

In der heutigen Zeit wird es immer wichtiger, Krankheiten direkt auf genetischen Ebene zu erforschen – hierfür werden immer häufiger Tiermodelle hinzugezogen. Diese Modelle können in zweierlei Hinsicht degeneriert werden. Zum einen können weitere Gene (*Transgene*) stabil in das Genom integriert und weitervererbt werden (*Transgene Tiere*), zum anderen können Gene gezielt ausgeschaltet werden (*Knockout-Tiere*). In diesem Zusammenhang können an diesen Modellen Regulationsvorgänge und Testsysteme für Medikamente untersucht werden, von denen sich neue Therapieformen ableiten lassen. Auch der Einsatz als sog. »Bioreaktor« findet im Zusammenhang mit transgenen Tieren grosse Anwendung; so ist es beispielsweise möglich, pharmazeutisch wichtige Proteine in diesen transgenen Tieren zu produzieren.

## Definition

Transgene Tiere tragen künstlich eingeführte Gene in ihren vegetativen Zellen und in der Keimbahn; der transgene Zustand ist vererbbar.

## Methoden der Herstellung

Prinzipiell kann man drei Methoden der Herstellung von Tiermodellen unterscheiden; die Wahl der Methode ist jedoch von der Art des gewünschten Tiermodells abhängig. Möchte man beispielsweise eine transgene Maus degenerieren, so muss man sich entweder der „Virusintegration“ oder der „Mikroinjektion in Vorkerne“ bedienen. Ist das Ziel der Arbeit hingegen eine sog. Knockout-Maus, steht nur der mühselige Weg des „Transfers embryonaler Stammzellen“ zur Verfügung.

## Virusintegration

Bei der „Virusintegration“ oder auch „retroviralen Transfektion“ werden modifizierte Retroviren verwendet.

Retroviren sind RNA-Viren, die nach Infektion einer Zelle das RNA-Genom mit Hilfe der reversen Transkriptase in das Genom der Wirtszelle integrieren können. Die Aufnahme in die Zelle erfolgt über rezeptorgesteuerte Endocytose. Nach Aufnahme eines Virus wird die Expression des Rezeptors ausgeschaltet: Eine Zelle wird nur einmal infiziert. Die Integration der viralen RNA in das Genom der Zelle wird durch ein viral-codiertes Protein bewirkt, wobei der Integrationsort unspezifisch ist.

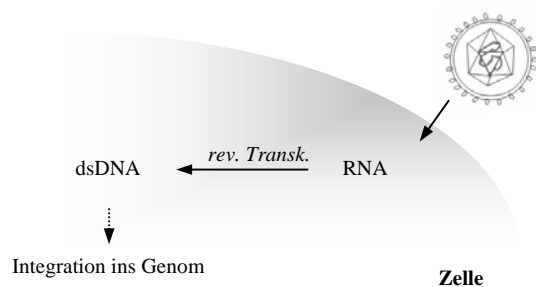


Abb. 1 – Prinzip der retroviralen Integration

Möchte man mit Hilfe dieser Technik ein Transgen in die Zelle einschleusen, ist das Viruspartikel zunächst zu modifizieren. Das primäre Ziel dieser Modifikation ist es, dass (1) das Virus das Transgen aufnimmt und (2) der lytische Zyklus des Virus blockiert wird (keine unkontrollierte Virusvermehrung). Näheres dazu siehe unter: „Packaging Cells“; Cone und Mulligan, 1984; Mann et al., 1983; Miller und Rosman 1989.

Das so präparierte Virus wird dann zur Transfection (Infektion) eines Embryos (im 16-Zell-Stadium) eingesetzt.

Der großer Vorteil dieser Methode ist es, dass man keine besonderen, teuren Apparaturen für die Infektion benötigt und pro Zelle nur eine Integration im Genom stattfindet. Dem spricht entgegen, dass die Transfections-Effizienz bei < 20% liegt und somit die Expression des Transgens entsprechend niedrig ausfällt.

Der grosse Nachteil dieser Technik ist jedoch in der Tatsache begründet, dass es nicht zu sequenzspezifischen Integrationen im Wirtsgenom kommt; somit ist die Wahrscheinlichkeit als recht hoch einzustufen, dass evtl. andere Gene zerstört werden.

