhl Tissue Engineering und Regenerative Medizin (TERM)
Universitätsklinikum Würzburg
 Röntgenring 11
 97070 Würzburg
www.term.ukw.de

Universitätsklinikum Würzburg UK

Lehrstuhl für Tissue Engineering und Regenerative Medizin



Gewebespezifische Bioreaktoren und Inkubatoren



Reprogrammierung und Genome Editing

Einfach und effizient

Weil ZFN und TALEN rein proteinbasierte DNA-Erkennungssysteme verwenden, ist ihre Herstellung aufwendiger und teuer. Hier ist zudem Know-how in Sachen Protein-Design gefragt. Nicht so beim CRISPR-System: Das in Bakterien entdeckte Immunsystem benötigt lediglich ein spezielles RNA-Molekül, um das Enzym Cas9 auf ein Ziel „scharf“ zu stellen. „Das System lässt sich in jedem Labor mit einfachsten molekularbiologischen Mitteln herstellen und in Zellen einschleusen“, bestätigt Cathomen und ergänzt: „Nach einer Woche kann man bei CRISPR-Cas schon mit einem maßgeschneiderten Ergebnis rechnen, es funktioniert ausgezeichnet.“

Auch andere Forscher sind von dieser Präzision und Geschwindigkeit fasziniert: „Es ist schon irreführend“, so der Bioingenieur Frank Buchholz von der Medizinischen Fakultät der TU Dresden, „wir haben hier ein bakterielles System, das sich hervorragend auf andere Zellen egal welcher Spezies übertragen lässt.“ Ein weiteres Plus: Mit dem System lassen sich sogar mehrere Orte im Genom gleichzeitig bearbeiten. Wie sehr die neuen Genschere die Fantasie der Genforscher beflügeln, zeigt sich auch an den hochrangigen Publikationen, die nahezu im Wochentakt veröffentlicht werden.

Die Einsatzbereiche für das Genome Editing sind äußerst vielfältig. „Genetisch veränderte Organismen lassen sich nun relativ einfach und rasch herstellen“, sagt Buchholz. So

Grafik: The Korean Association of Internal Medicine, Stanford University / Sebastian Diecke

DFG-Forschungszentrum für Regenerative Therapien Dresden

CRTD

Im DFG-Forschungszentrum und Exzellenzcluster für Regenerative Therapien Dresden untersuchen Forscher die Regenerationsmechanismen von Modellorganismen mit dem Ziel, neuartige, regenerative Therapien zur Heilung von bisher für den Menschen unheilbare Krankheiten zu entwickeln. Die Forschungsschwerpunkte des Zentrums konzentrieren sich auf Hämatologie/ Immunologie, Diabetes, neurodegenerative Erkrankungen und Knochenersatz. Zur Zeit arbeiten 7 Professoren und 10 Gruppenleiter am CRTD, die in einem interdisziplinären Netzwerk von über 80 Mitgliedern aus 7 verschiedenen

Institutionen Dresdens eingebunden sind. Zusätzlich unterstützen 21 Partner aus der Industrie die Forschungsprojekte. Die Synergien im Netzwerk erlauben eine schnelle Translation der Ergebnisse aus der Grundlagenforschung in klinische Anwendungen.

CRTD / DFG-Forschungszentrum für Regenerative Therapien Dresden – Exzellenzcluster
 Fetscherstraße 105
 01307 Dresden
www.crt-dresden.de



könnten bessere Tiermodelle für Erkrankungen entwickelt werden. Sogar für funktionelle Hochdurchsatz-Screens im Genom sieht er in CRISPR-Cas ein vielversprechendes Werkzeug. Auch weil man damit die Aktivität von Genen nun gezielt hoch- oder herunterregeln könne.

