

VL Gentechnologie

Erwin R. Schmidt

#6

30. 05. 06

P-Elemente sind
aktive
Transposons bei
Drosophila
melanogaster und
verursachen
„Hybrid-
dysgenesis“

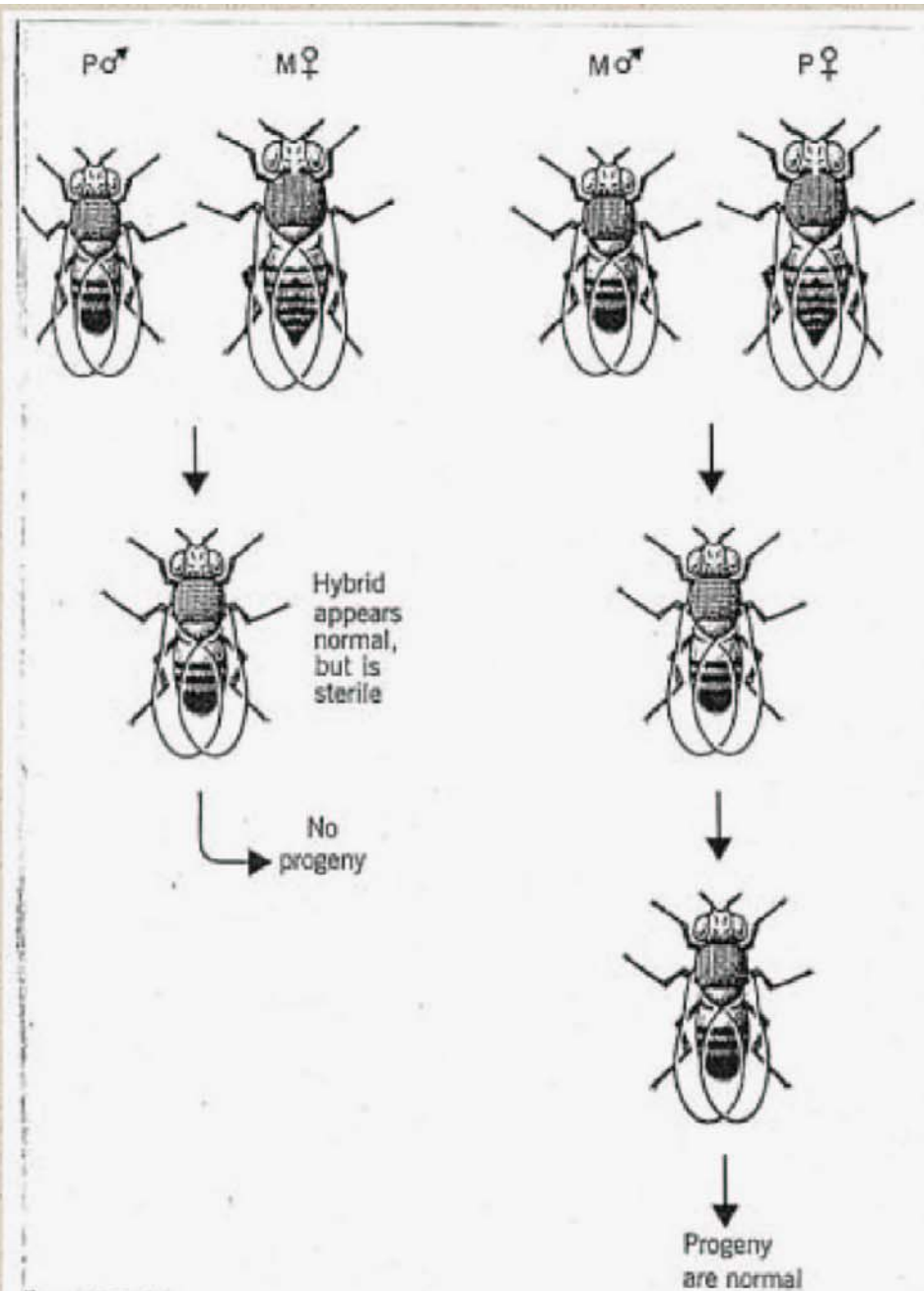
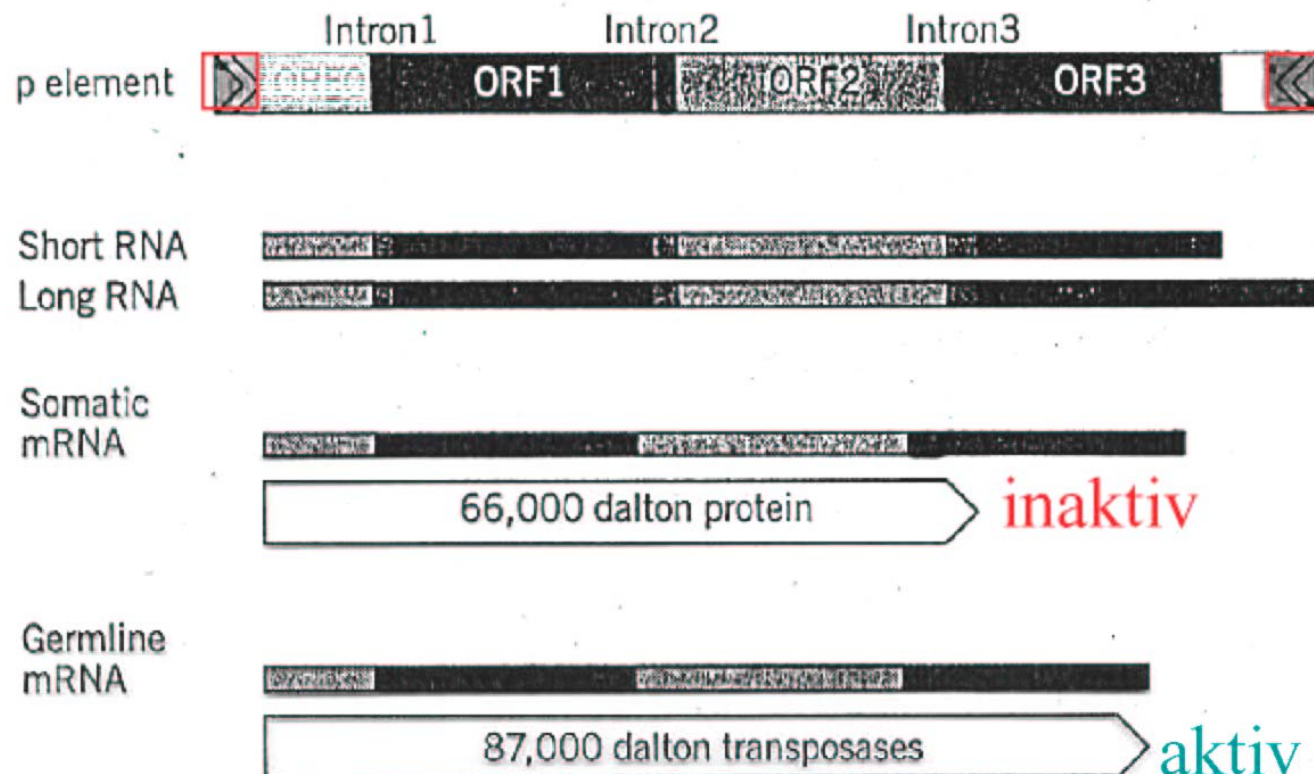


