

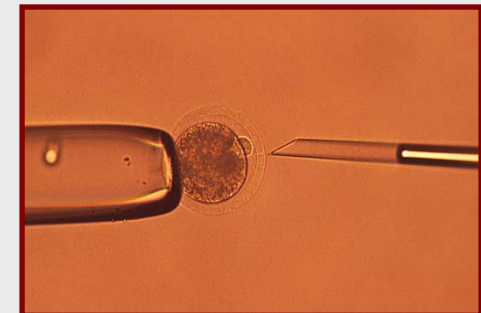
*Deutscher Ethikrat*  
*„Klone im Stall? Tierklonierung und Fleischproduktion“*  
*Berlin, 21. Oktober 2009*

## Naturwissenschaftliche Anmerkungen zum somatischen Klonen beim Säuger

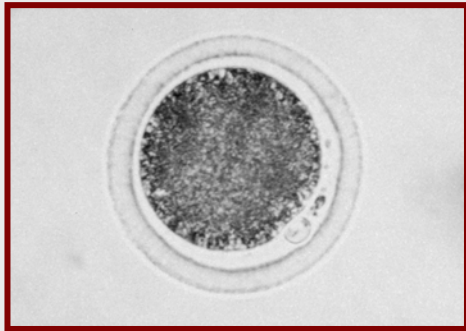
- **Aktueller Entwicklungsstand**
  - **Zugrunde liegende biologische Mechanismen**
  - **Anwendungsperspektiven des somatischen Klonens**

**Prof. Dr. Heiner Niemann**

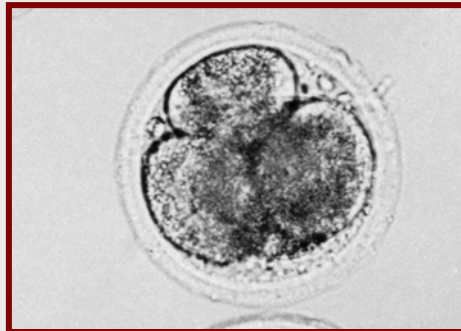
Institut für Nutztiergenetik (FLI)  
Forschungsbereich Biotechnologie  
Mariensee, Neustadt, Germany



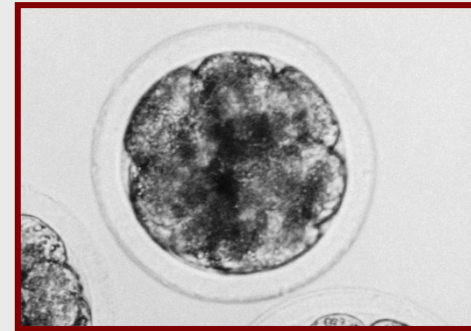
# Embryonalentwicklung von der Zygote bis zur Blastozyste



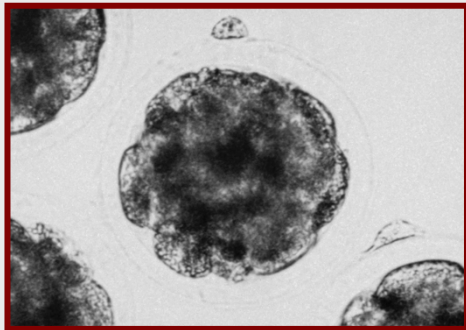
Zygote



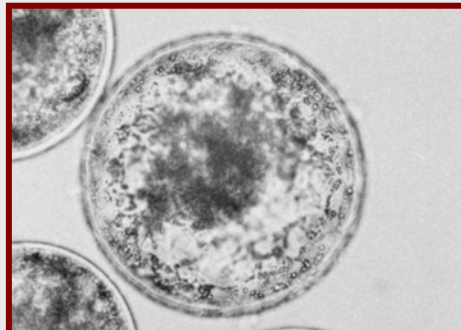
4-Zell-Embryo



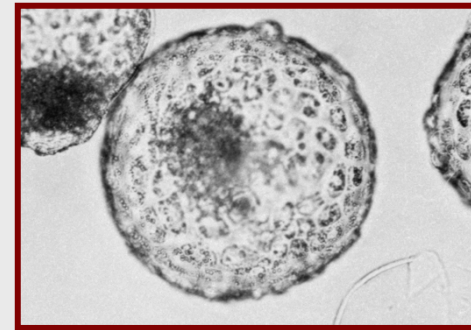
8-16-Zell-Embryo



Morula

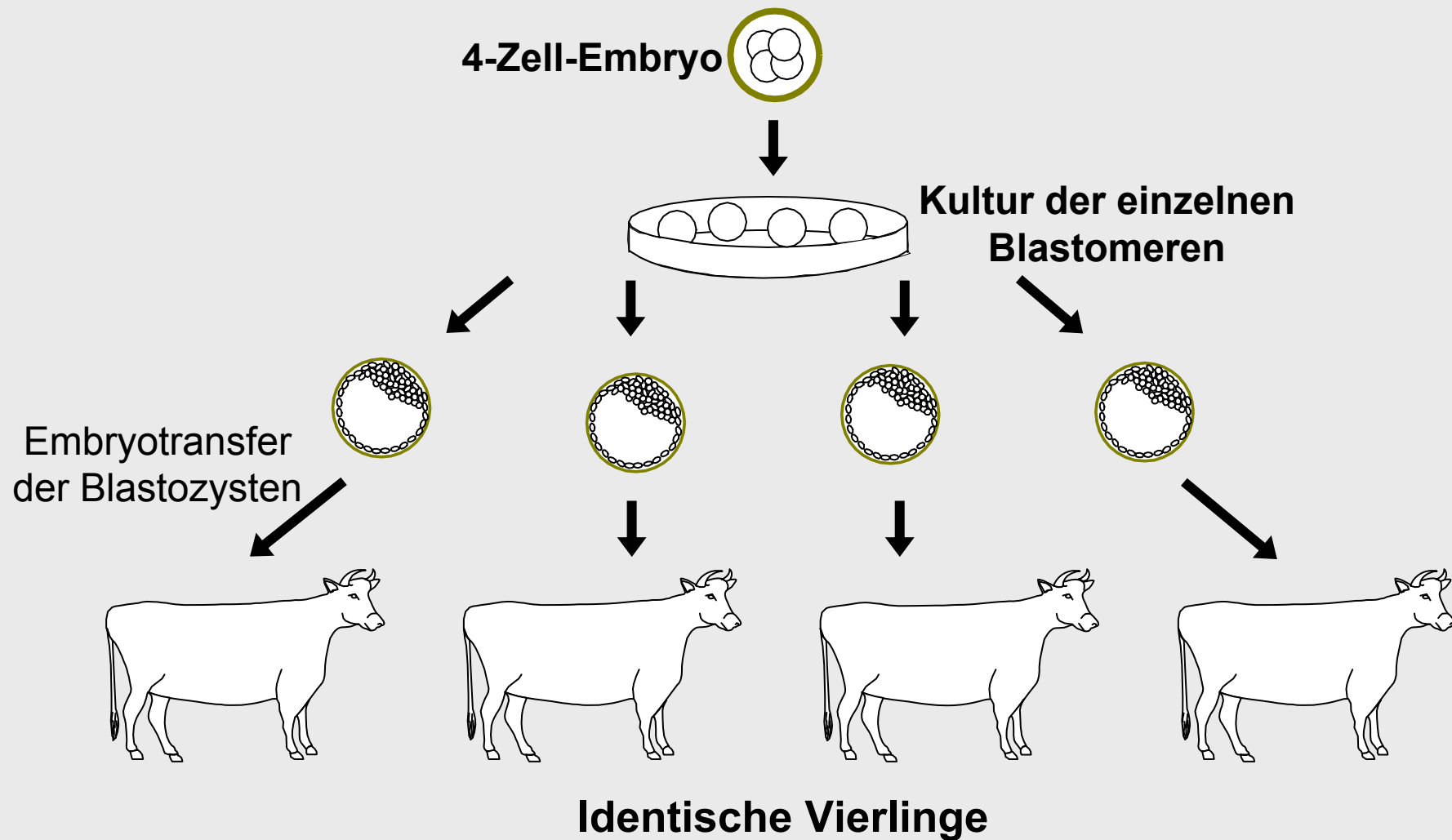


Expandierte  
Blastozyste



Geschlüpfte  
Blastozyste

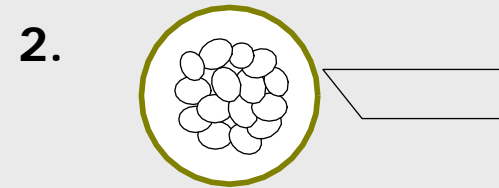
# Erstellung genetisch-identischer Vierlinge durch Isolation der Blastomeren (Totipotenz einzelner Blastomeren)



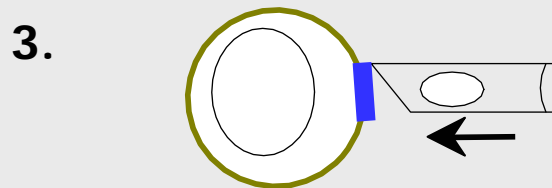
# Produktion eines Embryos durch Kerntransfer mit embryonalen Zellen (Embryonales Klonen)



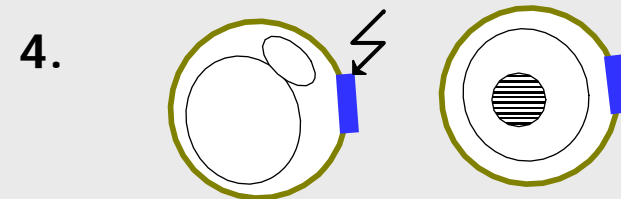
Enukleation der Empfängereizelle



Entnahme der Spenderzelle



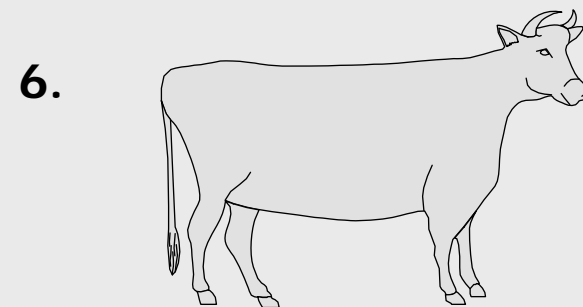
Einbringen der Spenderzelle



Fusion und Aktivierung



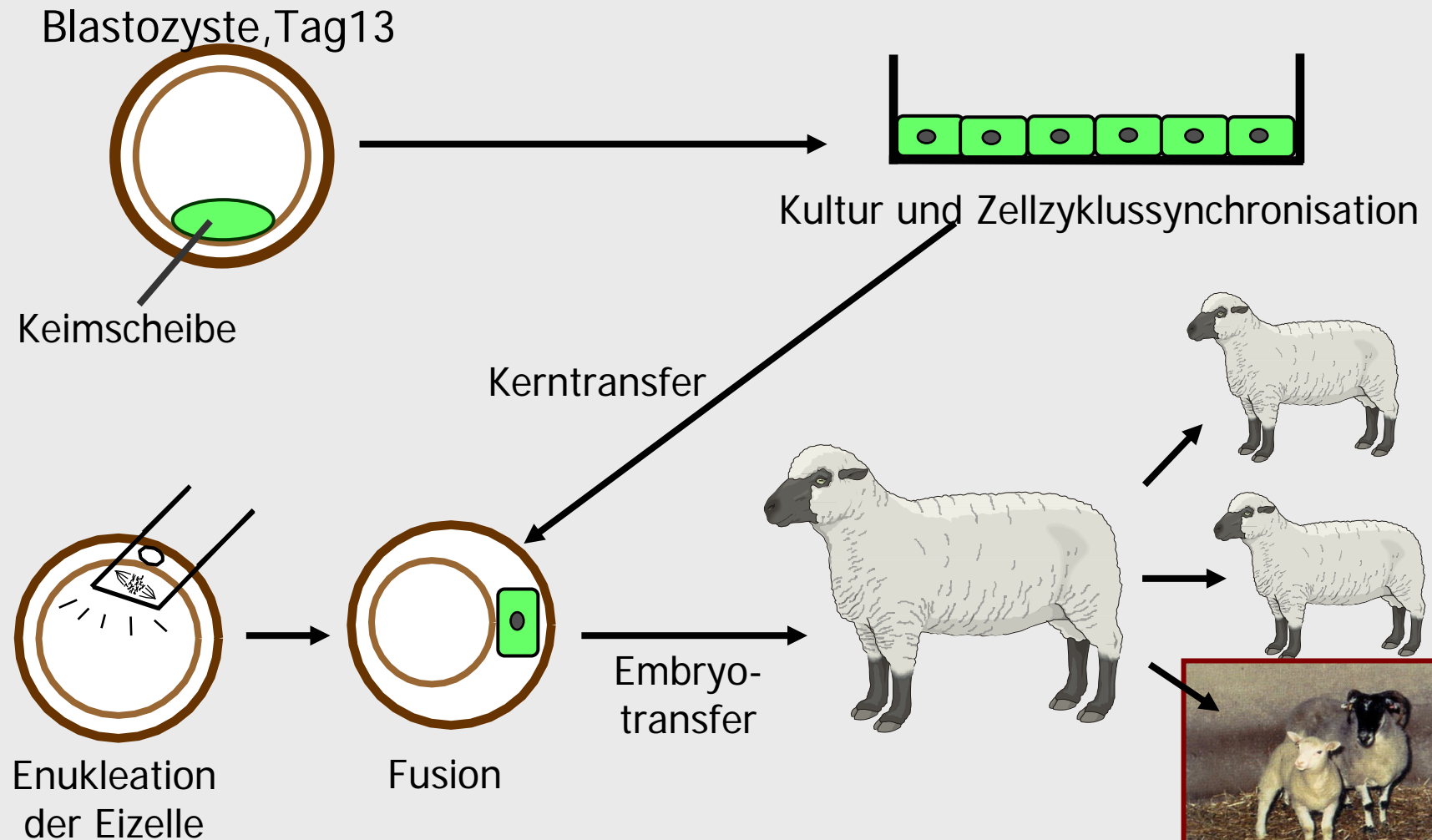
Kultur bis zur Blastozyste mit  
anschließendem Embryotransfer



