

## GENTECHNIK

## Nobelpreis 2007 in Medizin: Herstellung von *knockout*-Mäusen

Vor 20 Jahren, 1987, erschien in der Zeitschrift "Cell" eine Veröffentlichung, die die Welt der Genetik und der biomedizinischen Forschung revolutionierte: Kirk Thomas und Mario Capecchi berichteten über die gezielte Abschaltung des *Hprt*-Gens der Maus. Am Ende ihres Artikels schrieben sie lapidar: „Das hier beschriebene Protokoll könnte für gezielte Mutationen in jedem Gen benutzt werden.“ Im Herbst 2007 wurden Mario R. Capecchi, Martin J. Evans und Oliver Smithies für die Vorarbeiten, die zu diesem Durchbruch führten, mit dem Nobelpreis in Medizin ausgezeichnet.

Bis zu der Entwicklung der *knockout*-Mäuse waren die Maus-Genetiker auf Mutationen angewiesen, die entweder spontan entstanden beziehungsweise durch Chemikalien oder Röntgenstrahlung zufällig im Genom erzeugt wurden. Auch transgene Mäuse, die seit 1980 hergestellt werden konnten, hatten die neue, zusätzliche DNA an zufälligen Stellen im Genom integriert. Außerdem konnte damit „nur“ eine zusätzliche Funktion (engl.: *gain of function*) des eingeführten Gens untersucht werden; diese transgenen Mäuse eignen sich nur begrenzt als Modelle für eine Gentherapie, da die defekte Genkopie erhalten bleibt. Das neue, als *gene targeting* oder *knockout*-Technologie bezeichnete Verfahren führt dagegen zum Funktionsverlust des jeweiligen Gens (engl. *loss of function*); es ist heute der „Gold-

Standard“ in der Mausgenetik und aus der Funktionsanalyse von Genen nicht mehr wegzudenken.

Die neue Technologie verbindet dabei zwei verschiedene Ansätze: Der erste Aspekt basiert auf einem allgemein gültigen Prinzip der Genetik, der Rekombination, d.h. dem Austausch homologer Regionen der DNA während der Meiose. Mario Capecchi und Oliver Smithies hatten lange mit Zellkulturen gearbeitet und dabei die Idee entwickelt, diese Eigenschaft zu benutzen, um auch fremde DNA in das Genom von Zellen einzuführen. Eine Grundvoraussetzung ist, dass die flankierenden Bereiche in ausreichender Länge mit der DNA der Zielzelle übereinstimmen. Diese Idee lag damals offensichtlich in der Luft, denn 1978 zeigten Hinnen, Hicks und Fink die Möglichkeit einer gezielten

Gensubstitution in der Hefe. Oliver Smithies versuchte ursprünglich, mutierte Gene in menschlichen Knochenmarkszellen auszutauschen und stellte dabei zunächst fest, dass Gene unabhängig von ihrem jeweiligen Expressionszustand ausgetauscht werden können. In seinem klassischen Experiment (1985) integrierte er ein Plasmid, das Globin-Gensequenzen enthielt, in den  $\beta$ -Globin-Locus in kultivierten humanen Zellen – mit einer Frequenz von 1:1000. Capecchi zeigte dann 1986 mit einem Neomycin-Resistenz-Gen (*neo<sup>r</sup>*), dass das gezielte Abschalten von Genen in Säugerzellkulturen über homologe Rekombination möglich ist.