## Mikroinjektion in Vorkerne

Eine weitere Methode stellt die Mikroinjektion dar. Hierbei wird eine *in vitro* Befruchtung der Eizelle vorgenommen. Anschließend wird das Transgen in geeigneter Menge und Konzentration in den männlichen (größeren) Vorkern injiziert. In der nachfolgenden Verschmelzung der beiden Vorkerne wird das mütterliche und väterliche Erbgut neu kombiniert, so dass auch das Transgen nach dem Zufallsprinzip in das Genom des Wirtes mit eingebaut werden kann. Bei den folgenden Zellteilungen wird dieses entsprechend an die Tochterzellen weitervererbt.

Damit sich der Embryo (Gründertier) entwickeln kann, wird die befruchtete Eizelle in den Eileiter einer Amme implantiert. Etwa ein Viertel der neugeborenen Mäuse weisen das Transgen ihrem Erbgut auf (siehe dazu Abb. 2).

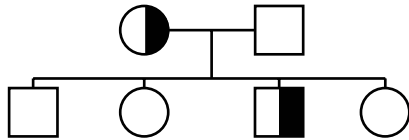


Abb. 2 – Erstverpaarung des Gründertiers; ca. 25% der ersten Nachkommengeneration sind heterozygot transgen

Ziel dieser Erstverpaarung ist es, ein zweites heterozygot-transgenes Tier des anderen Geschlechtes zu erhalten; werden diese beiden heterozygot-transgenen Tiere einer neuen Verpaarung unterworfen, so erhält man mit 25%iger Wahrscheinlichkeit ein homozygot transgenes Tier.

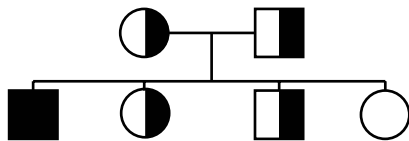


Abb. 3 – Verpaarung zweier heterozygot transgener Tiere ca. 25% der Nachkommen sind homozygot transgen

Ein Nachteil dieser Methode liegt darin begründet, dass es zu keiner sequenzspezifischen Integration des Transgens kommen kann und sich teilweise sog. Tandemeinlagerungen ergeben; darunter versteht man eine Hintereinanderreihung mehrerer Kopien des Transgens. Weiterhin fordert die Methode viele Embryonen.

Dem gegenüber stehen die Vorteile, welche sich klar aus der schnellen und praktischen Technik ergeben. Besonders ist an dieser Stelle auf die Tatsache zu verweisen, dass bei der Mikroinjektion reine DNA ohne einen Vektor injiziert wird.

**Transfer von Embryonalen Stammzellen**

Das Ziel dieser Methode ist es, das Transgen gezielt im Genom des Empfängers zu lokalisieren. Die Umsetzung dieses Gedankens erfolgt mit Hilfe der homologen Rekombination. Aus diesem Grund muss der zu konstruierende Vektor einen entsprechend langen homologen Bereich aufweisen, der mit dem Ziel-Allel in Interaktion treten kann.

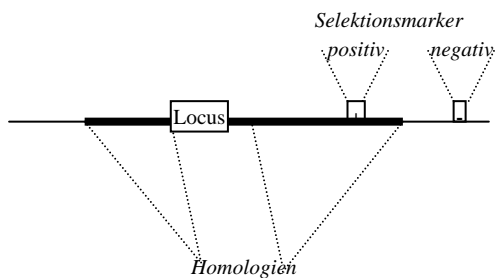


Abb. 4 – Grundstruktur eines Knockout-Vectors; der Vector muss drei Kriterien erfüllen: (1) Homologien zum Zielgen, (2) positiven Selektionsmarker und (3) negativen Selektionsmarker

Weiterhin sollte der Vektor innerhalb der Homologie einen positiven Selektionsmarker besitzen, welcher der Anreicherung der durchaus selten, stabil transfezierten ES-Zellklone nach Elektroporation dient (meist ein Resistenzgen). Neben dem positiven Selektionsmarker sollte auch ein negativer Selektionsmarker, welcher sich außerhalb der Homologie befindet, vorhanden sein. Er dient der Gegenselektion von ungerichteten Integrationen des gesamten Vektors in einem entsprechendem Selektionsmedium. Ist dieser Vector nach dem hier geschilderten „Bauprinzip“ konstruiert worden, ist die eigentliche Arbeit bereits getan; das folgende Prozedere kann demnach als »Routine« bezeichnet werden:

ES-Zellen werden aus der inneren Zellmasse einer Blastocyste gewonnen. Nachdem diese kultiviert werden, können sie mit dem Vector-Konstrukt elektroporiert werden. Nach entsprechender Selektion der elektroporierten ES-Zellen werden diese auf das Rekombinationsereignis hin untersucht und in eine 3.5 Tage alte Blastocyste mikroinjiziert; anschließend erfolgt die Transplantation in den Uterus einer Amme.