Geklonter Nachkomme



# Schematische Darstellung des Kerntransfers mit kultivierten fetalen Zellen



Campbell et al. (1996)



# Somatisches Klonen beim Schaf mit drei unterschiedlich differenzierten Spenderzellen

Cell type	Breed of lamb	Lamb identity	Duration of pregnancy (days)*	Birth weight (kg)
Mammary epithelium	Finn Dorset	6LL3	148	6.6
Fetal fibroblast	Black Welsh	6LL7	152	5.6
	Black Welsh	6LL8	149	2.8
	Black Welsh	6LL9†	156	3.1
Embryo-derived	Poll Dorset	6LL1	149	6.5
	Poll Dorset	6LL2‡	152	6.2
	Poll Dorset	6LL5	148	4.2
	Poll Dorset	6LL6‡	152	5.3

\* Breed averages are 143, 147 and 145 days, respectively for the three genotypes Finn Dorset, Black Welsh Mountain and Poll Dorset.

† This lamb died within a few minutes of birth.

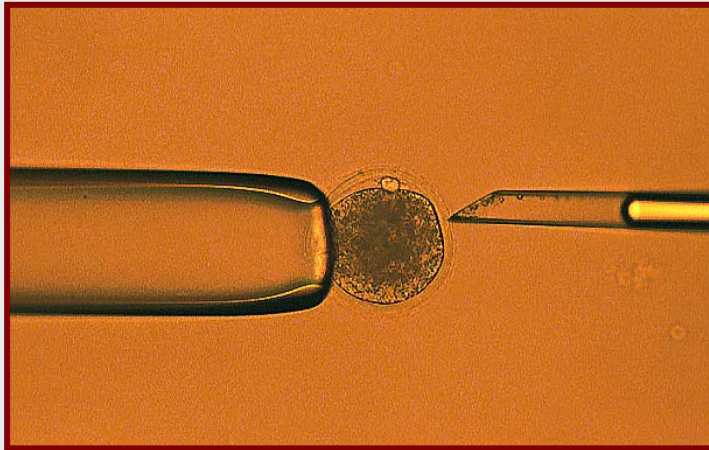
‡ These lambs were delivered by caesarian section. Overall the nature of the assistance provided by the veterinary surgeon was similar to that expected in a commercial flock.

**Mit Dolly, dem ersten geklonten Säugetier ist eine neue Ära der biologischen Forschung eingeleitet worden**

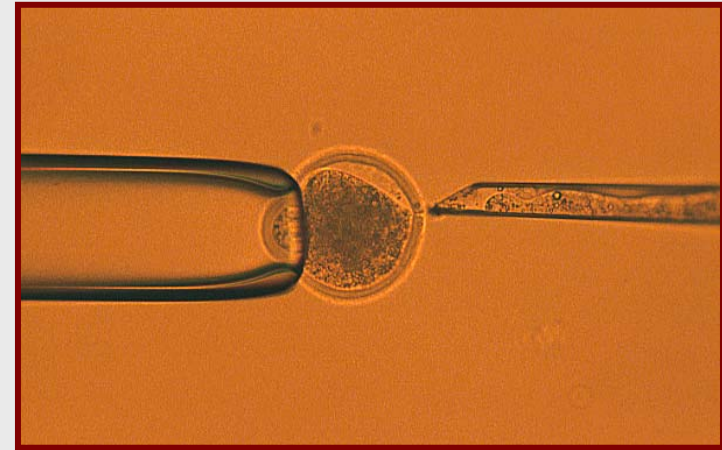


**Dolly**  
**1996 - 2003**  
**RIP**

# Somatischer Kerntransfer Enukleation der Empfängerzelle



vorher



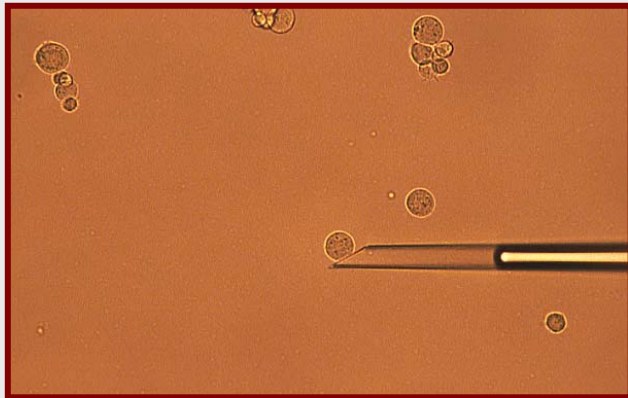
nachher



Kontrolle unter  
UV-Licht



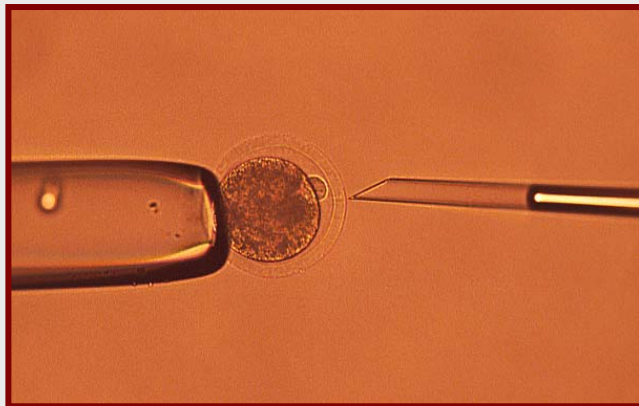
# Somatischer Kerntransfer - Einbringen der Spenderzelle



Aufsaugen der Spenderzelle



Vor Einbringen



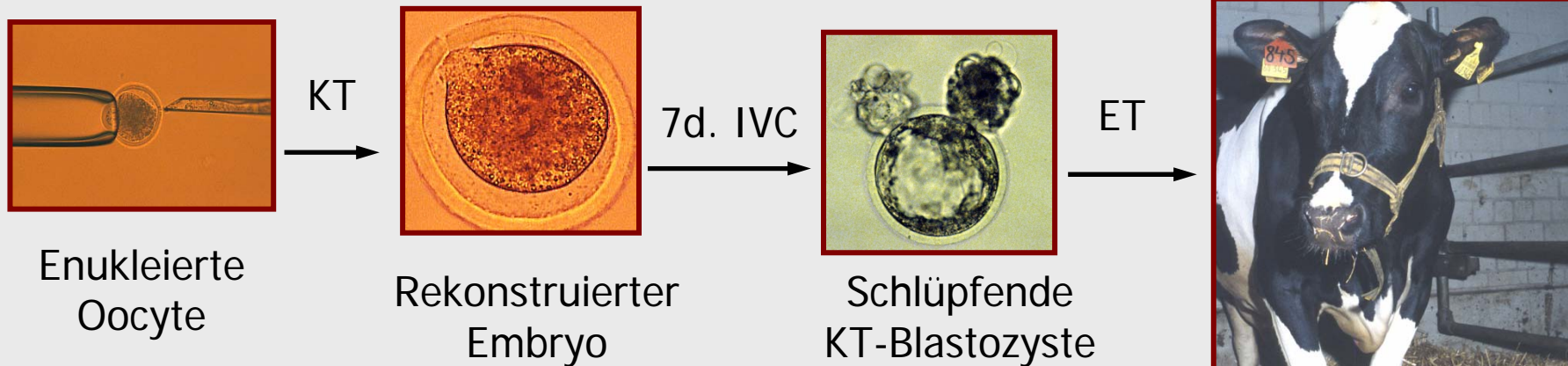
Nach Einbringen



Nach Fusion



# Somatisches Klonen von Rindern



Marienseer Rinder, geklont aus adulten (links) und fetalen (rechts) Fibroblasten

Die zweite Generation:






# Erfolgreich geklonte Säugetiere



# Aktueller Entwicklungsstand des somatischen Kerntransfers

Weltweite Schätzung, September 2009



Spezies	% lebensfähige Nachkommen	Geschätzte Anzahl geklonter Tiere
Rind	15-20	<4000
Schaf	8	<400
Ziege	3	<600
Schwein	2-5	~800
Katze	~1	~10
Maus	< 2	>250
Kaninchen	< 2	10-15
Maultier	<1	3
Pferd	<1	~20
Ratte	1	~10
Hund	1	~10
Wolf	1	2
Frettchen	1	2

# Effizienz des somatischen Kerntransfers bei Verwendung präovulatorischer peripubertaler Sauen als Empfänger und transgenen Spenderzellen

Anzahl der KT-Komplexe	Fusion	Transf. Embryonen	Trächtig Tag 25	Abferkung	Geb. Ferkel (Effiz.)
2243	1951 (87,0%)	1736 ( $\emptyset$ = 124)	11/14 (78,6%)	11 (100%)	<b>56</b> <b>(3,2%)</b>





# Unterschiede zwischen Nachkommen aus somatischem Kerntransfer



## ➤ Genetische Faktoren

- Unterschiedliche mitochondriale DNA der verschiedenen Empfängeroozyten
- Akkumulierte somatische Mutationen
- Variationen in den Telomeren

## ➤ Umweltbedingte Faktoren

- Extrazelluläre Umgebung
- Uterine Umgebung
- Postnale Umgebung
- Umwelteinflüsse

## ➤ Epigenetische Faktoren

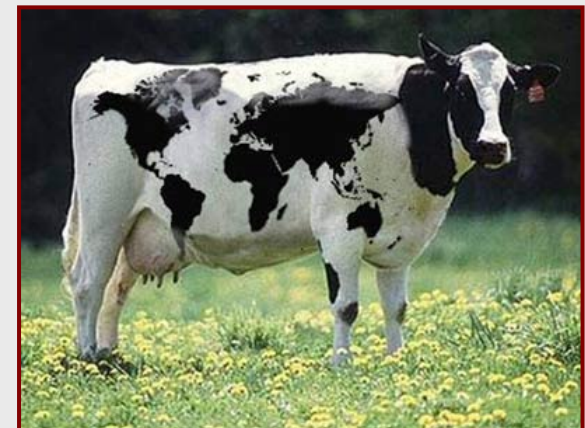
- Unterschiede im Imprinting
- Interaktionen der Spenderchromosomen mit Mikroumgebung der Empfängeroozyte



# Potentielle Probleme beim somatischen Klonen

- Zeit und Arbeits intensives Verfahren
- Relative Ineffizienz
- Nachkommen sind nicht vollständig identisch
- Telomere Verkürzungen; Vorzeitiges Altern ?
- Möglicher Verlust genetischer Variabilität
- Keine intakte Zona pellucida
- "Large offspring syndrome"

Klontiere weisen in der intrauterinen und neonatalen Phase eine höhere Mortalität auf, danach sind keine Unterschiede in der Vitalität zwischen Klontieren und konventionell produzierten Tieren festgestellt worden.