### Konstruktion eines Vektors

Die Abbildung zeigt die wesentlichen Elemente, die zur Konstruktion eines Vektors gehören, der gezielt Gene ausschalten kann (engl. *targeting vector*): Der Vektor enthält längere Bereiche von DNA, die zu dem Zielgen homolog sind (und die später Rekombination ermöglichen) sowie dazwischen fremde DNA, die das Zielgen entsprechend verändert und außerdem eine positiv-negativ Selektion zulässt (in der Regel eine Antibiotika-Resistenz, wie beispielsweise gegen Neomycin). Außerhalb des homologen Bereiches trägt der Vektor noch ein zweites Selektionsgen, mit Hilfe dessen Zellen,

#### > ABB.

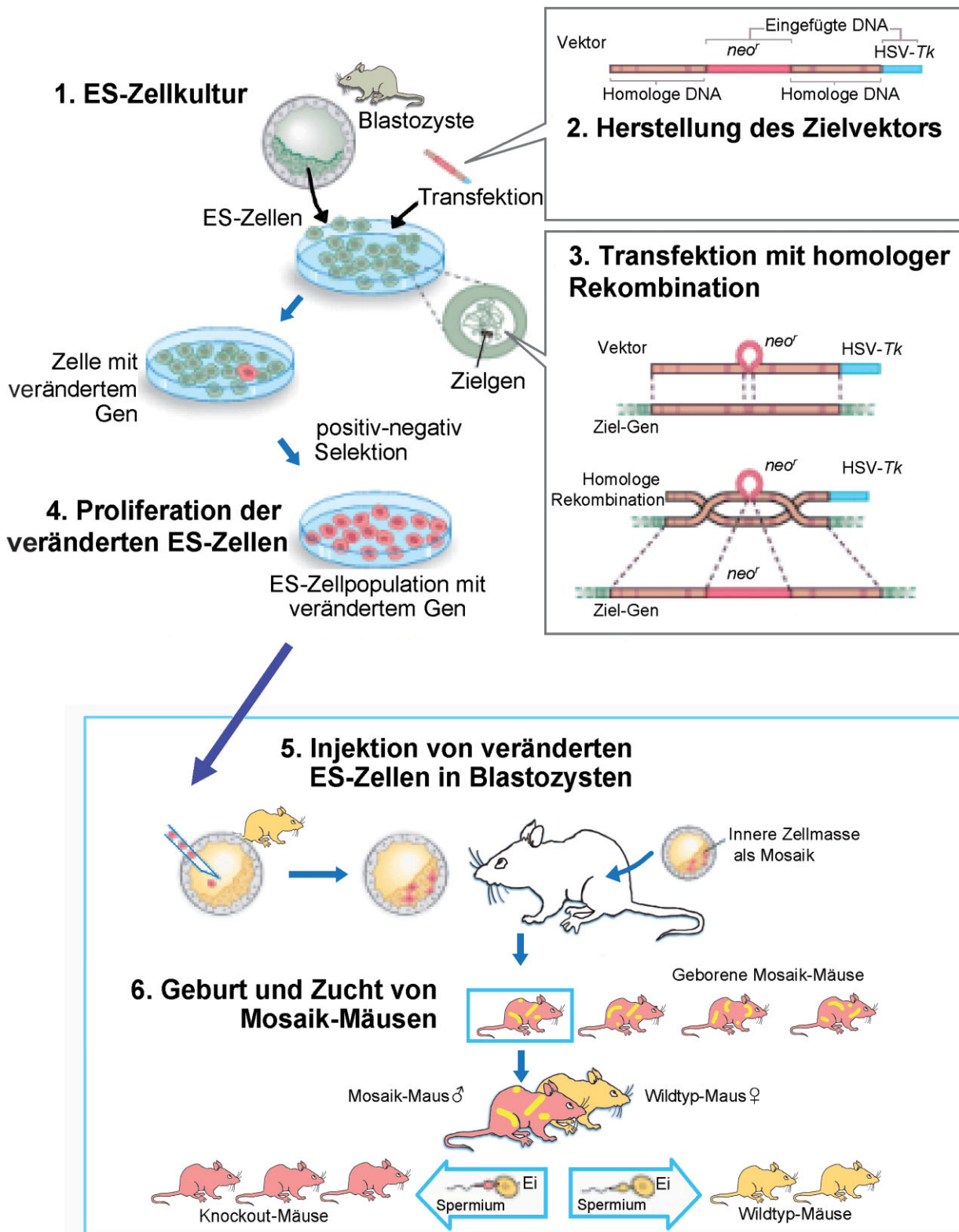
1. Embryonale Stammzellen (ES-Zellen) werden aus Präimplantationsembryonen (Blastozysten) der Maus gewonnen und kultiviert.
2. Der Zielvektor (engl. *targeting vector*) enthält längere DNA-Fragmente, die zu dem Zielgen homolog sind, sowie eine eingefügte DNA (rot), die das Zielgen verändert und eine positiv-negativ Selektion ermöglicht.
3. Der Zielvektor wird in die ES-Zellen eingefügt (Transfektion). Die zelluläre Maschinerie ermöglicht es dem Zielvektor, die homologen Sequenzen des Zielgens zu erkennen und mit dem Zielgen zu rekombinieren.
4. Durch eine positiv-negativ Selektion vermehren sich nur die wenigen Zellen (rot), bei denen die homologe Rekombination dazu geführt hat, dass die Neomycin-Resistenz (*neo<sup>r</sup>*) in das Zielgen eingefügt wurde und es ausgeschaltet wurde.
5. Die so veränderten ES-Zellen (rot) werden in Blastozysten eingefügt und bilden ein Mosaik mit den anderen Zellen (gelb) der inneren Zellmasse. Diese Blastozysten werden einer weiblichen Maus implantiert, wo sie zu Mosaik-Embryonen heranreifen und als Mosaik-Mäuse (rot-gelb) geboren werden; Mosaik-Mäuse werden auch als Chimären bezeichnet.
6. Die Mosaik-Mäuse (rot-gelb) werden mit Wildtyp-Mäusen (gelb) verpaart. Wenn sich aus den veränderten ES-Zellen Keimzellen (rot-gelb) entwickelt haben, enthalten diese das ausgeschaltete Gen, und eine *knockout*-Linie (rot) kann etabliert werden. Im anderen Fall entstehen wieder Wildtyp-Mäuse (gelb).