Das sich entwickelnde Tier trägt nun zum einen die genetische Information der transgenen ES-Zellen und zum anderen die der Wildtyp ES-Zellen. Ein solches Tier bezeichnet man als Chimäre. Eine entsprechende phänotypische Einschätzung kann bereits über die Fellfarbe erfolgen. Um dies jedoch zu ermöglichen, ist eine definierte Strategie zu verfolgen:

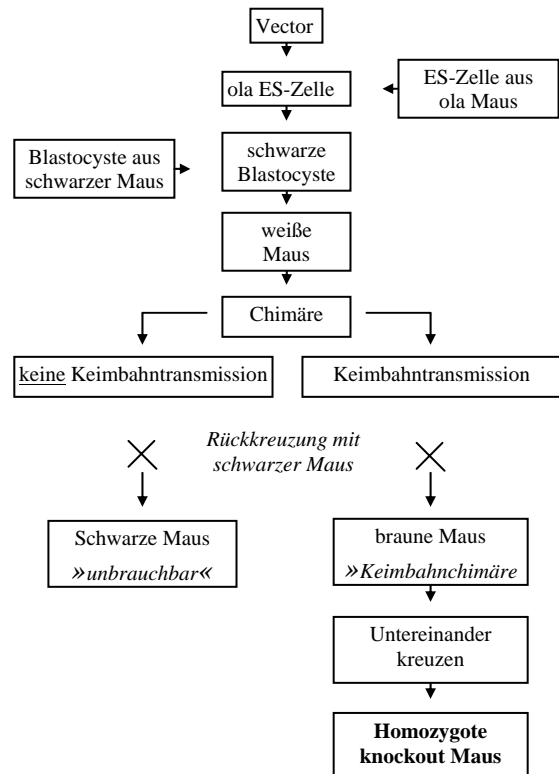


Abb 5. – Kreuzungsschema für die Degenerierung homozygoter Knockout Mäuse; phänotypischer Marker: Fellfarbe

Die Vorteile dieser Technik liegen eindeutig in der sequenzspezifischen Einlagerung des Vectors in das Wirtsgenom und damit verbunden der zuverlässigen Aufklärung der dazugehörigen Funktion. Aufgrund der Tatsache, dass man für die Umsetzung jedoch geeignete Labore für Tierversuche und das dazugehörige Personal benötigt, sowie auch weitere teure Gerätschaften und natürlich das entsprechende *know-how*, kann diese Technik nicht in vielen Einrichtungen durchgeführt werden. Die Degeneration einer solchen Knockout-Maus kann durchaus ein bis zwei Jahre dauern, was das zeitliche Ausmaß dieser Technik erahnen lässt. Zudem kann die Charakterisierung einer solchen Knockout-Maus auch immer durch sog. Kompensationseffekte beeinflusst werden.

**Das Cre/loxP-System**

Das Cre/loxP-Rekombinasesystem kommt dann zum Einsatz, wenn der Phänotyp einer konventionellen Knockout-Maus als früh letal beschrieben werden kann. Mit Hilfe dieses Systems ist man in der Lage, den Ort und den Zeitpunkt des eigentlichen Knockouts zu bestimmen.

Das Cre/loxP-Rekombinasesystem stammt aus dem Bakteriophagen P1. Es besteht im wesentlichen aus zwei Parametern – den sog. LoxP-sites und der Cre-Rekombinase (*causes recombination*). Die LoxP-site stellt eine 34 bp lange Zielsequenz für die Cre-Rekombinase dar; sind zwei von diesen Elementen in der Nähe von Cre vertreten, so kommt es zur ortsspezifischen Rekombiantion zwischen diesen Elementen. Als Folge kann es zu Deletionen, Inversionen oder auch Translokationen kommen.