# Klontiere unterscheiden sich nicht von altersgleichen konventionell produzierten Tieren



- Zahlreiche biochemische Blut- und Urinparameter
- Immunstatus
- Körpermasse (Body score)
- Somatotrophe Achse
- Fortpflanzungsparameter
- Milchmenge
- Fleisch- und Milchzusammensetzung (~10,000 Datenpunkte)

Begrenzungen: gilt nur für bestimmte Spezies, Lebensdauer, wiederholtes Klonen?

# Produkte von geklonten Tieren und deren Nachkommen sind für den Verbraucher sicher



## Embryonale (somatische) Klone:

- Expert Committee der US-amerikanischen Academy of Science (2002)
- Expert Committee des japanischen Ministry for Agriculture, Forestry and Fisheries (2002)

## Somatische Klone:

- Dokument der FDA (2007/2008) (Rind, Schwein, Ziege)
- Dokument der EFSA (2008/2009) (Rind, Schwein)

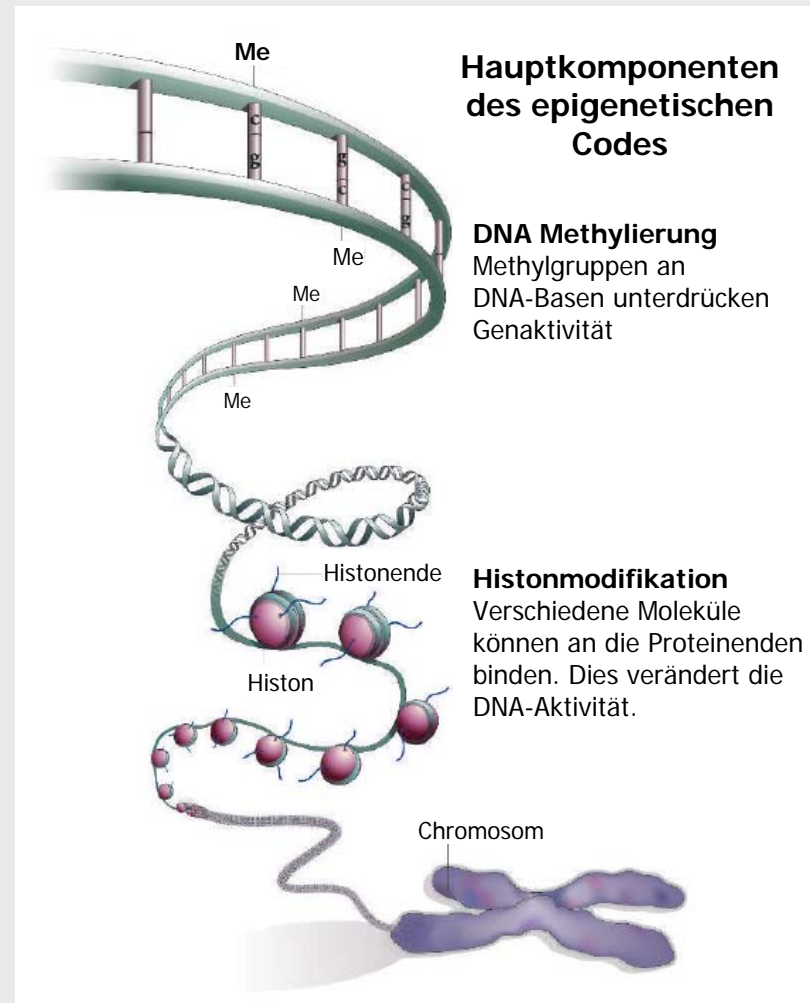
# Hauptfaktoren der epigenetischen Modulation der Genexpression: DNA-Methylierung und Histon-Modifikationen

## Weitere epigenetische Mechanismen:

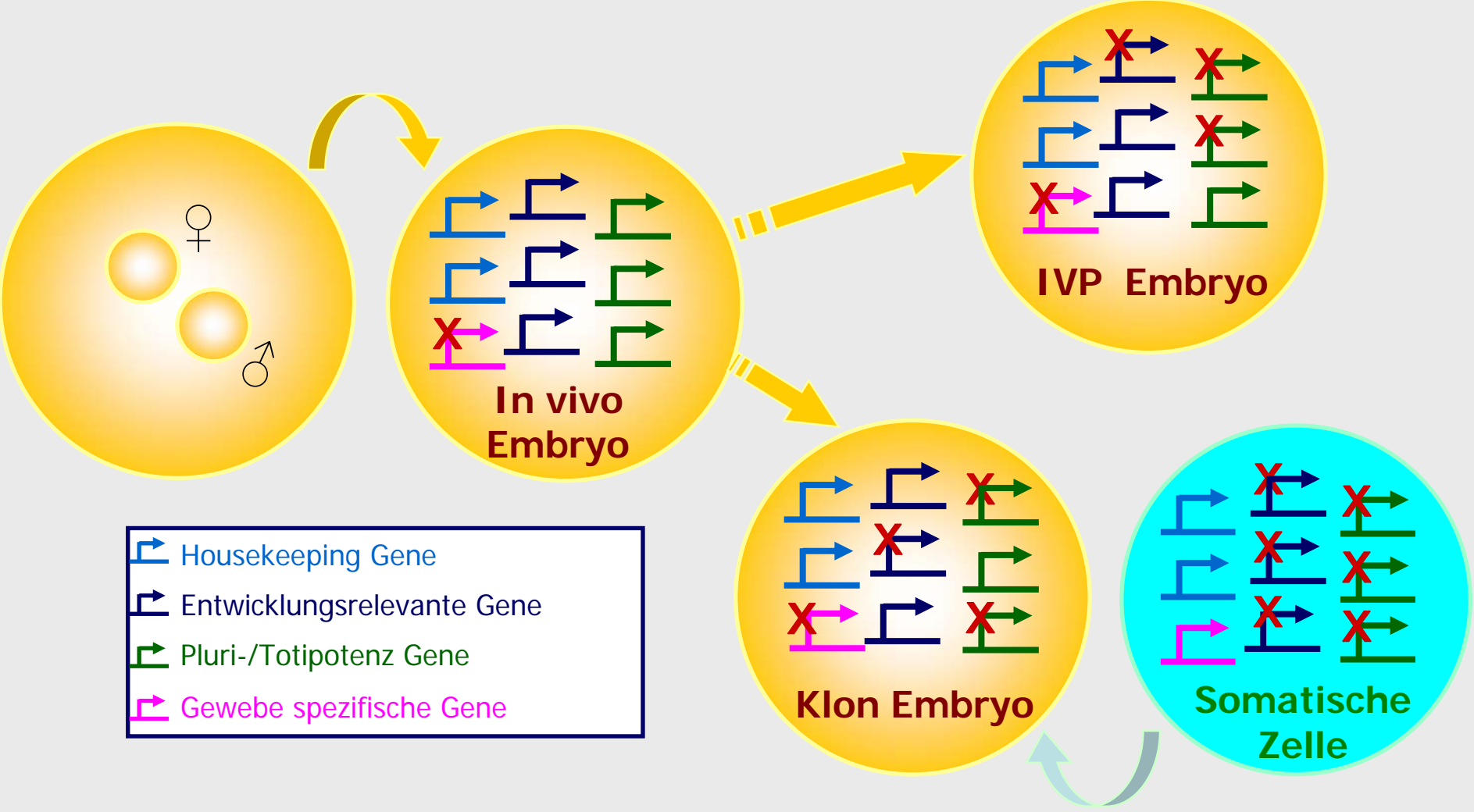
- Telomerenlänge
- X-Chromosom-Inaktivierung

## Gesamtheit der epigenetischen Mechanismen:

## Epigenom



# Epigenetische Reprogrammierung der Genexpression in IVP und geklonten Embryonen



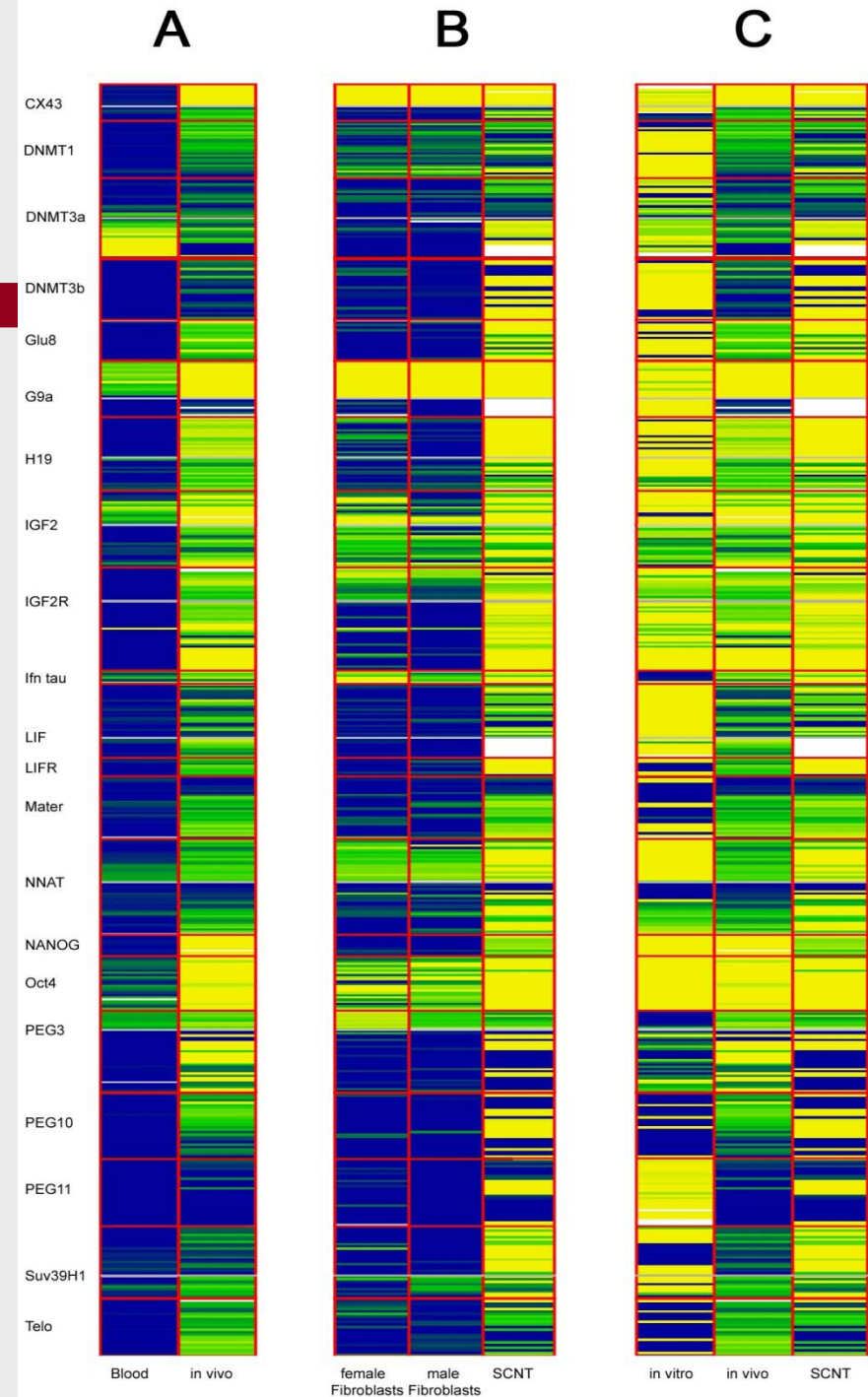


# Methylierungsanalyse bei bovinen Embryonen

A: Blut –  
In vivo Blastozysten

B: Fibroblasten –  
geklonte Blastozysten

C: IVP –  
In vivo-SCNT-Blastozysten



Guess how many kids  
I've got this year?  
14725 - not too bad,  
isn't it??!!



# Anwendungsperspektiven des somatischen Kerntransfers (=Klonen)

## Reproduktives Klonen

- ☺ Genetisch identische Mehrlinge
- ☺ Transgene Tiere (Transfektion, homolog. Rekombination)
- ☺ Krankheitsmodelle
- ☺ Erhaltung genetischer Ressourcen
- ☺ Tierzucht (Milch, Fleisch, etc.)