Figure 33.21
Hybrid dysgenesis is asymmetrical; it is induced by P male × M female crosses, but not by M male × P female crosses.

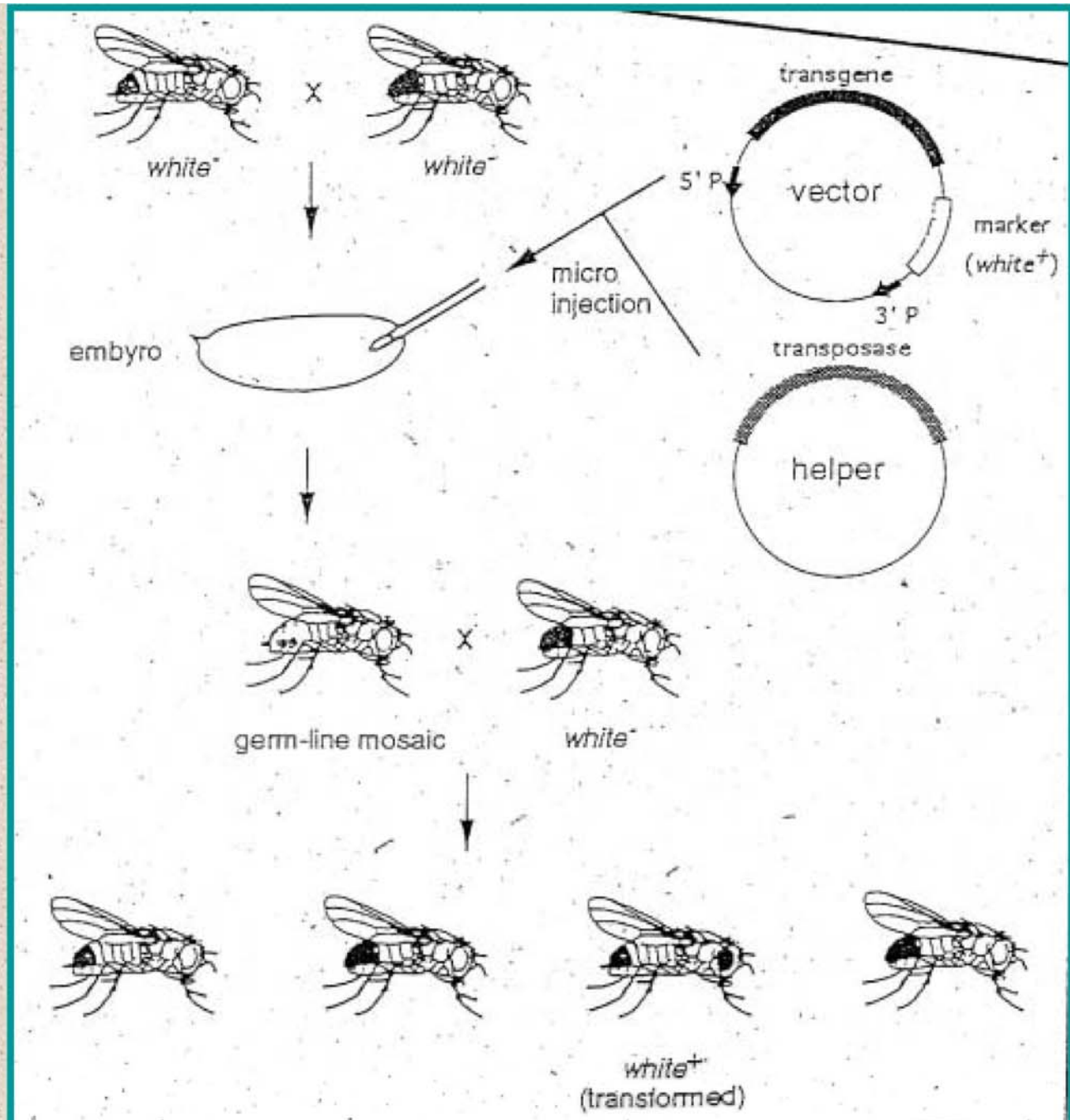
P-Elemente sind Transposons bei *D. melanogaster*, die eine Keimbahn-spezifisch aktive Transposase exprimieren