Kontrollen für Krankheitsmodelle

Schnell haben auch die Stammzellforscher in Deutschland die Designer-Nukleasen als Werkzeuge für sich entdeckt. Das große Plus: Sie lassen sich ideal mit einer weiteren, mächtigen Technologie kombinieren: der Reprogrammierung von Zellen (siehe Kapitel iPS Core Units, S. 37). Mittels Genome Editing können Biomediziner zum Beispiel bessere Krankheitsmodelle in der Petrischale entwickeln. „Entweder führt man in induzierten pluripotenten Stammzellen (iPS-Zellen) von Gesunden Mutationen ein und untersucht davon abgeleitete Zelltypen auf ein Krankheitsbild. Oder man nutzt die Nukleasen, um Mutationen in iPS-Zellen von Patienten zu korrigieren“, erläutert Toni Cathomen. Ein weiterer Vorteil des Genome Editings ist die Herstellung von sogenannten isogenen Linien der iPS-Zellen: Also zwei Versionen, die völlig identische Genome besitzen und sich nur in der einen Stelle des Eingriffs unterscheiden. „Das sind die perfekten Kontrollen, weil sie den gleichen genetischen Hintergrund haben“, betont die Neurogenetikerin

Christine Klein vom Universitätsklinikum Lübeck. Damit sei sichergestellt, dass wirklich Äpfel mit Äpfeln verglichen würden. Die Wissenschaftlerin erforscht auf diese Weise die molekularen Ursachen von Parkinson in von iPS abgeleiteten Nervenzellen. Somit komme man zu deutlich robusteren Modellen, auch wenn sich das Problem der biologischen und technisch verursachten Variabilität bei iPS-Zellen nicht völlig ausräumen lasse.

Chancen für die Gentherapie

Die neuen Super-Scheren lassen Forscher auch von ganz neuen Anwendungen für die personalisierte Medizin träumen. Zum Beispiel bei der Gentherapie: Zur Behandlung von Erbkrankheiten wird hierbei versucht, Gendefekte bei Patienten mit molekularbiologischen Methoden auszugleichen. Bislang bestand die Therapie meistens jedoch eher aus einer Genersatztherapie. Eine gesunde Genkopie wurde mithilfe von Genfähern in den Körper von Patienten eingeschleust, um den molekularen Defekt zu kompensieren.

Mit den Designer-Nukleasen wird es erstmals möglich, quasi wie ein Chirurg vorzugehen, und nur die Mutation selbst gezielt zu korrigieren. Blutstammzellen und T-Zellen stehen für solche Eingriffe derzeit im Fokus der Anstrengungen von Gentherapeuten. US-Forscher haben

Aufnahme seltener Ereignisse bei der Reprogrammierung von iPSCs



Die kontinuierliche Kontrolle von Zellwachstum und Wachstumsverhalten kann die Aussagekraft aller Prozesse in der Gewebekultur oder Zell-basierten Untersuchungen außerordentlich verbessern. iPSC-Labore entwickeln immer effizientere Methoden Zellen herzustellen, aber Stammzellen und somatische Vorläuferzellen sind oft sehr empfindlich und deren Untersuchung in der sterilen Werkbank sehr mühsam. Das IncuCyte-Mikroskop ermöglicht einen hohen Durchsatz und seine besondere Platzierung die Kontrolle aus der Ferne – ohne die Zellen aus dem Inkubator zu nehmen. Die Vereinfachung und Automatisierung der Kontrolle mit dem IncuCyte minimiert die Zeitdauer, die Zellen und Anwender unter nicht-optimalen Bedingungen verbringen müssen und stellt einen wichtigen Schritt zum Erfolg dar. Arbeiten, die normalerweise in der sterilen Werkbank

durchgeführt werden mussten, können nun am PC erledigt werden; Bilder der verschiedenen Gefäße und Wells werden übers Netzwerk an jeden vernetzten Arbeitsplatz übertragen, ohne die Zellen zu stören oder Stress auszusetzen. Software-Werkzeuge ermöglichen die Verfolgung und Markierung von Kolonien und Werkzeug-Zubehör die Markierungen der Gefäße, wodurch das „Wiederfinden“ der Kolonien bei der Pflege der Kulturen vereinfacht wird. Durch die kontinuierliche Kontrolle bekommt man eine einzigartige Einsicht in die Entwicklung neuer, seltener und unvorhergesehener Ereignisse.