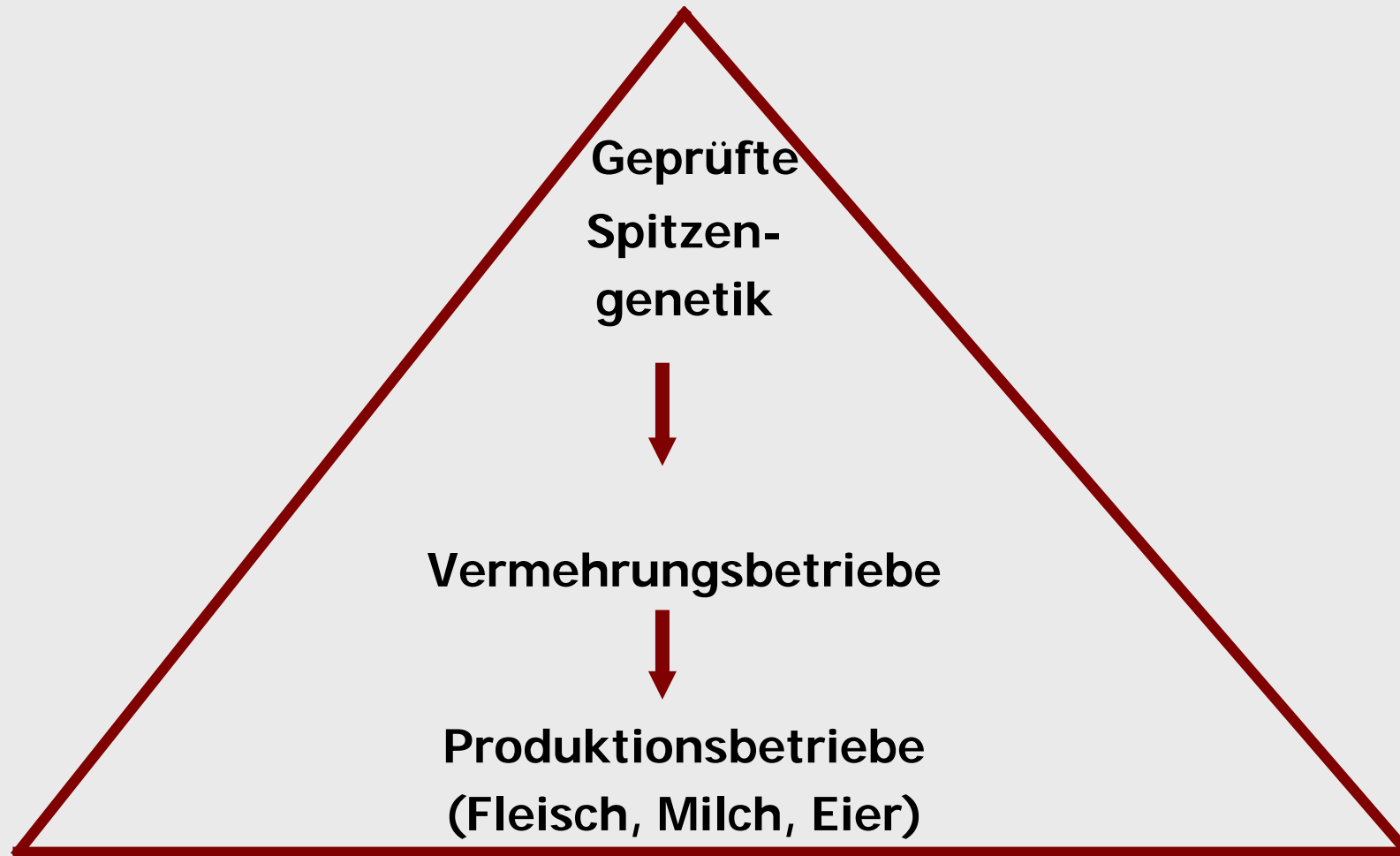
## Therapeutisches Klonen

- ☺ ES –Zellen
- ☺ Gerichtete Differenzierung
- ☺ Regenerative Zellen und Gewebe (homolog, heterolog)
- ☺ Tissue Engineering
- ☺ Biomedizin

## Grundlagenforschung

- ☺ Toti- und Pluripotenz
- ☺ Reprogrammierung
- ☺ De-Differenzierung
- ☺ Re-Differenzierung
- ☺ Alterung
- ☺ Tumorbildung
- ☺ Telomerenbiologie
- ☺ Viele andere Gebiete

# Grundstruktur der modernen, globalen Tierzucht



# Zuchtfirmen, die Klontechniken bei Nutztieren für die Nahrungsmittelproduktion anwenden

## Company

## Location

The list of companies is based on company contacts as well as internet searches. The industry dynamics in this sector are rapidly changing and this table should not be considered either definitive or fully up to date.

---

Viagen	Austin, TX, USA
Celentis	Auckland, New Zealand
Clone International	Melbourne, Australia
Cyagra/ <i>In vitro</i> Brazil/Goyaike	Elizabethtown, PA, USA/ Mogi Mirim, Brazil/Escoibar, Argentina
Yangling Keyuan Cloning	Yangling, China
Trans Ova Genetics	Sioux Center, IA, USA
Minitube USA	Verona, WI, USA

---

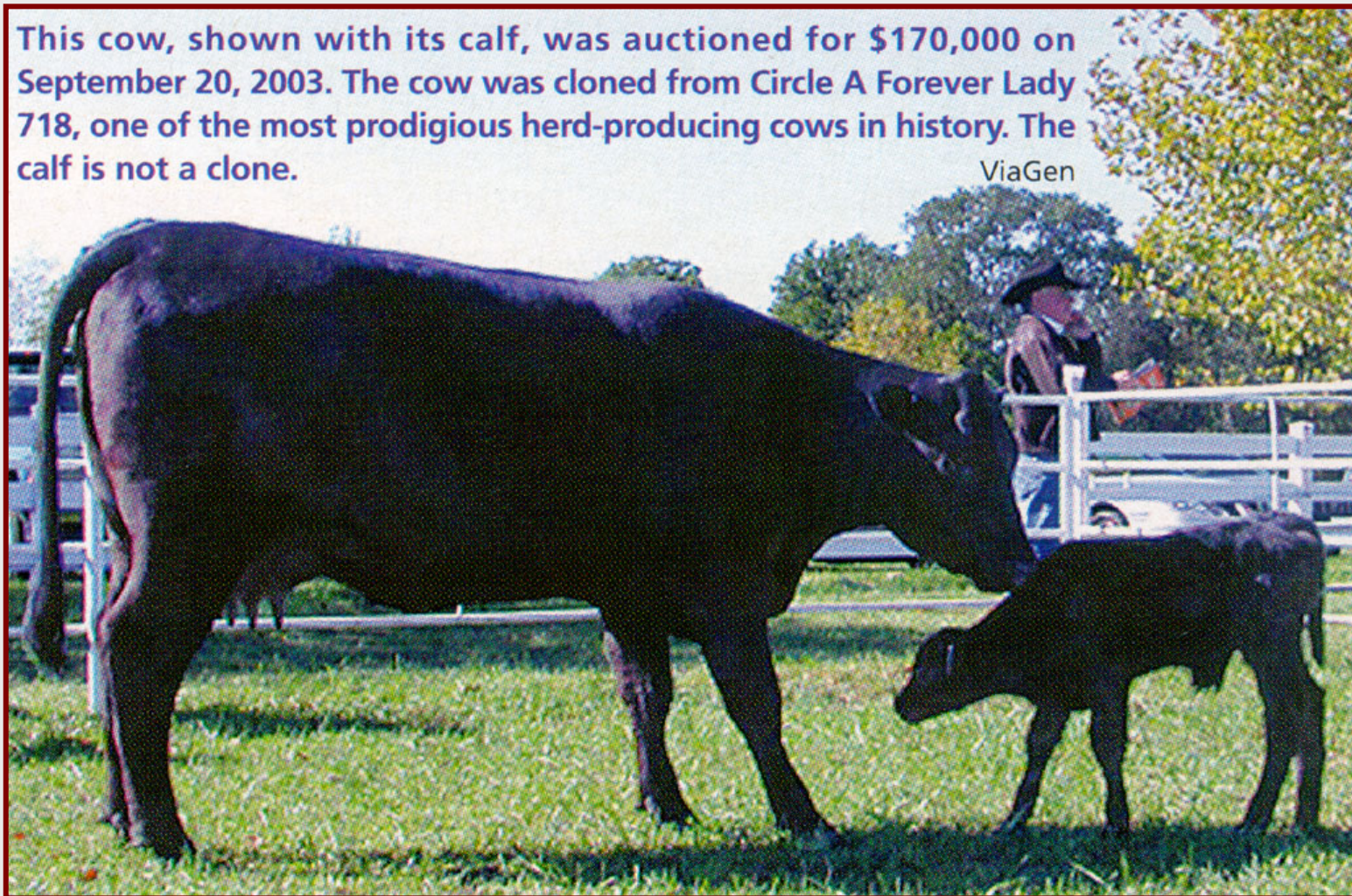
(Suk et al., Nature Biotechnology 25, 47-53, 2007)



# Kommerzielles Klonen beim Rind

This cow, shown with its calf, was auctioned for \$170,000 on September 20, 2003. The cow was cloned from Circle A Forever Lady 718, one of the most prodigious herd-producing cows in history. The calf is not a clone.

ViaGen



(Genetic Engineering News 23, 2003)



# Cryozootech: Kommerzielles Klonen von Pferden



**2003**  
à 6 ans, championne d'Allemagne  
et championne du monde  
de dressage , jeunes chevaux



POETIN 2, (Brandebourg) par SANDRO HIT et POESIE par BRENTANO



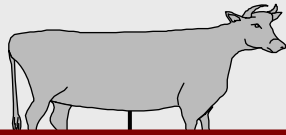
**2007**  
naissance du clone de Poetin



**CRYOZOOTECH**  
annonce la naissance  
du clone de la jument  
POETIN 2, jument de  
race Brandebourg,  
championne du monde  
de dressage en 2003,  
morte prématurément  
en 2005.  
CRYOZOOTECH entre  
ainsi dans le marché  
du dressage en  
utilisant le clonage des  
juments pour la  
sauvegarde génétique.