Figure 33.22

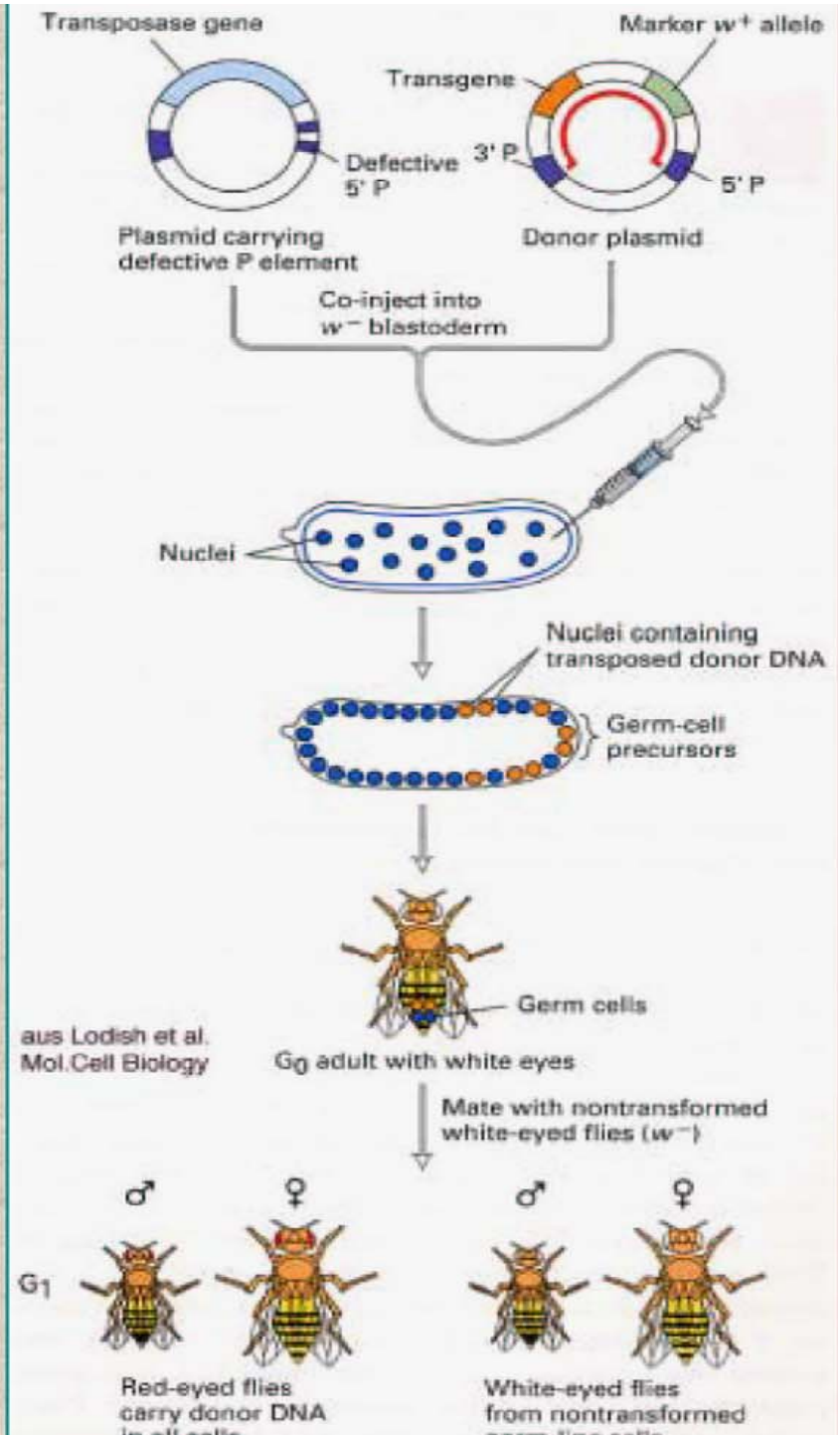
The P element has four exons. The first three are spliced together in somatic expression; all four are spliced together in germ line expression.



