
Somatischer Kerntransfer und zelluläre Therapien: Möglichkeiten zum Gendoping im Spitzensport

Heiner Niemann

Der Begriff Klon stammt aus dem griechischen „klonos“ und bedeutet Ast oder Zweig. Heute wird unter einem Klon eine Gruppe genetisch identischer Individuen verstanden, die asexuell von einem Elterorganismus abstammen. Dabei handelt sich im wesentlichen um den somatischen Kerntransfer, in dem das haploide genetische Material einer unbefruchteten Eizelle durch den diploiden Kern einer somatischen Zelle aus fetalem oder adultem Gewebe ersetzt wird. Die daraus entstehenden geklonten Nachkommen können sich aber in einer Vielzahl von Eigenschaften unterscheiden, da die beiden Zytoplasmen unterschiedliche maternale Proteine, RNAs und Mitochondrien aufweisen. Zusätzlich können epigenetische Effekte und Auswirkungen von Seiten der fetalen und/oder neonatalen Umwelt zu unterschiedlichen phänotypischen Ausprägungen von Kloneschwistern beitragen. Die technische Durchführung des Kerntransfers beim Säuger ist schon seit den frühen 80er Jahren bekannt, wobei embryonale Zellen verwendet wurden. Dabei nahm man an, dass die Spenderzelle einem möglichst frühen Embryonalstadium entstammen muss, um erfolgreich reprogrammiert werden zu können. Dieses Dogma fiel mit der Geburt von Dolly, dem ersten geklonten Schaf im Jahre 1996.

1 Durchführung und aktuelle Erfolgsraten des somatischen Kerntransfers

Der somatische Kerntransfer beinhaltet die Enukleation (Entfernung des genetischen Materials aus der Empfängereizelle), die Übertragung der Spenderzelle und deren Fusion mit der Empfängereizelle, gefolgt von der Aktivierung des rekonstituierten Embryos und dessen In vitro-Kultur bis zu einem übertragungsfähigen Stadium (Abbildung 1a,b). Die Enukleation wird meistens durch Heraussaugen eines kleinen Teils des Cytoplasmas der Oozyte, das die maternalen Chromosomen enthält, erreicht. Um eine Schädigung der Oozyte zu vermeiden, wird sie mit einem Zytoskelettinhibitor inkubiert, was ein leichtes Heraussaugen des Plasmas ermöglicht. Die Abwesenheit des haploiden Chromosomensatzes kann durch DNA-spezifische Fluoreszenz innerhalb der Enukleationspipette überprüft werden. Im zweiten Schritt wird eine einzelne Spenderzelle unterhalb der Zona pellucida so eng wie möglich an die Membran des Zytoplasmas eingesetzt. Beide Komponenten werden dann durch kurze, aber hohe elektrische Pulse miteinander fusioniert. Bei der Maus ist dieses Fusionsverfahren nicht erfolgreich gewesen, deshalb wird bei dieser Spezies der isolierte Spenderzellkern mit Hilfe einer scharfen Nadel in das Oozytenplasma injiziert. Die rekonstituierten Embryonen werden durch elektrische Pulse oder bestimmte chemische Substanzen, die den Kalziumstrom und/oder den Zellzyklus beeinflussen,

aktiviert, bevor sie in ein geeignetes Kulturmedium überführt werden und bis zu einem transfertauglichen Stadium, beim Rind z.B. für acht Tage bis zur Blastozyste in vitro kultiviert werden.