# Anwendung des somatischen Klonens für die Erhaltung tiergenetischer Ressourcen



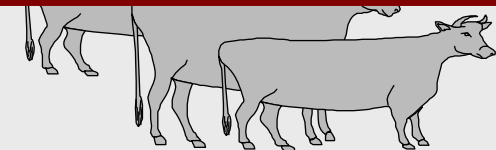
Spendertiere



Genomisches Fingerprinting

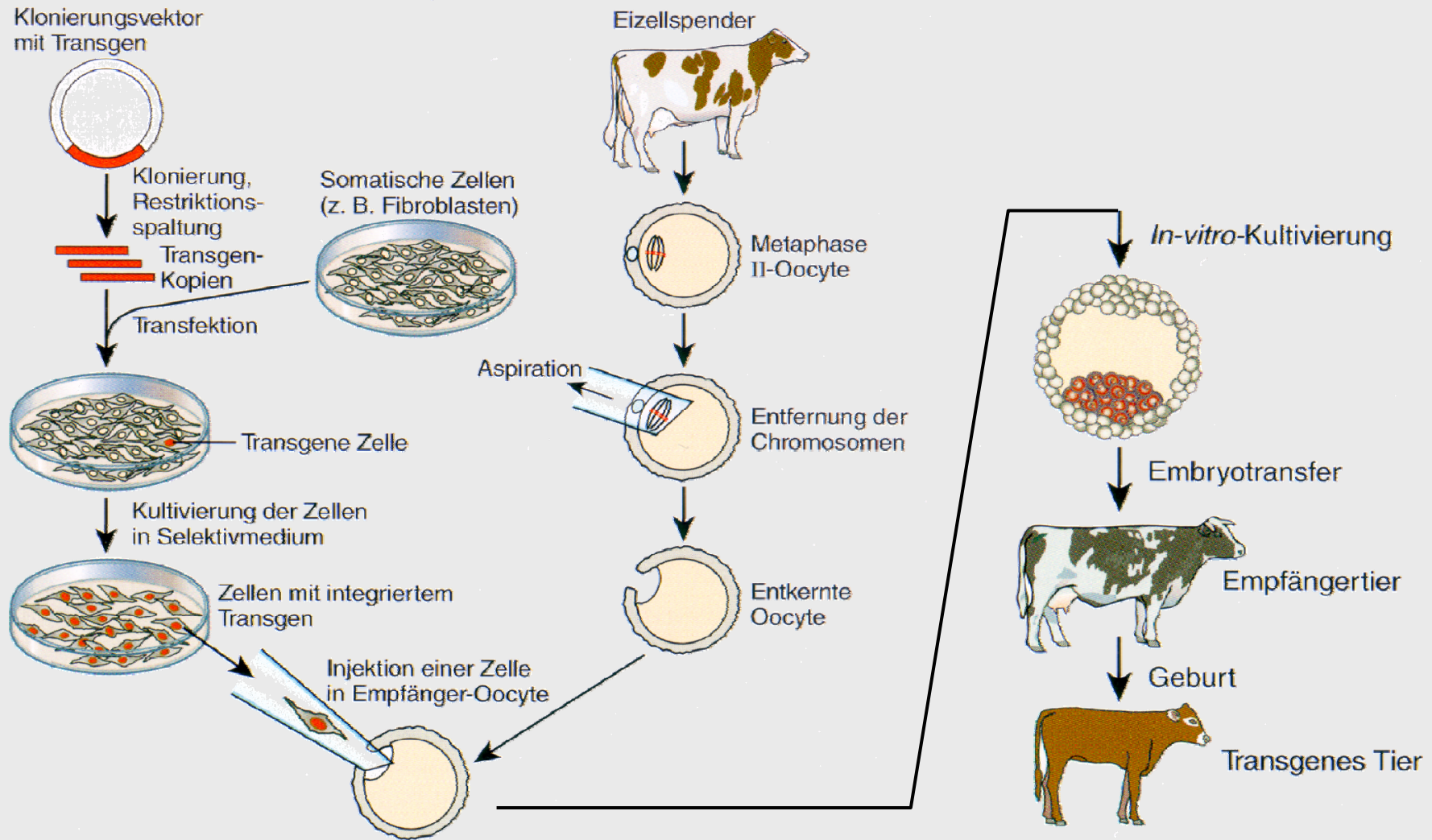
Allel Analyse

Sequenzierung

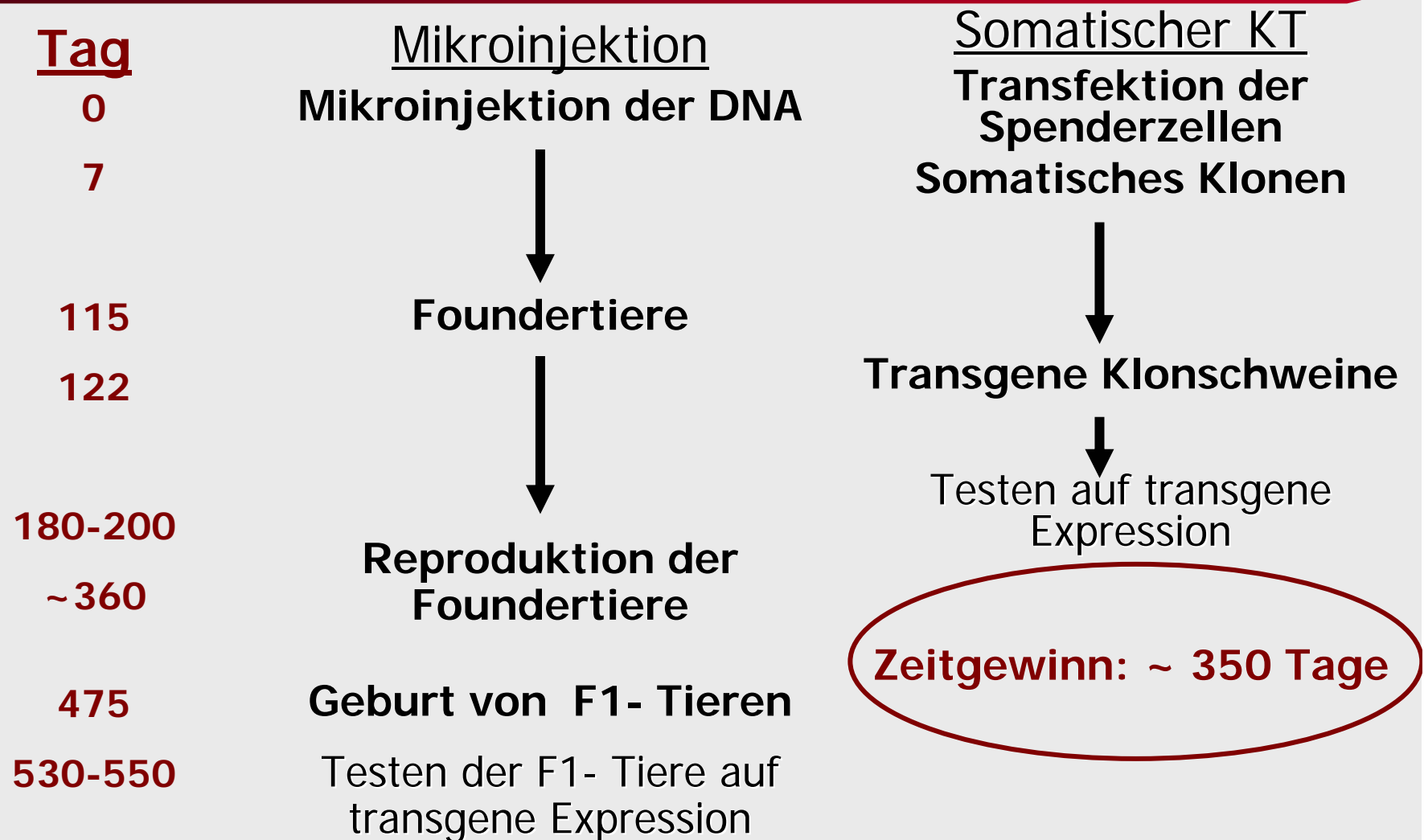




# Erstellung transgener Tiere mit Hilfe des somatischen Kerntransfers



# Zeitdauer der Produktion transgener Schweine durch Mikroinjektion oder somatischen Kerntransfer



# Anwendungsperspektiven für transgene Nutztiere



- **Landwirtschaftliche Perspektiven**

- Wachstum und Entwicklung

- Wollproduktion

- Laktation (Menge, Bestandteile)

- Krankheitsresistenz (Mx-Gen, IgA, BSE)

- Reproduktion

- Umweltverbesserungen

- Diätetische Verbesserungen

- **Biomedizinische Perspektiven**

- Gene Pharming

- Humaner Blutersatz

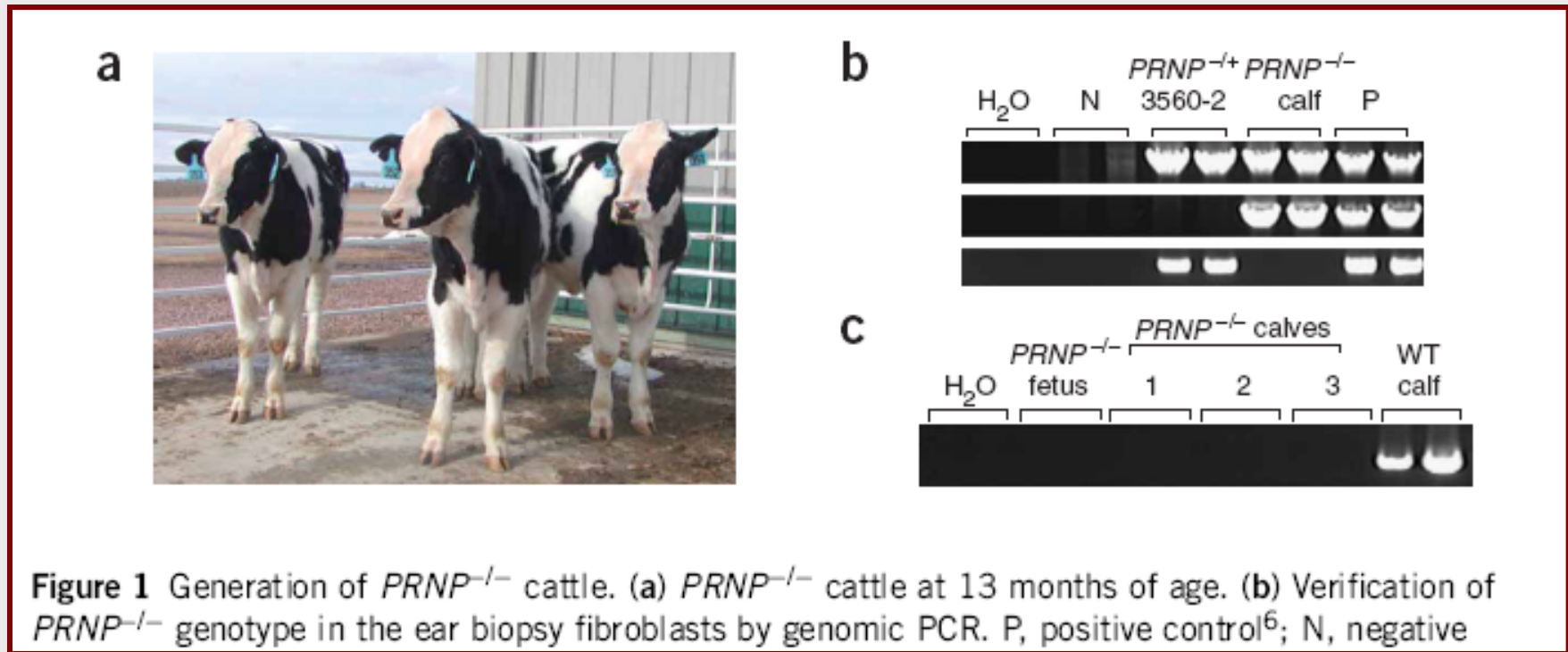
- Xenotransplantation

- Inhibitoren von Nervengasen (Biowaffen)

- Krankheitsmodelle

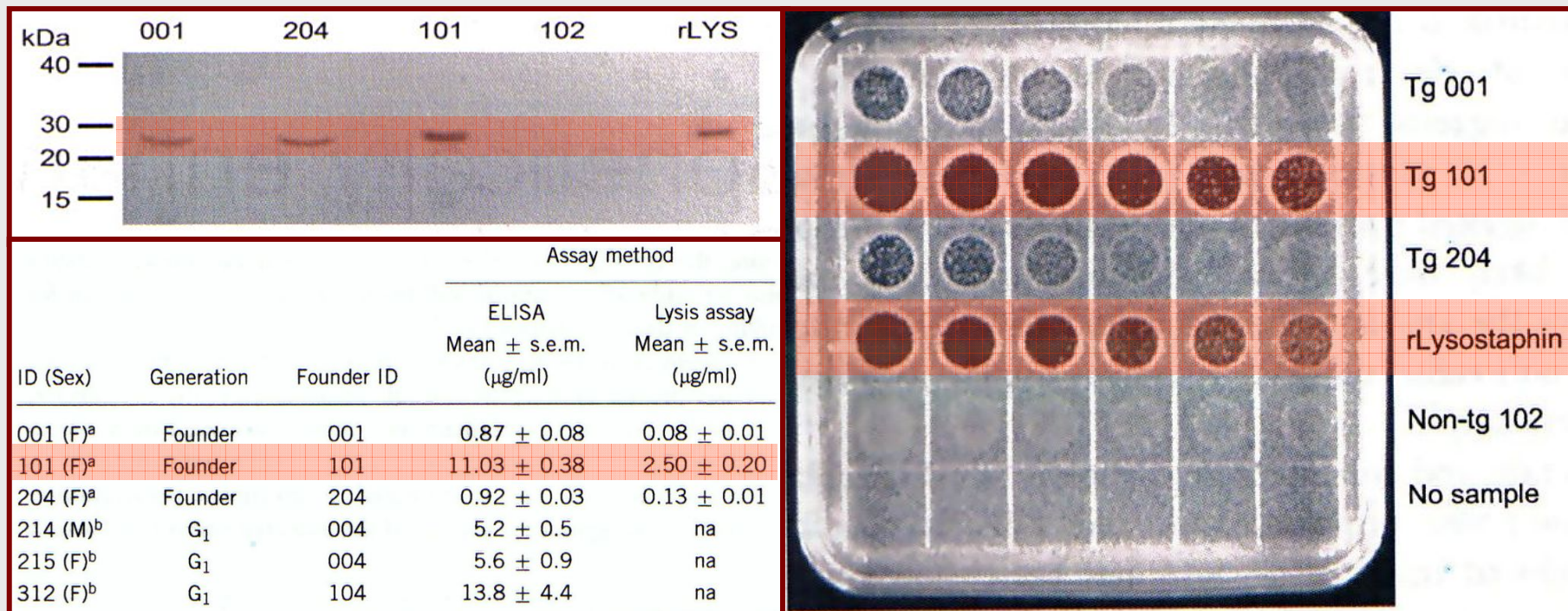
- **Grundlagenforschung**

# Geklonte Rinder mit Resistenz gegen BSE



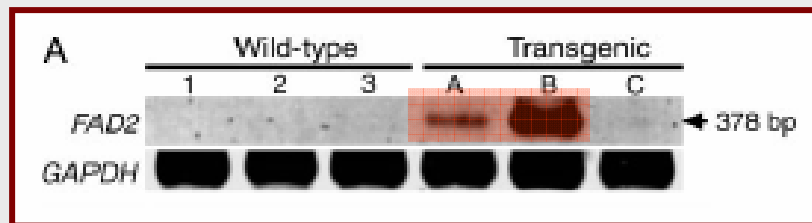


# Transgene Kühe mit Lysostaphin induzierter Resistenz der Milchdrüse gegenüber Infektionen mit *Staphylococcus aureus*



Resistance against *St. aureus* infusion: Tg: 18/21(85.3%)  
(infection only at high doses) vs. Non-tg 13/47 (31.7%)