P-Element
vermittelte
Keimbahn-
trans-
formation
ist effizient
und
zuverlässig

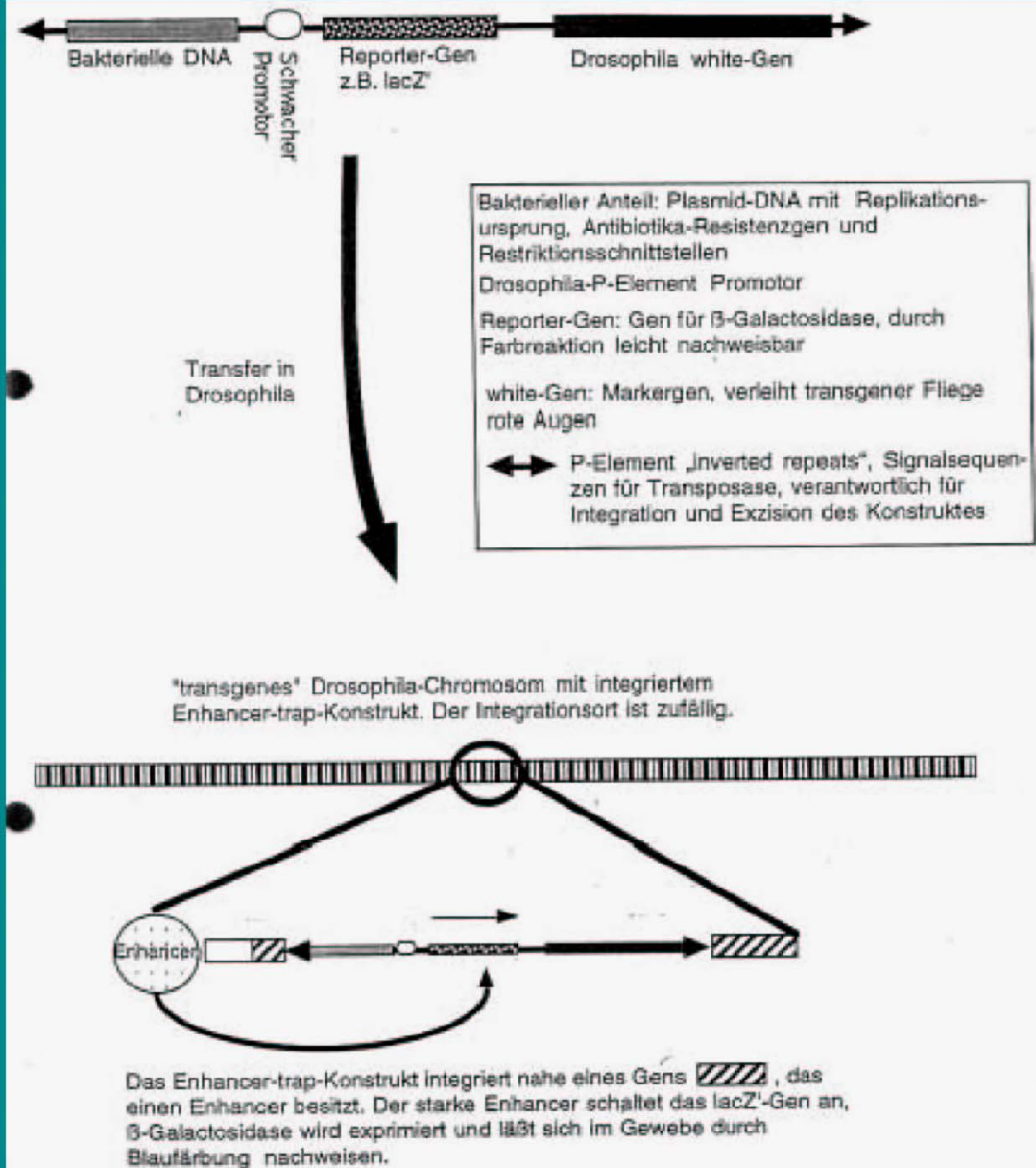


P-Element
vermittelte
Keimbahn-
trans-
formation
ist effizient
und
zuverlässig

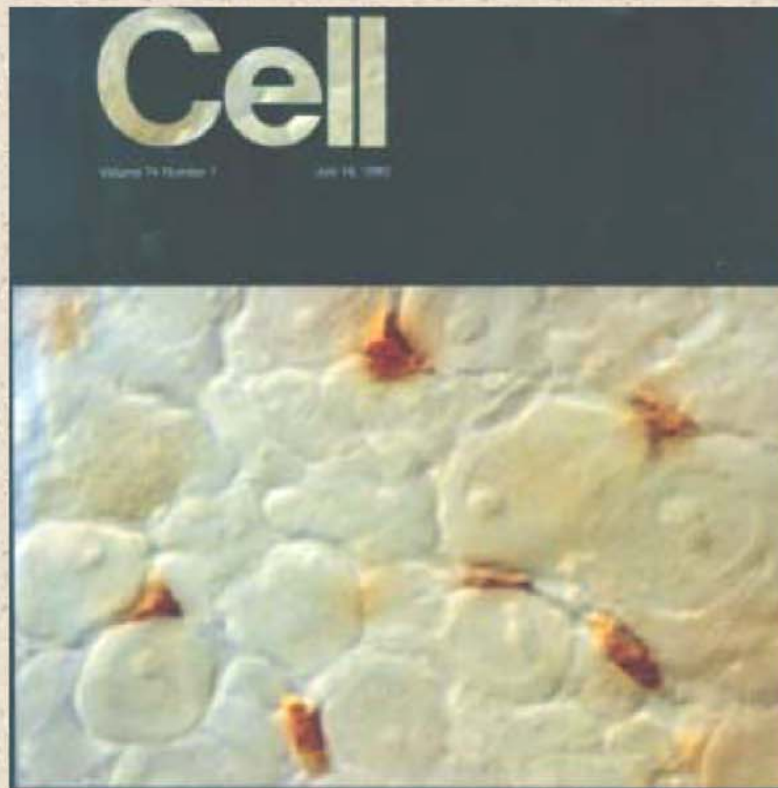


P-Elemente
sind extrem
nützlich zum
Studium der
Genfunktion
z. B. beim
Nachweis von
Enhancer-
Elementen