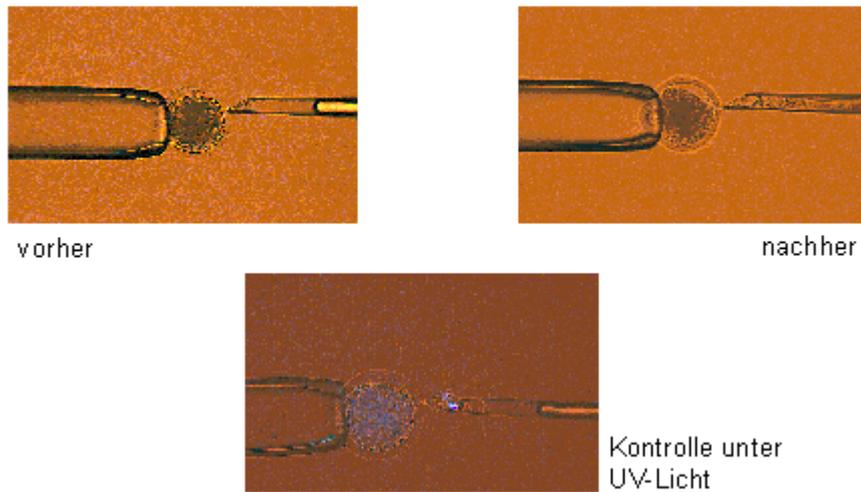


Abb. 1a: Enukleation einer Empfängeroozyte

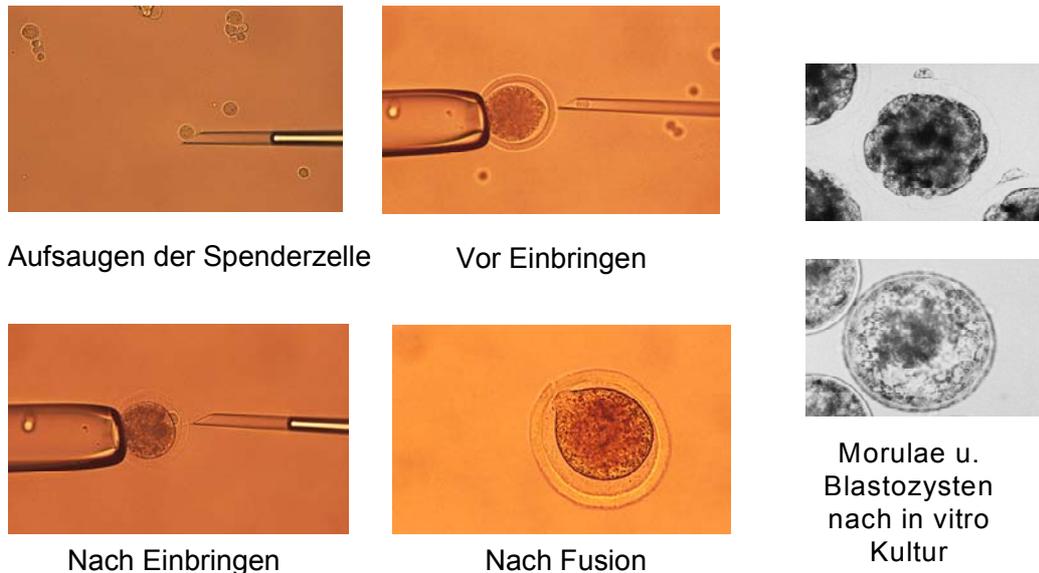


Abb. 1b: Transfer einer Spenderzelle in eine enukleierte Oozyte und nachfolgende Embryonalentwicklung bis zur Blastozyste

In den letzten Jahren sind eine Vielzahl von adulten Zellen (Kumulus, Haut, Granulosa, Lunge, Leber, Milchdrüse, Muskel, Sertoli, Uterus, Leukozyten) erfolgreich im Kerntransfer mit der Geburt vitaler Klone bei verschiedenen Spezies verwendet worden (Tabelle 1). Die Gesamterfolgsraten sind aber noch gering und im Durchschnitt zeigen nicht mehr als 2-5% der geklonten Embryonen eine Weiterentwicklung bis zu Nachkommen. Die postnatale Entwicklung ist häufig gestört und bis zu 50% der lebend geborenen Nachkommen können kurz nach der Geburt sterben. Als Ursachen werden eine unvollständige Reprogrammierung des Spenderzellkerns, Störungen beim Imprinting und aberrante Genexpressionsmuster in frühembryonalen Stadien und Feten gesehen. Diese Abnormalitäten werden auch unter dem Begriff „Large Offspring Syndrome“ zusammengefasst, da die Übergröße der Nachkommen eines der bekanntesten Merkmale ist. Weltweit wird in vielen Labors intensiv an der Aufklärung dieses Phänomens gearbeitet.