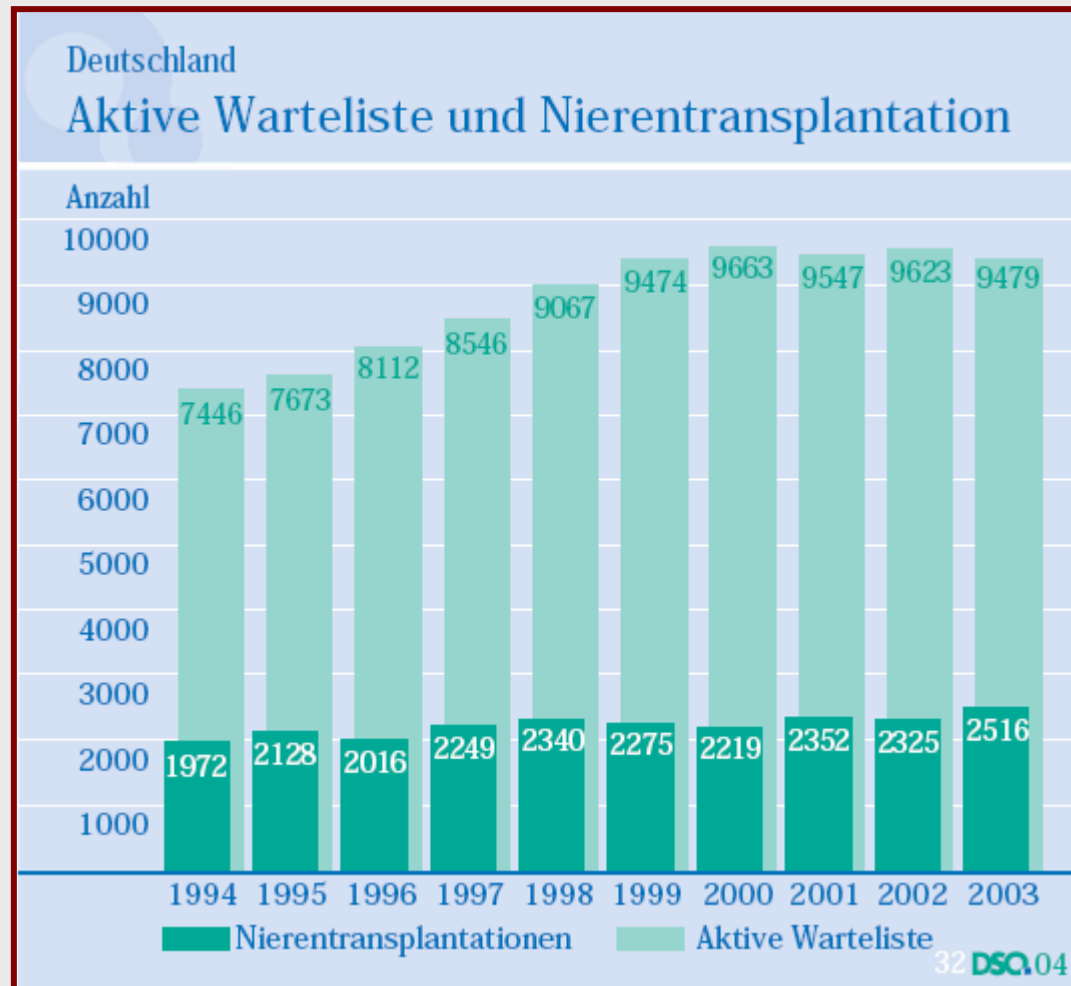
# Spinat Desaturase Expression in transgenen Schweinen



Expression in transgenen Schweinen zur Produktion von Fleisch mit einem erhöhten Anteil an vielfach ungesättigten Fettsäuren

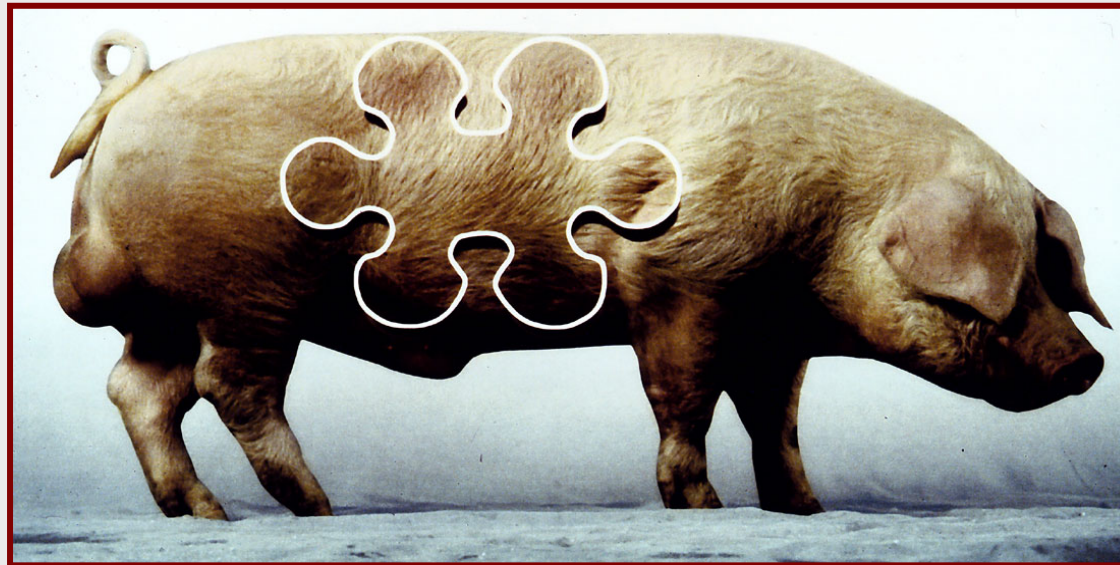
Mol % of total fatty acids	Wild-type	Transgenic
14:0	4.5 ± 1.2	3.5 ± 2.0
14:1	0	0
16:0	38.2 ± 1.3 <sup>a</sup>	26.6 ± 0.4 <sup>b</sup>
16:1	4.4 ± 0.7	6.1 ± 0.5
18:0	21.4 ± 1.8	22.0 ± 0.3
18:1	28.0 ± 0.1 <sup>a</sup>	18.8 ± 1.3 <sup>b</sup>
18:2n-6	1.9 ± 0.4 <sup>a</sup>	20.3 ± 2.1 <sup>b</sup>
18:3n-3	1.6 ± 0.6	2.7 ± 1.4
20:0	0	0
20:2	0	0
20:4n-6	0	0
20:5n-3	0	0
22:0	0	0
22:1	0	0
22:5n-3	0	0
22:6n-3	0	0
Sum of saturated plus Δ9 unsaturated	96.5 ± 0.3 <sup>a</sup>	77.1 ± 3.5 <sup>b</sup>
Sum of n-6 polyunsaturated	1.9 ± 0.4 <sup>a</sup>	20.3 ± 2.1 <sup>b</sup>
Sum of n-3 polyunsaturated	1.6 ± 0.6	2.7 ± 1.4
n-6/saturated plus Δ9 unsaturated	0.02 ± 0.04 <sup>a</sup>	0.27 ± 0.4 <sup>b</sup>
n-6/n-3	2.5 ± 1.7	5.6 ± 0.6

# Warteliste und Anzahl der Nierentransplantationen in Deutschland



Source: Deutsche Stiftung Organtransplantation 2005

# Das Schwein als potentielle Spenderspezies für humane Organe



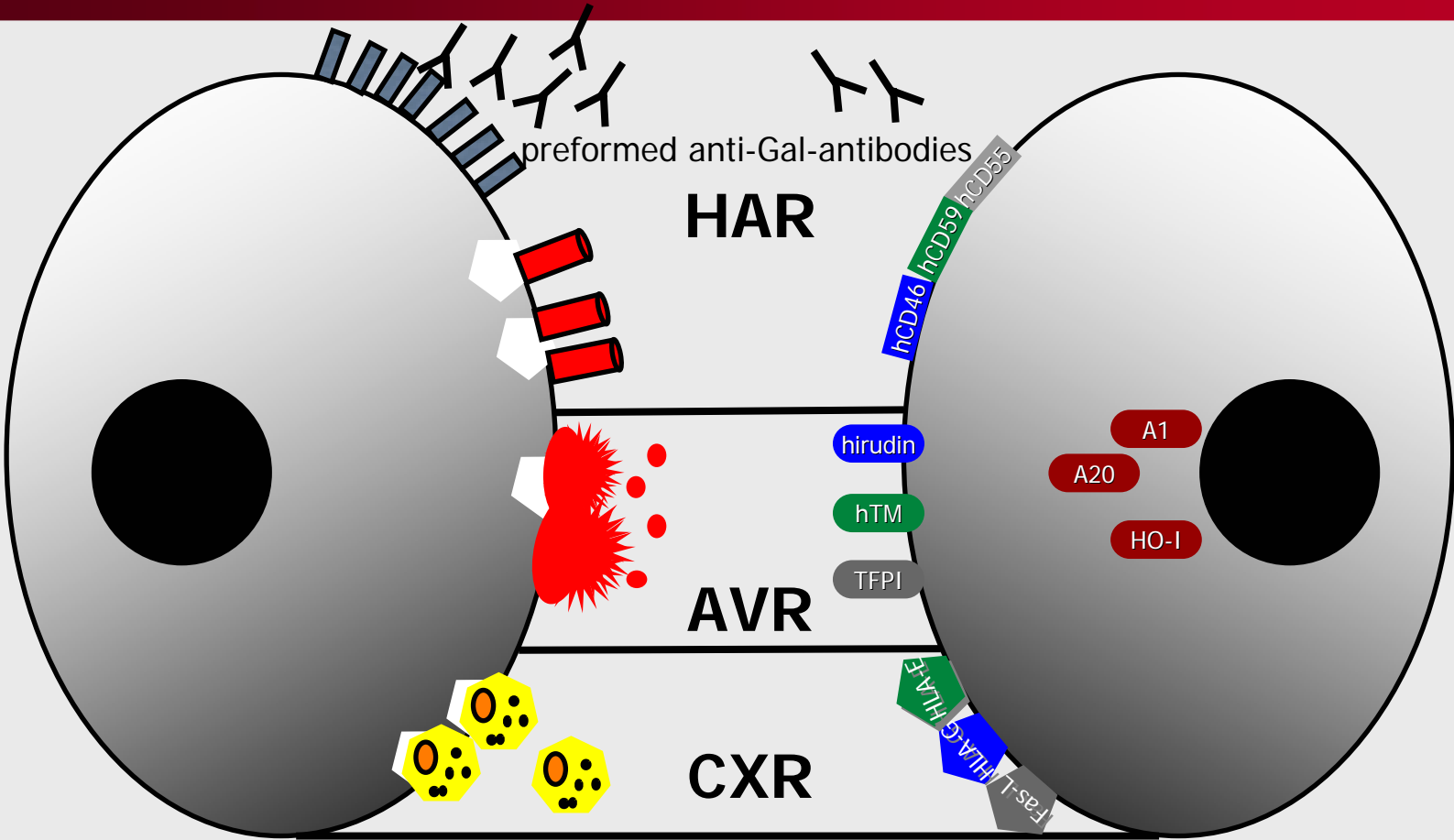
- Domestizierte Spezies
- Hohe Fertilität, viele Tiere
- Anatomie, Physiologie nicht zu verschieden vom Menschen
- Haltung unter strikten hygienischen Konditionen möglich
- Genetische Veränderungen möglich

I like pigs; dogs look up to us,  
cats look down to us, pigs  
treat us as equal.