Für weitere Informationen besuchen sie bitte unsere Homepage www.essenbioscience.com oder kontaktieren **Dr. Peter Djali, European Sales Manager, djali@essenbio.com**

ESSEN BIOSCIENCE

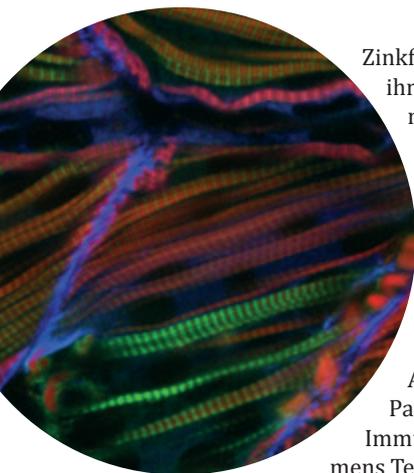
DAY 7 **DAY 12** **DAY 17**

cellplayer KINETIC ASSAYS

The CellPlayer™ Kinetic Stem Cell Application using the IncuCyte ZOOM™ Live Content Imaging System. Seven days after reprogramming fibroblasts with CytoTune®, transitioning cells are re-seeded onto feeder cells. Colony emergence over time was observed. Here, representative images taken day 7, 12 and 17 during reprogramming show a colony's evolution.

INCUCYTE™ ZOOM
Live Content Imaging Within Your Incubator

www.essenbioscience.com



Zinkfinger-Nukleasen, die sich wegen ihrer geringen Größe sehr gut für therapeutische Anwendungen eignen, bereits erfolgreich in frühen klinischen Studien erprobt. Es war ihnen gelungen, bei HIV-Patienten mittels Genome Editing eine Genveränderung durchzuführen, welche die Behandelten immun gegen das HI-Virus im Körper machte, zumindest vorübergehend. Auf Therapien zur Heilung von HIV-Patienten sowie anderer chronischer Immundefekte fokussiert auch Cathomens Team am Universitätsklinikum in Frei-

burg. Und er ist überzeugt: „Es ist nur noch eine Frage der Zeit, bis auch die jüngeren Technologieplattformen wie TALENs und CRISPR nachziehen und den Weg in die klinische Anwendung finden.“

Das Team um Frank Buchholz arbeitet ebenfalls an einer HIV-Therapie auf der Basis von Genome Editing. Dabei setzt er allerdings auf eine andere Klasse von Hightech-Werkzeugen, die sogenannten Tre-Rekombinasen. „Sie schneiden nicht nur sehr präzise das Viren-Erbgut aus infizierten Zellen heraus, sondern kleben die DNA-Stränge nach dem Eingriff auch exakt wieder zusammen“, sagt Buchholz. Das mache das System sehr sicher. Aufbauend auf ermutigenden präklinischen Daten sind die Dresdner in Zusammenarbeit mit Hamburger Kollegen gerade mit Hochdruck dabei, das Therapiekonzept in erste klinische Studien zu führen.