Tab. 1: Aktuelle Erfolgsraten des somatischen Kerntransfers beim Säuger

Spezies	% Nachkommen	Gesamtzahl geklonter Tiere*
Rind	15-20	<1200
Schaf	8	<200
Ziege	3	<200
Schwein	<1	<200
Katze	<1	1
Maus	<2	<250
Kaninchen	<2	6

* Weltweite Schätzung vom Juni 2002

Durch somatischen Kerntransfer kann die Generierung transgener (d.h. genetisch veränderter) Nachkommen im Vergleich zur Mikroinjektionstechnik deutlich verbessert werden. Bei der Transfektion werden die Spenderzellen mit dem gewünschten Genkonstrukt inkubiert und nur solche, die es integriert haben und optimal exprimieren, werden im Kerntransfer verwendet. Durch homologe Rekombinationstechnik können auch Spenderzellen mit einer gezielten genetischen Veränderung im Kerntransfer eingesetzt werden, was kürzlich erstmalig für primäre Zellen bei Schaf und Schwein gelungen ist. Bisher war diese Technologie lediglich bei der Maus unter Verwendung von embryonalen Stammzellen, als permanenten Zelllinien, erfolgreich gewesen.

2 Therapeutisches Klonen und embryonale Stammzellen

Neben dem reproduktiven Klonen, was besonders in der Tierzucht interessante neue Perspektiven eröffnet, könnte das therapeutische Klonen in der Humanmedizin zukünftig eine bedeutende Rolle spielen. Humane embryonale Stammzellen können in einem undifferenzierten Zustand gehalten werden und unter geeigneten Bedingungen in jeden spezifischen Zelltyp differenzieren. Dies hat weltweit ein großes Interesse an der Nutzung solcher Zellen für die Transplantation hervorgerufen, um degenerative Erkrankungen oder defiziente Zellen mit essentieller Funktion zu ersetzen. Im Maus-Modell ist gezeigt worden, dass die bereits seit vielen Jahren vorhandenen ES-Zellen in funktionale Muskelzellen, Kardiomyozyten, neuronale Zellen und Pankreaszellen differenzieren können. Die Entwicklung ist insbesondere für neuronale Zellen relativ weit vorangeschritten. Im Tiermodell ist gezeigt worden, dass solche neuronalen Zellen aus ES-Zellen in einem Parkinson-Ratten-Modell die Symptome dieser Krankheit deutlich mildern konnten. Es ist bisher noch nicht bekannt, ob diese von ES-Zellen abstammenden therapeutischen Zellen universell eingesetzt werden können. Normalerweise ist in einem solchen Fall mit einer immunogenen Antwort zu rechnen, was eine permanente immunsuppressive Behandlung des Patienten erforderlich macht. Dieses Problem könnte durch das therapeutische Klonen überwunden werden, indem die Patienten mit therapeutischen Zellen, die aus eigenen ES-Zellen abgeleitet wurden, behandelt werden (Abbildung 2). Das Verfahren beinhaltet den Transfer einer somatischen Zelle des erkrankten oder verletzten Patienten in eine gereifte enukleierete Oozyte, um Blastozysten zu erstellen, bei denen dann die innere Zellmasse, d.h. der Anteil, aus dem der Fetus entsteht, von den übrigen Zellen abgetrennt wird. Aus der inneren Zellmasse werden ES-Zellen abgeleitet und diese dann unter geeigneten Bedingungen in die gewünschten Zelltypen differenziert.

Obwohl die Perspektiven für das therapeutische Klonen äußerst vielversprechend erscheinen, sind eine Reihe von großen Schwierigkeiten zu überwinden, bevor es möglicherweise zu einer Anwendung bei Patienten kommen könnte. Aufgrund der gegenwärtigen noch sehr niedrigen Effizienz des Kerntransfers würden sehr viele humane Oozyten für die Produktion geklonter Embryonen benötigt. Es ist fraglich, ob ausreichende Zahlen an humanen Oozyten bereitgestellt werden können. Ein Transspezies-Kerntransfer erscheint wenig vielversprechend, da durch die unterschiedlichen Mitochondrienpopulationen Entwicklungsstörungen auftreten könnten. Ferner ist die Aufreinigung der differenzierten Zellen aus der Population mit den undifferenzierten ES-Zellen sehr schwierig. Eine Anwesenheit undifferenzierter Stammzellen könnte aber leicht in der Bildung von Tumoren resultieren. Auch die ethischen Probleme mit der Schaffung eines humanen Embryos stehen der Entwicklung dieser Technologie z.Zt. in vielen Ländern entgegen. Inwieweit adulte Stammzellen als Quelle für therapeutische Zellen in Frage kommen können, ist derzeit offen.