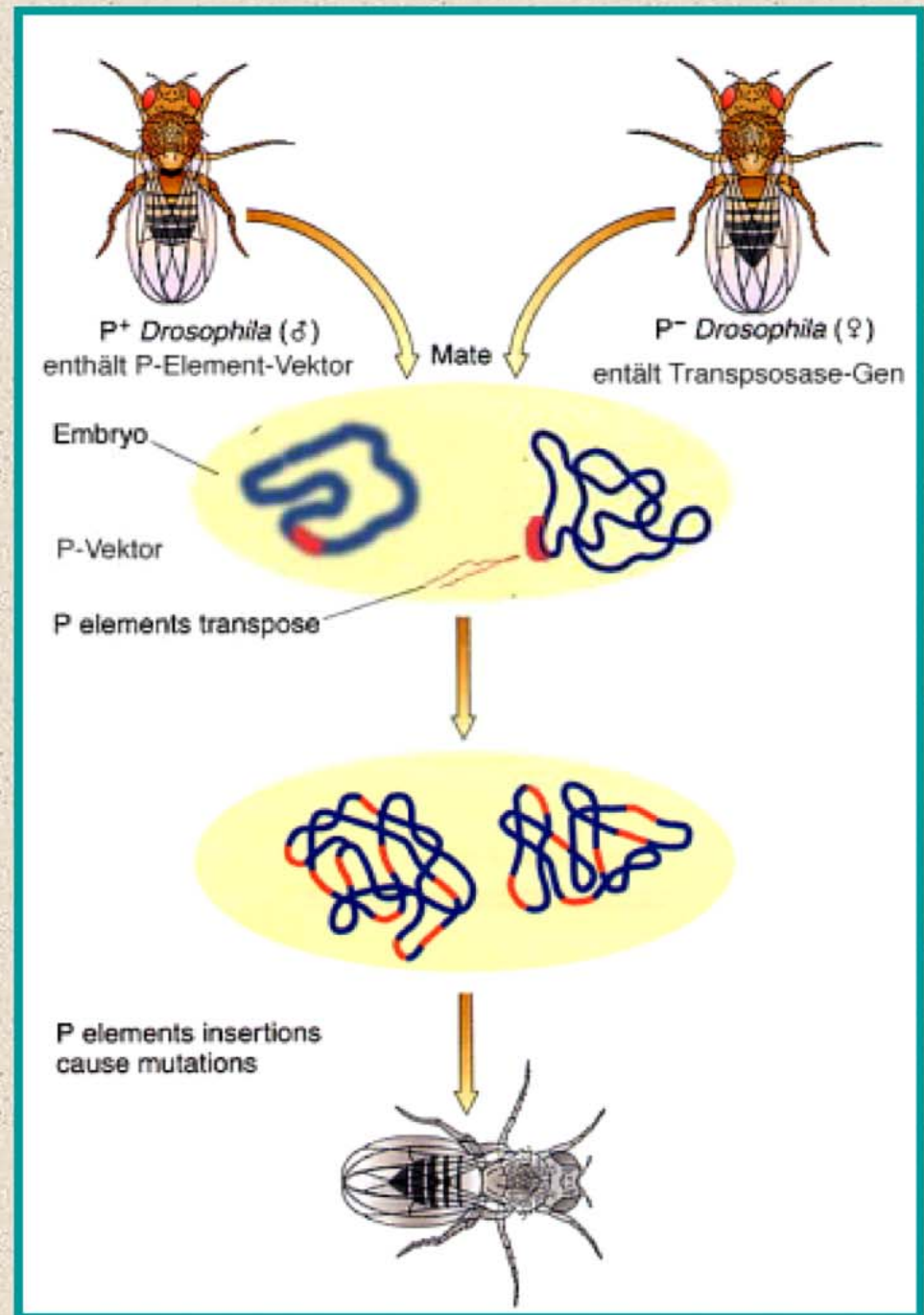
„Enhancertrap“-Methode



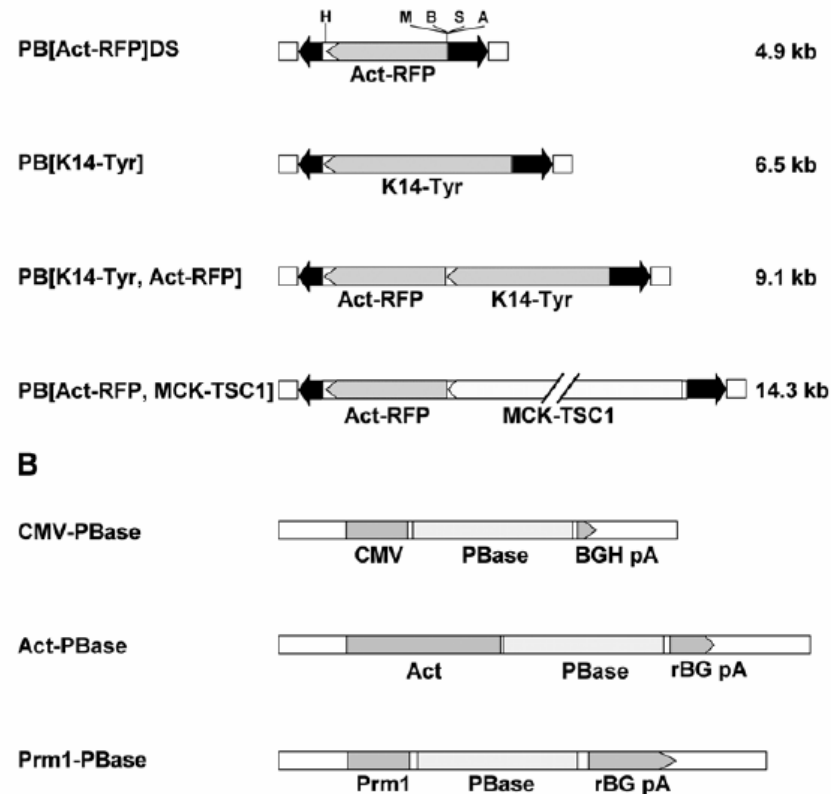
Mit der Enhancer-Trap-Methode lassen sich sehr spezifisch exprimierte Gene erkennen



Künstlich
eingeführte P-
Elemente
können zur
Mutagenese
verwendet
werden



PiggyBac-Transposon aus *Trichoplusia ni* (Schmetterling) funktioniert in einer großen Bandbreite von Organismen inklusive der Maus



(A) PB donor constructs. Marker or endogenous genes (shaded boxes with arrows denoting transcription direction) driven by various promoters were placed between a pair of PB repeat termini (PBL and PBR, black arrows). Arrowheads above the termini show the relative positions of primers used for inverse PCR. Total lengths of the transposons are also indicated. Open boxes represent the plasmid backbone sequences. M: MfeI, B: BamHI, S: SmaI, A: AscI, H: HindIII.