Aussetzer vermeiden

Trotz ihrer Popularität: Die Designer-Nukleasen sind nicht frei von Fehlern. Manchmal gibt es Aussetzer und die molekulare Skalpell setzen ihre Schnitte an anderen Erbgutstellen als den gewünschten. Mit Blick auf mögliche medizinische Anwendungen wie die Gentherapie gilt es, solche Off-target-Effekte so gut es geht auszuschließen. Toni Cathomen kann aus Studien in seinem Labor zumindest Ent-

warnung geben: „Wir haben mit den von uns eingesetzten Dosen von TALENs sowie bei CRISPR-Cas eine hohe Schneideeffizienz und kaum Off-target-Effekte beobachtet.“

Biotechnologen tüfteln daran, die Nukleasen noch zuverlässiger und bedienungsfreundlicher zu machen. Ein weiterer Schwachpunkt muss ebenfalls noch adressiert werden: Der genetische Bauplan der Cas9-Nuklease ist recht groß. Diese Fracht lässt sich deshalb nur schwer in Genfähnen packen, um sie in lebende Zellen einzuschleusen. Hier gibt es aber bereits vielversprechende Innovationen zur Lösung des Problems. Die Revolution der Gentechnologie ist in vollem Gange.

Text: Philipp Graf

Anmerkung der Redaktion

*Die faszinierenden Möglichkeiten des Genome Editing speziell durch das CRISPR-Cas9-System bergen auch ethische Probleme. Sie erlauben den schnellen Eingriff in die menschliche Keimbahn und die Vererbung sowohl gezielter als auch ungewollter genetischer Veränderungen im Genom. Eine Gruppe führender Wissenschaftler, unter anderem auch eine Entdeckerin des CRISPR-Systems, warnen im März 2015 daher in einem Aufruf im Fachjournal Science vor Eingriffen in die Keimbahn menschlicher Embryonen: „Selbst in Ländern, in denen es aufgrund der Gesetzeslage möglich ist, sollten Wissenschaftler den Versuch der Veränderung des Genoms der Keimbahn für die klinische Anwendung bei Menschen vermeiden, bis die gesellschaftlichen, ökologischen und ethischen Konsequenzen dieses Handelns von wissenschaftlichen und politischen Organisationen diskutiert wurden.“ *Die Internationale Stammzellgesellschaft ISSCR setzt sich für ein Moratorium für Eingriffe in der Keimbahn mittels Genome Engineering in der Reproduktionsmedizin ein.*

**Originale Quelle: Science Journal: Baltimore et al. „A prudent path forward for genomic engineering and germline gene modification, 19 March 2015.*

Foto: MDC / Cecile Otten

Fraunhofer-Institut für Zelltherapie und Immunologie IZI

Fraunhofer IZI

Das Fraunhofer-Institut für Zelltherapie und Immunologie IZI erforscht und entwickelt spezielle Problemlösungen an den Schnittstellen von Medizin, Biowissenschaften und Ingenieurwissenschaften. Eine der Hauptaufgaben besteht dabei in der Auftragsforschung für biotechnologische, pharmazeutische und medizintechnische Unternehmen, Kliniken, Diagnostische Labore sowie Forschungseinrichtungen. Innerhalb der Geschäftsfelder Wirkstoffe, Zelltherapie, Diagnostik und Biobanken entwickelt, optimiert und validiert das Fraunhofer IZI Verfahren, Materialien und Produkte. Die Kompetenzen

liegen in den Bereichen Zellbiologie, Immunologie, Wirkstoffbiochemie, Bioanalytik, Bioproduktion sowie Prozessentwicklung und Automatisierung. Im Forschungsmittelpunkt stehen dabei die Indikationsbereiche Onkologie, Ischämie, autoimmune und entzündliche Erkrankungen sowie Infektionskrankheiten und Regenerative Medizin. Das Institut ist kliniknah orientiert und übernimmt Qualitätsprüfungen sowie die GMP-konforme Herstellung von klinischen Prüfmustern. Darüber hinaus unterstützt es Partner bei der Erlangung von Herstellungsgenehmigungen und Zulassungen. Vom 21.-23. Oktober 2015 richten das Fraunhofer

IZI und das TRM Leipzig die World Conference on Regenerative Medicine aus.

www.wcrm-leipzig.com



Fraunhofer-Institut für Zelltherapie und Immunologie IZI

Perlickstr. 3, 04103 Leipzig

www.izi.fraunhofer.de