die eine zufällige Insertion des Vektors tragen, wieder aus der Kultur entfernt werden können (in der Regel wird hier das Thymidin-

Kinase-Gen des Herpes-Simplex Virus eingesetzt [*HSV<sup>tk</sup>*], durch Einsatz von Gancyclovir im Medium sterben Zellen, die die Thymidin-

Kinase exprimieren). Heute wird häufig noch zusätzlich ein Reportergen eingebaut (beispielsweise *lacZ*), wodurch sich die Expres-

ABB. | SECHS SCHRITTE ZUR KNOCKOUT-MAUS



sion des Gens sehr einfach untersuchen lässt (beispielsweise durch Anfärbung des ganzen Embryos in sehr frühen Phasen oder auf histologischen Schnitten).

### Die Maus als Mosaik

Es fehlte aber noch ein entscheidender Schritt, um dieses Verfahren aus dem Bereich einzelner Zellen oder Zellkulturen in die Keimbahn der Maus zu bringen und diese damit dauerhaft genetisch zu verändern. Ursprüngliche Versuche mit embryonalen Karzinomazellen scheiterten: sie sind zwar in der Lage, sich zu fast allen Zelltypen zu entwickeln, aber sie tragen defekte Chromosomen und können daher zur Bildung funktionsfähiger Keimzellen nichts beitragen. Es bedurfte daher der Fortschritte der Reproduktionstechnologie, um den entscheidenden Schritt voranzukommen: Martin Evans konnte 1981 zeigen, dass Zellen aus der inneren Zellmasse eines frühen Mausembryos isoliert und *in vitro* permanent kultiviert werden können; diese Zell-Linien sind heute als „embryonale Stammzellen“ (ES-Zellen) bekannt. Der für die Herstellung von *knockout*-Mäusen entscheidende Schritt ist, dass diese Zellen in andere frühe Embryonen (Blastula- oder Morula-Stadium) eingeführt und sich zusammen mit deren Zellen zu einer lebensfähigen Maus entwickeln können. Diese Maus ist ein Mosaik, da sie aus genetisch unterschiedlichen Zellen besteht: den Zellen aus der ES-Kultur und den Zellen des ursprünglichen Embryos. Wenn aus der Zelle aus der ES-Kultur im Embryo später Keimzellen werden, wird die genetische Information der ES-Zelle auf die nächste Generation weitergegeben und nicht die Information, die der ursprüngliche Embryo in sich trug. Die Kombination dieser beiden Verfahren, der Einführung von Fremd-DNA in das Genom von Zellen in Zellkultur über homologe Rekombination, und die Kultivier-