*(Winston Churchill)*

# Endothel der normalen Schweinegefäße

# Genetisch verändertes Endothel der Schweinegefäße ( $\alpha 1,3\text{Gal-KO}$ )



▮ =  $\alpha$  Gal-epitopes

🔴 = Thrombus

▮ = Membrane attack complex (MAC)

🟡 = Natural Killer Cells

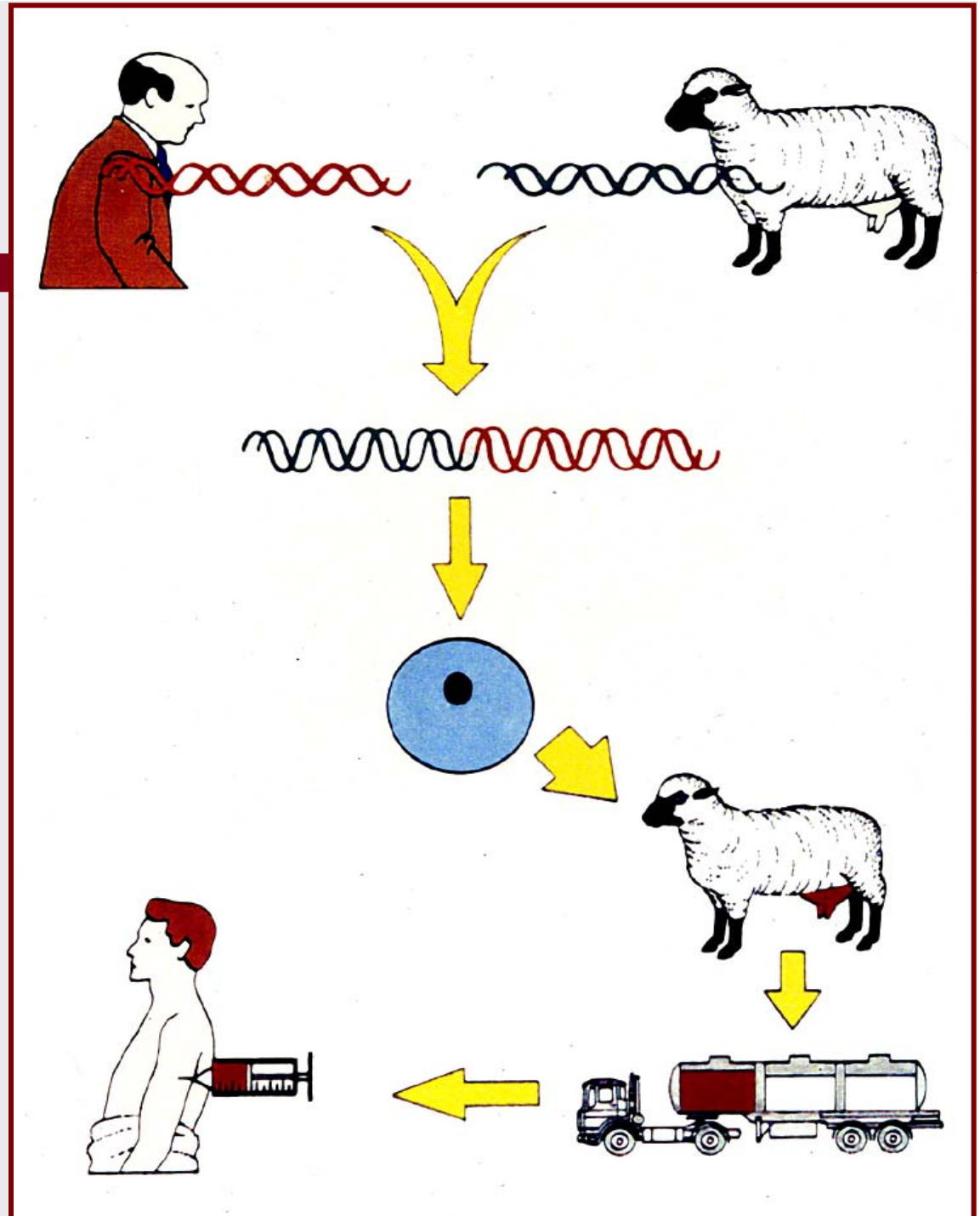


# Erste dreifach transgene (hCD59/hDAF/hTM) Schweine, geb. 11. August 2005





# Gene Pharming



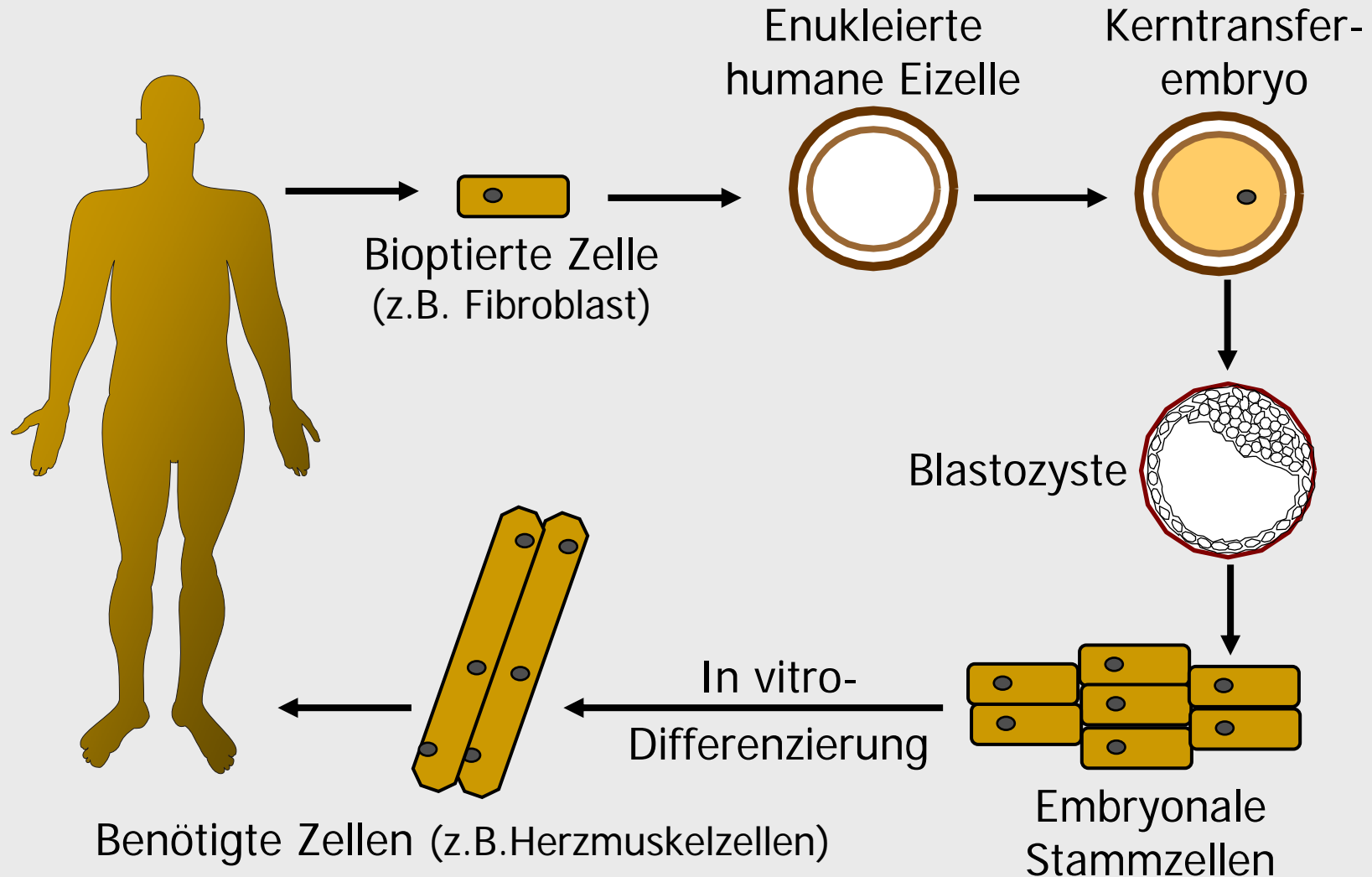
# ATryn<sup>®</sup>: das erste zugelassene rekombinante Medikament (humanes Antithrombin III) aus der Milchdrüse transgener Ziegen

**Indikation:**  
Prophylaktische  
Behandlung genetisch  
bedingter Antithrombin  
Defizienz im Rahmen  
einer eines chirurgischen  
Eingriffs



FRAMINGHAM, MA – June 2, 2006 - GTC Biotherapeutics, Inc. ("GTC", Nasdaq: GTCB) announced today that the Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP) of the European Medicines Agency (EMA) has adopted a positive opinion on the market authorization application (MAA) for ATryn<sup>®</sup>, GTC's recombinant form of human antithrombin.

# Therapeutisches Klonen



## ARTICLES

# *In vitro* reprogramming of fibroblasts into a pluripotent ES-cell-like state

Marius Wernig<sup>1\*</sup>, Alexander Meissner<sup>1\*</sup>, Ruth Foreman<sup>1,2\*</sup>, Tobias Brambrink<sup>1\*</sup>, Manching Ku<sup>3\*</sup>, Konrad Hochedlinger<sup>1,†</sup>, Bradley E. Bernstein<sup>3,4,5</sup> & Rudolf Jaenisch<sup>1,2</sup>

Nuclear transplantation can reprogramme a somatic genome back into an embryonic epigenetic state, and the

nt embryonic stem cells. One potential use of the m (ES) cells for patient-specific cell treatment, but of this technology. Reprogramming of fibroblasts to e four transcription factors Oct4 (also called Oct3/ on, gene expression and chromatin state of such ly, the cells—derived from mouse fibroblasts—can ve late-term embryos when injected into tetraploid state of *in-vitro*-reprogrammed induced pluripotent

## ARTICLES

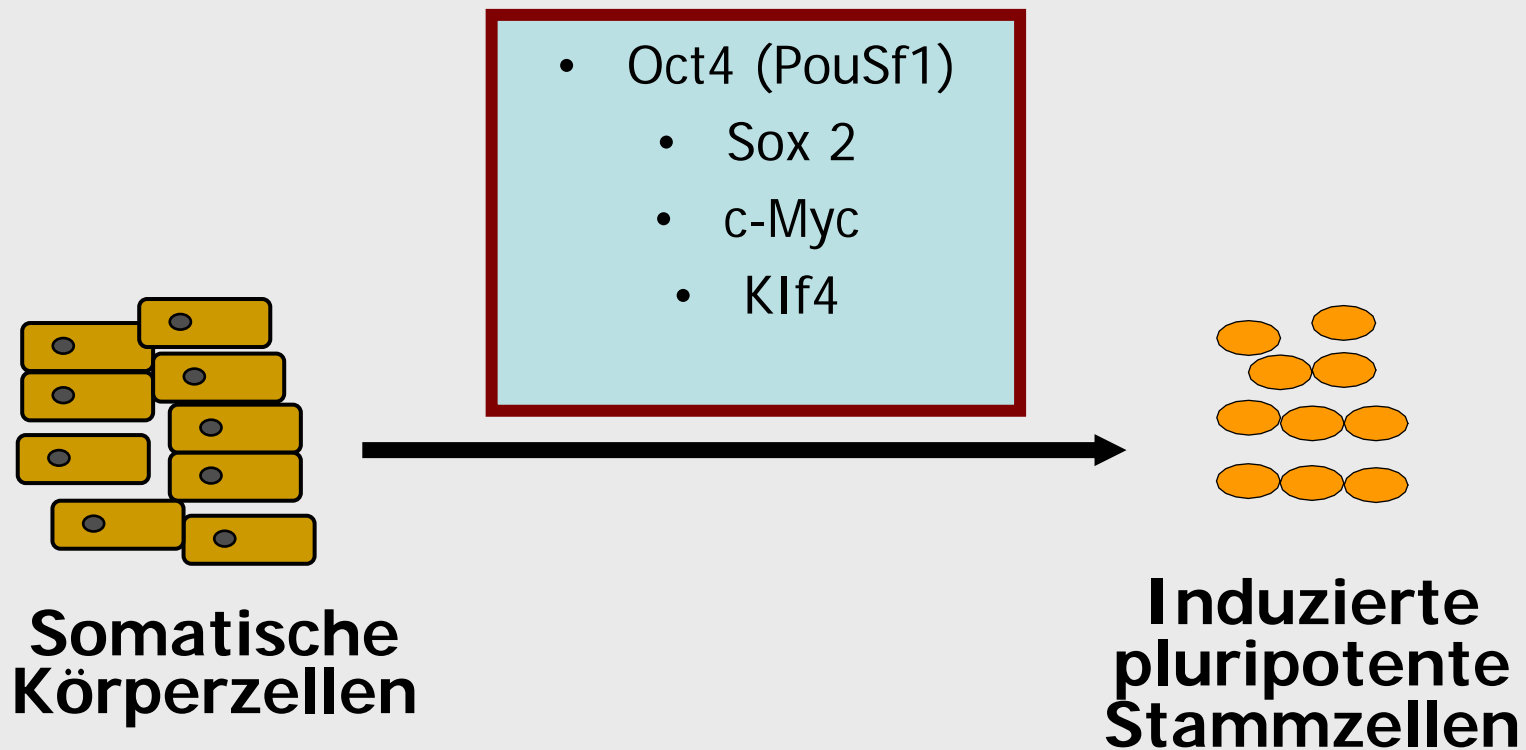
# Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells

