

Experimentelle Embryologie I

embryonale Stammzellen, transgene / knock out Tiere

Embryonale Stammzellen

Totipotente Zellen - nicht determiniert

Pluripotente Zellen - determiniert, aber nicht differenziert

Gewinnung der Stammzellen:

Möglichkeit A:

im Blastozystenstadium nach dem Schlupf aus der Zona pellucida

inner cell mass (ICM)

„nur“ pluripotent

Kultivierung in spezifischem Medium (Leukaemia Inhibitory Factor)

Bildung von Cluster

Möglichkeit B:

Entnahme von primordiales Keimzellen aus Embryonen/Feten

Zellen differenzieren unter bestimmten Kulturbedingungen zu embryonalen

Stammzellen

Problem: enges Zeitfenster

In vitro Differenzierung:

Entwicklung eines Stammzell-Aggregats: embryoid body (EB)

Inkubation mit spezifischen Wachstumsfaktoren

Zellersatztherapie:

Gewebe mit schwerer Wiederherstellungsfähigkeit:

Herzmuskel ⇒ Herzinfarkt

Nervensystem ⇒ Morbus Parkinson

endokrines Pankreas ⇒ Diabetes mellitus

Knochen-/Knorpelgewebe ⇒ Arthrose

Probleme:

Gefahr der Tumorentstehung!

- durch Transplantation geringer Mengen unzureichend differenzierter Stammzellen

Inaktivierung der transplantierten Zellen durch das Immunsystem des Wirts

Ethische Bedenken - Embryonen:

Alternativen zu embryonalen Stammzellen?

- Stammzellen aus dem Nabelschnurblut
- adulte Stammzellen (Progenitorzellen)

potentielle Stammzellen - Beispiel: Nervengewebe

totipotente Zelle - Morula

pluripotente Zelle - Blastozyste

multipotente Zelle - Embryo, Gehirn, Blut (?)

neuraler Progenitor - Gehirn, Rückenmark

neuronaler bzw. glialer Progenitor - bestimmte Regionen des Gehirns

(differenziertes Neuron oder Gliazelle - spezifische Regionen des Gehirns)

Transgene Tiere

Tiere, in deren Zellen...

... zusätzliche Gene eingefügt wurden

... Gene überexprimiert werden

... Gene abgeschaltet wurden (knock out)

Palmiter et al., 1982:

Riesenmaus durch die Integration eines Wachstumshormongens in die Keimbahn

Herstellung transgener Tiere:

3 verschiedene Methoden:

A: Mikroinjektion von Genkonstrukten in Vorkerne befruchteter Eizellen

Superovulation - Entnahme befruchteter Eizellen

Injektion eines Genkonstrukts aus Gen und Promoter

Transfer in Reproduktionstrakt eines scheinträchtigen Tieres

scheinträchtige Tiere durch Kopulation mit vasktomierten männlichen Tieren

Transfer der genetisch veränderten befruchteten Eizelle in Ovidukt oder Uterus

Weiterzucht mit Tieren, die das Transgen in der Keimbahn enthalten

B: Transfektion von Genkonstrukten in embryonale Stammzellen in vitro und Reinjektion in Blastozyste

Entnahme der Blastozyste aus trächtigem Tier

Isolierung der Stammzellen aus ICM

Homologe Rekombination durch Transfektion der Stammzellen mit einem Genkonstrukt

Transfektion: Einbringen fremder Nukleinsäuren in Zellen

homologe Rekombination: sequenzspezifischer Austausch des transgenen Genkonstrukts

Steigerung und Absicherung der homologen Rekombination:

Identifikation der Zellen durch positive und negative

Selektionsmarker im Genkonstrukt:

positiver Selektionsmarker:

- hat an beiden Enden homologe Sequenzen zu der Stelle, an der das Genkonstrukt eingebaut werden soll
- hat keine eigene Regulationsebene: Expression nur bei Integration
- häufig eingesetzt werden Gene für Antibiotikaresistenzen ⇒ Selektion der positiven Zellen durch Zugabe des Antibiotikums
- negativer Selektionsmarker:
- wird bei homologer Rekombination nicht mit in die chromosomale DNA integriert, aber bei falscher Lokalisation
- Identifikation der Zellen, bei denen das Genkonstrukt an der falschen Stelle oder mehreren Stellen integriert wurde

Reinjektion der veränderten Zellen in Blastocyste und Transfer in Amme

Weiterzucht mit keimbahnchimären Tieren

Keimbahnchimäre Tiere:

Chimäre: der Organismus der Tiere setzt sich sowohl aus transgenen als auch nicht transgenen Zellen zusammen

Keimbahnchimäre: chimäres Tier, beim dem die Keimzellen transgen sind

C: Gentransfer durch Retrovirusvektoren in Embryonen

Entnahme der Morula aus trächtigem Tier

Einbringen (Klonierung) des gewünschten Gens in ein Retrovirus und Infektion einer Zelllinie mit diesem Virus

Cokultivierung der Virus produzierenden Zellen mit den embryonalen Zellen (Infektion durch das Virus)

Transfer der veränderten embryonalen Zellen in Amme, usw., usw.

Knock-out Tiere:

ein bestimmtes Gen wird gezielt ausgeschaltet

1. Transfektion der Zelle mit einem Genkonstrukt, welches eine Sequenz für Neomycin enthält
2. Homologe Rekombination des Genkonstrukts im Austausch zum Exon 2
3. spezifische Extraktion des Neomycin-Gens durch Cre-Rekombinase:
Exon 2 fehlt, Gen defekt

Einsatz der Transgentechnologie:

Grundlagenforschung:

- Bedeutung einzelner Gene für den gesamten Organismus
- Transplantationsantigene??
- Autoimmunerkrankungen??
- Genregulation??
- genetisch bedingte Erkrankungen??

Krankheitsmodelle:

- Hyperlipidämie durch Störungen im Fettstoffwechsel
- Arteriosklerose
- Diabetes mellitus
- Hämophilie
- Tumor-Modelle!

Gene Pharming:

- Erzeugung von Proteinen, die schwer zu produzieren sind, in transgenen Tieren
- Isolierung des Proteins aus dem Serum oder Milch (!) der transgenen Tiere
- Produktion von Antikörpern
- Lactoferrin-Kuh (Babynahrung)