barkeit von ES-Zellen und ihr Re-Transfer in einen lebensfähigen Embryo, brachte 1987 den Durchbruch.

### Ein neues Zeitalter der Genetik

Für ihr erstes Experiment wählten Smithies und Capecchi das *Hprt*-Gen, das leicht identifiziert werden kann. Das *Hprt*-Gen codiert für die Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase; die Funktion des Gens ist für die Zellen nicht essenziell und *Hprt*-defiziente Zellen können sich in einem normalen Medium vermehren. *Hprt*-defiziente Zellen sind allerdings gegenüber der zytotoxischen Wirkung von Basenanaloga resistent, da diese in Wildtyp-Zellen von dem Enzym als Substrat verwendet werden und zum Absterben der Zellen führen.

Mit der Geburt der ersten *knockout*-Maus begann ein neues Zeitalter der Genetik. Seither ist die Zahl der bekannten *knockout*-Mutanten in der Maus exponentiell gewachsen. Derzeit werden international viele Anstrengungen unternommen, für jedes Gen eine *knockout*-Maus zur Verfügung zu stellen, beispielsweise im Rahmen des *European Conditional Mouse Mutagenesis Program* ([www.eucomm.org/](http://www.eucomm.org/)).

Allerdings zeigte es sich, dass viele ausgeschaltete Gene für die Entwicklung des Embryos essenziell sind, was dann zum Absterben der Embryonen führt. Um dennoch die Funktion solcher Gene in bestimmten Geweben der erwachsenen Maus untersuchen zu können, wurden eine Reihe von Modifikationen entwickelt, die es erlauben, ein Gen nur unter bestimmten Bedingungen auszuschalten (engl: *conditional knock out*). Das bekannteste System ist das Cre-lox-System: Die Cre-Rekombinase erkennt spezifische Sequenzelemente (*loxP*-Stellen) und schneidet das dazwischen liegende DNA-Fragment aus. Dazu werden in den Zielvektor an den gewünschten

Stellen *loxP*-Elemente eingefügt; die entstandenen mutierten Mäuse werden dann mit Mäusen gekreuzt, die die Cre-Rekombinase unter spezifischen Promotoren nur in dem entsprechenden Gewebe exprimieren.

So hat die Methode, die von Capecchi, Evans und Smithies vor 20 Jahren eingeführt wurde, der experimentellen Mausgenetik einen enormen Schub gegeben und zu einem wesentlich besseren Verständnis von Genfunktionen und den Mechanismen erblicher Krankheiten geführt. Manche Nullmutationen (wie diese Funktionsverlust-Mutanten auch bezeichnet werden) zeigen allerdings keinen klinischen Phänotyp, da verwandte Gene dann die Funktion übernehmen können (Redundanz); hier ist man nach wie vor darauf angewiesen, dass durch ENU-Mutagenese oder vergleichbare Verfahren die entsprechenden Krankheitsmodelle zur Verfügung gestellt werden. Insofern ist diese neue Technik eine wichtige Ergänzung des Werkzeugkastens der Mausgenetiker, aber sie ersetzt nicht die alten Werkzeuge.

[1] M. R. Capecchi, Nat. Rev. Genet. 2005, 6, 507-512.

Jochen Graw,  
GSF-Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit, Neuberberg