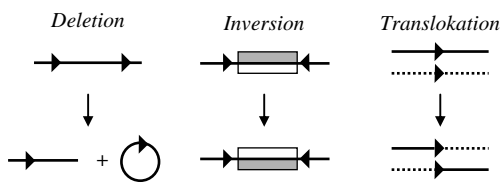


Abb. 6 – Möglichkeiten der durch Cre-Rekombinase induzierten Rekombinationen zwischen LoxP-Sites (schwarze Dreiecke); bei gleicher Orientierung der LoxP-sites auf einem Allel kommt es zur Deletion, bei entgegengesetzter Orientierung der LoxP-sites auf einem Allel zur Inversion und bei gleicher Orientierung der LoxP-sites auf zwei verschiedenen Allelen zur Translokation.

Möchte man diese Technik einsetzen, ist lediglich die Grundstruktur des Knockout-Vectors mit mindestens zwei (in der Praxis jedoch drei) LoxP-Sites nach folgendem Muster zu ergänzen:

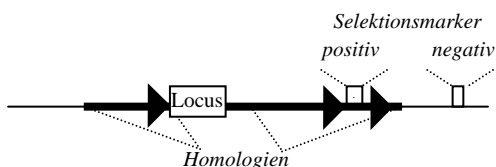


Abb. 7 - Grundstruktur eines konditionellen Knockout-Vectors

Der resultierende Vector wird als konditioneller Vector oder auch gefloxter Vector bezeichnet (vgl. mit Abb. 4).

Der Vector ist nun prinzipiell in der Lage, durch die Kombination von homologer und locusspezifischer Rekombination den auszuknockenden Locus und den positiven Selektionsmarker nach erfolgreicher Selektion zu delitieren.

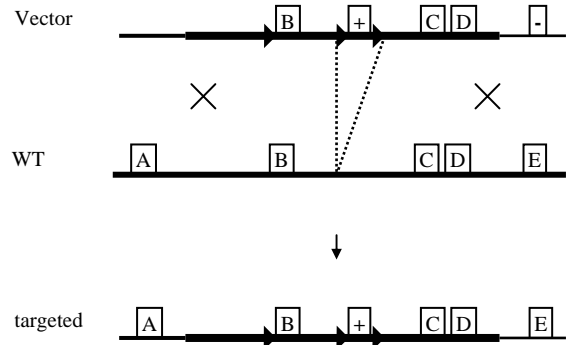


Abb. 8 – homologe Rekombination des konditionellen Vectors mit dem Wildtyp (WT) Allel; dargestellt sind die Exons (A – E), positiver (+) und negativer (-) Selektionsmarker.

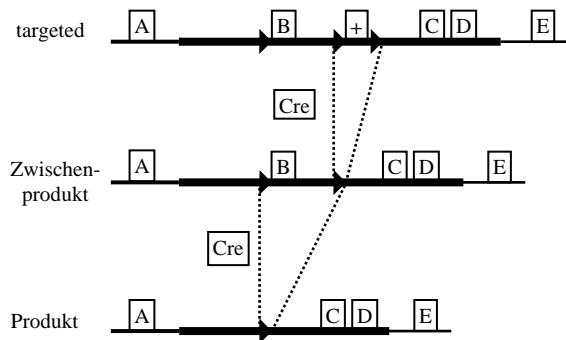


Abb. 9 – locusspezifische Rekombination des konditionellen Vectors mit dem Zwischenprodukt; dargestellt sind die Exons (A – E), positiver (+) und negativer (-) Selektionsmarker.

Unter praktischen Aspekten sind jedoch zwei verschiedenen Mausstämmen zu degenerieren. Der erste Stamm muss das gefloxt Knockout-Konstrukt tragen, während der zweite Stamm die codierende Sequenz der Cre-Rekombinase (als Transgen) tragen muss. Dabei ist darauf zu achten, dass das Transgen so konstruiert wird, dass dessen regulatorische Sequenzen festlegen, wo und wann Cre exprimiert wird.

Nach entsprechender Kreuzung dieser beiden Stämme löst die zelltypspezifische Aktivierung der Cre-Rekombinase einen zelltypspezifischen Knockout im Versuchs-Tier aus.

Der große Vorteil einer konditionellen Knockout Maus liegt eindeutig in der Induzierbarkeit des Systems und dem Gewebsspezifischen Ausfall des Zielgens. Als Nachteil kann neben dem hohen Zeitaufwand die immer wieder auftretende, „Basisaktivität“ des Zielgens (nach Induktion) gesehen werden.