Keisuke Okita<sup>1</sup>, Tomoko Ichisaka<sup>1,2</sup> & Shinya Yamanaka<sup>1,2</sup>

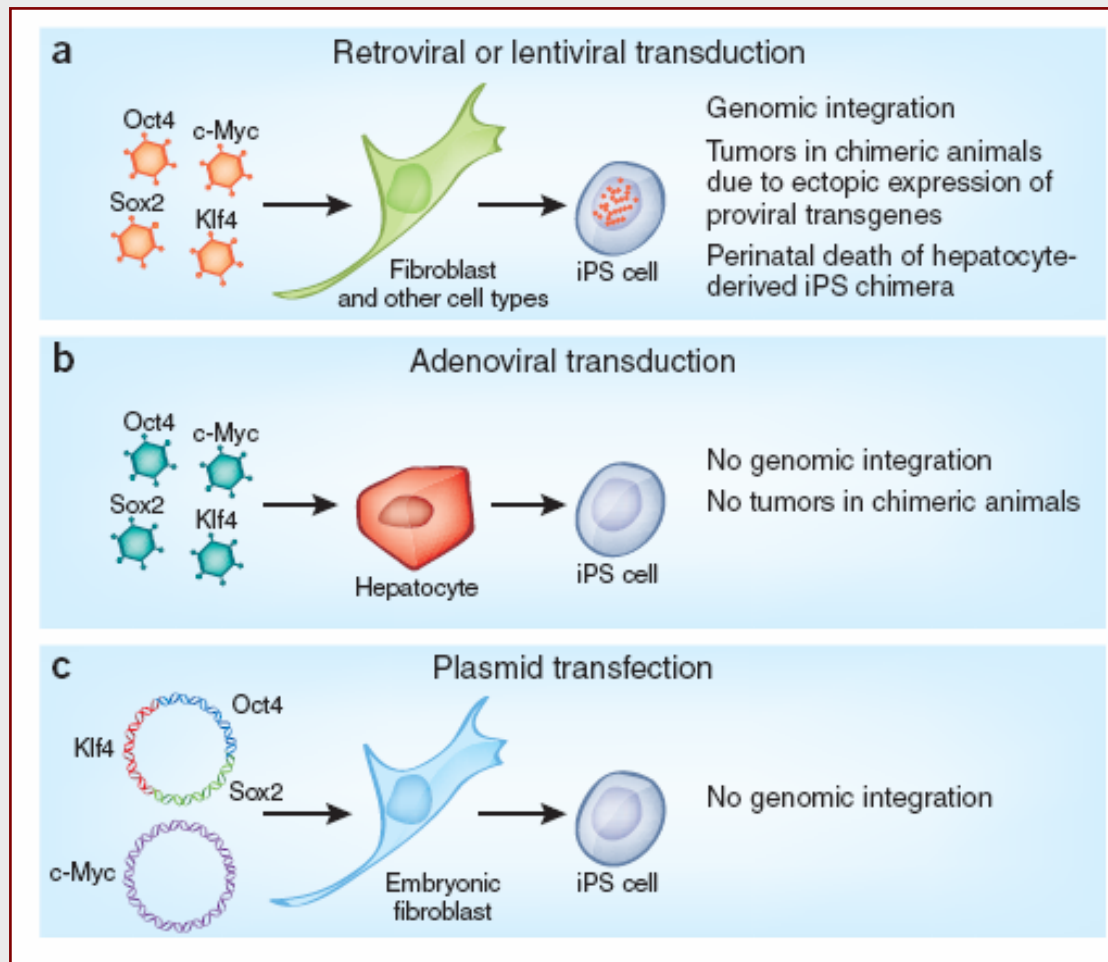
We have previously shown that pluripotent stem cells can be induced from mouse fibroblasts by retroviral introduction of Oct3/4 (also called Pou5f1), Sox2, c-Myc and Klf4, and subsequent selection for *Fbx15* (also called *Fbxo15*) expression. These induced pluripotent stem (iPS) cells (hereafter called *Fbx15* iPS cells) are similar to embryonic stem (ES) cells in morphology, proliferation and teratoma formation; however, they are different with regards to gene expression and DNA methylation patterns, and fail to produce adult chimaeras. Here we show that selection for *Nanog* expression results in germline-competent iPS cells with increased ES-cell-like gene expression and DNA methylation patterns compared with *Fbx15* iPS cells. The four transgenes (*Oct3/4*, *Sox2*, *c-myc* and *Klf4*) were strongly silenced in *Nanog* iPS cells. We obtained adult chimaeras from seven *Nanog* iPS cell clones, with one clone being transmitted through the germ line to the next generation. Approximately 20% of the offspring developed tumours attributable to reactivation of the *c-myc* transgene. Thus, iPS cells competent for germline chimaeras can be obtained from fibroblasts, but retroviral introduction of c-Myc should be avoided for clinical application.

published *Nature* online  
ahead of press,  
June 7<sup>th</sup>, 2007

# Erzeugung pluripotenter Stammzellen durch Überexpression von 4 Schlüsselgenen



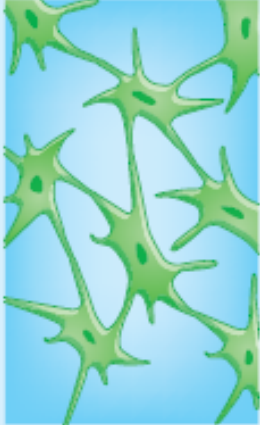
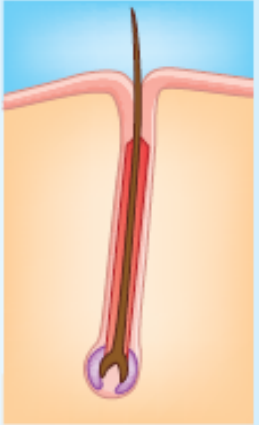
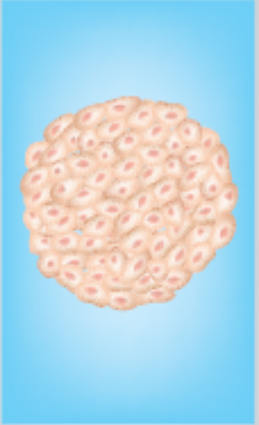
# Methodologische Ansätze zur Produktion von iPS Zellen



Lowry and Plath; Nature Biotechnology 26, 1246-1248, 2008



# Ableitung von iPS Zellen von humanen Keratinozyten

	Human fibroblasts	Human keratinocytes	Mouse neural progenitors
			
Endogenous gene expression	KLF4: low OCT4: no SOX2: no C-MYC: low	KLF4: hi OCT4: no SOX2: no C-MYC: hi	Klf4: low Oct4: no Sox2: yes c-Myc: hi
Efficiency of iPS generation with four factors	0.01%	1%	3.6%
Minimal factors for reprogramming	OCT4 KLF4 SOX2	OCT4 KLF4 SOX2	Oct4 Klf4 or c-Myc

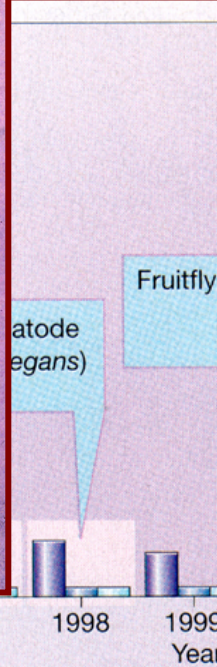
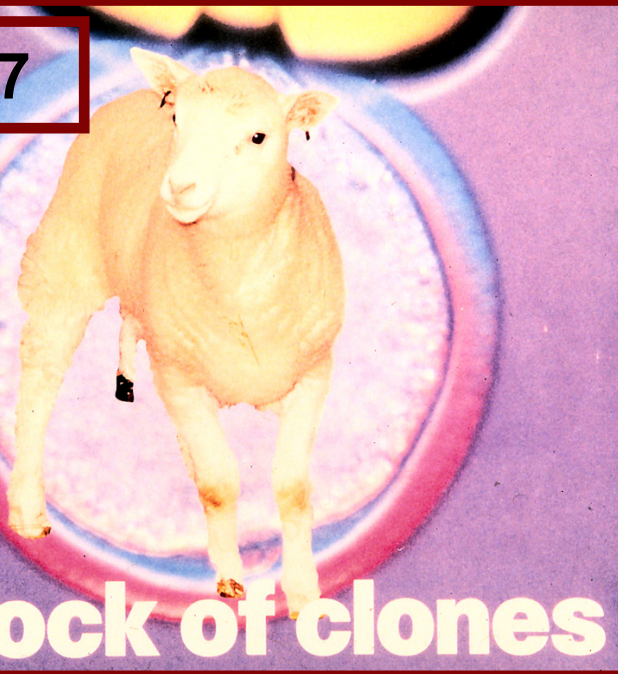
Kalte PIs-Vicari

Gadue and  
Cotsarelis; Nature  
Biotechnology 26,  
1243-1244, 2008

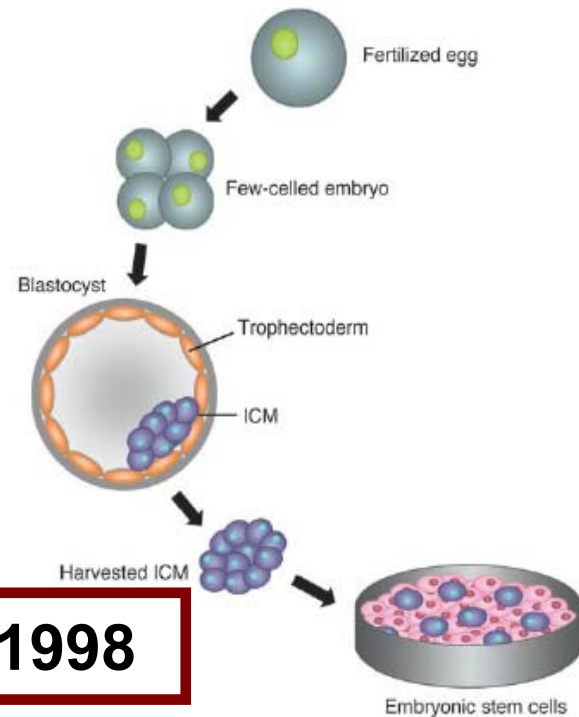
# Ein neues Zeitalter der Biologie: Genomik, Epigenetische Reprogrammierung und Plastizität in der Entwicklung

1997

**A flock of clones**



1998



Comparative success: the rising number of sequenced genomes is bringing evolutionary insights.

(Nature 426, 2003)

2004: drafts of the bovine and chicken genomic map;  
2006: dog, bee; 2007: horse


2009: bovine and porcine genome (expected)

# Entwicklung der Tierzucht



- Domestikation
- Vermehrung „nützlicher“ Populationen
- Auslese nach Exterieur
- Auslese nach spezieller Eignung
- Züchtung (Populationsgenetik, Statistik)
- Reproduktionstechnologien (KB, ET, etc)
- **Molekulargenetik (Sequenzen, SNPs, etc)**
- **Somatisches Klonen und transgene Tiere**

# Teilgebiete der Regenerativen Medizin

- 
- Künstliche Organe
  - Xenotransplantate (Solide Organe)
    - Autologe Zellen und Gewebe
    - Allogene Zellen und Gewebe
    - Xenogene Zellen und Gewebe
  - Tissue Engineering



# Vielen Dank für Ihre Aufmerksamkeit