3 Szenario für mögliche genetische Modifikationen beim humanen Gen-Doping

Das therapeutische Klonen könnte potentiell auch zum „Gen-Doping“ im Spitzensport eingesetzt werden. Erforderlich wäre dafür die temporäre und gewebespezifische Expression eines Transgens, die kontrollierte Elimination der transplantierten Zellen und die Sicherstellung, dass es nicht zu einer onkogenen Transformation der übertragenen Zellen kommt. Denkbare Anwendungsgebiete wären beispielsweise die beschleunigte Regeneration von Gewebe nach Verletzungen im Sportler, aber auch die Steigerung wichtiger Merkmale für sportliche Höchstleistungen durch Modulation der Expression beteiligter genetischer Faktoren. Nachdem das humane Genom vollständig sequenziert worden ist und die humane Genkarte mit ihren ca. 30.000 Genen bekannt ist, sind in den nächsten Jahren viele neue Erkenntnisse zur Funktion der humanen Gene zu erwarten (Functional Genomics). Diese Erkenntnisse werden natürlich auch neue Möglichkeiten zur Manipulation im Spitzensport ergeben. Auch wenn diese Perspektiven noch weit in der Zukunft liegen mögen, sind Nachweis- und Bekämpfungsverfahren rechtzeitig zu entwickeln.

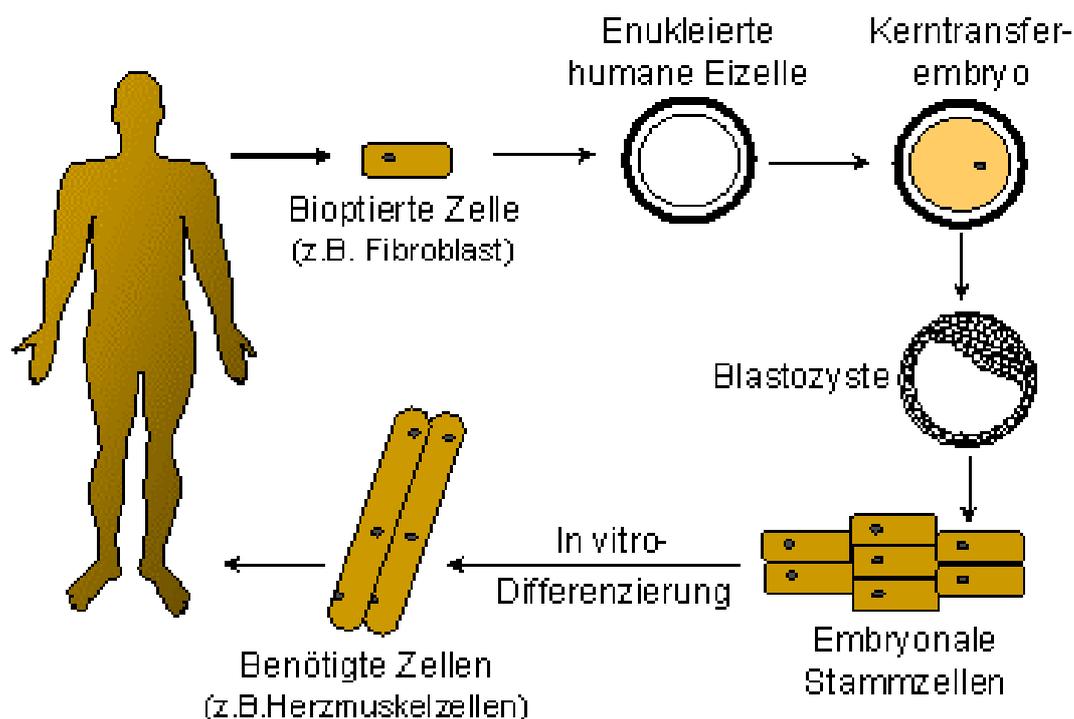


Abb. 2: Schematische Darstellung des therapeutischen Klonens, Beispiel: Kardiomyozyten