(B) PB transposase helper constructs. The *piggyBac* transposase gene (PB_{ase}) driven by cytomegalovirus (CMV), β -actin (*Act*), or Protamine 1 (*Prm1*) promoters were followed by either bovine growth hormone polyA (BGH pA) or rabbit β -globin polyA (rBG pA).

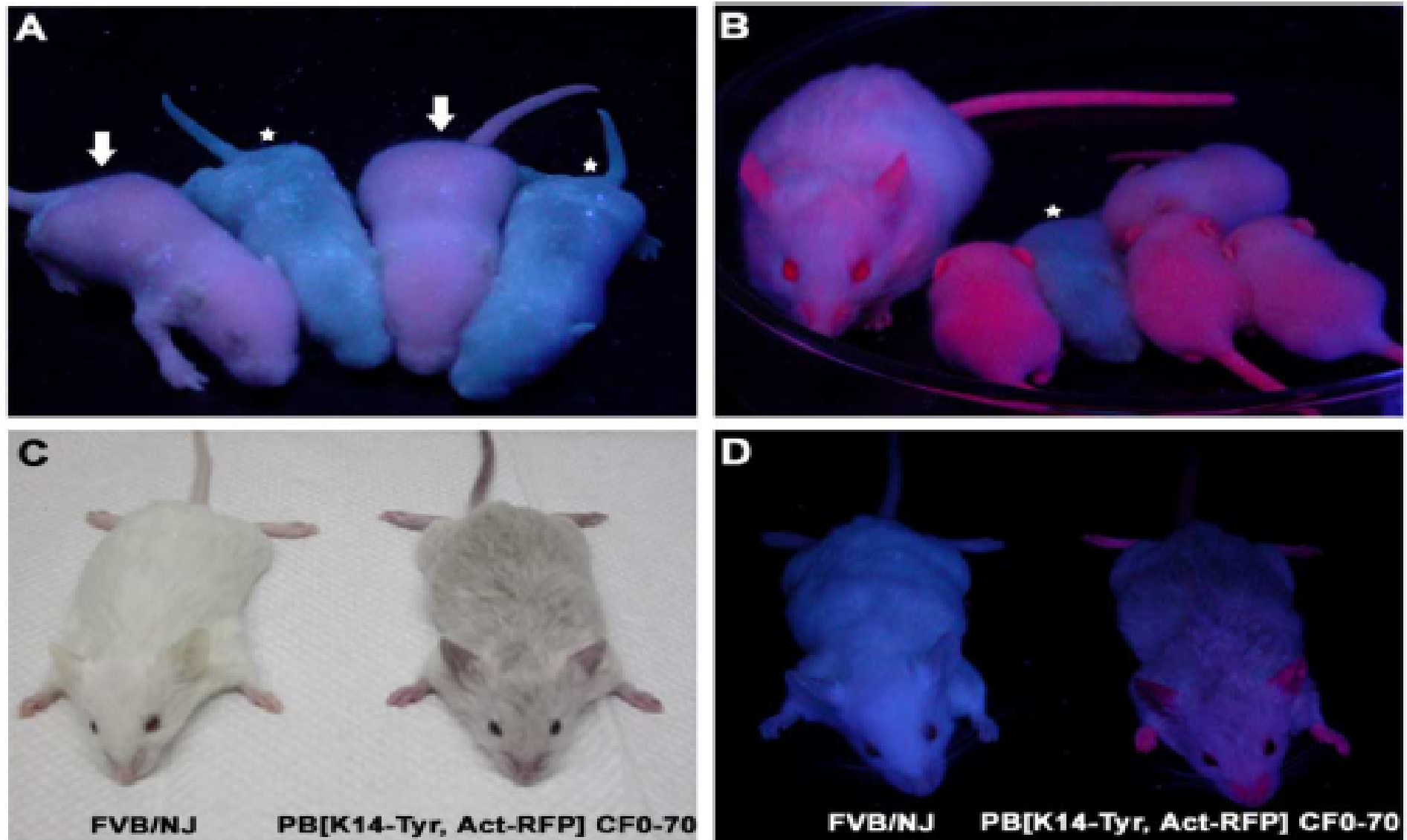
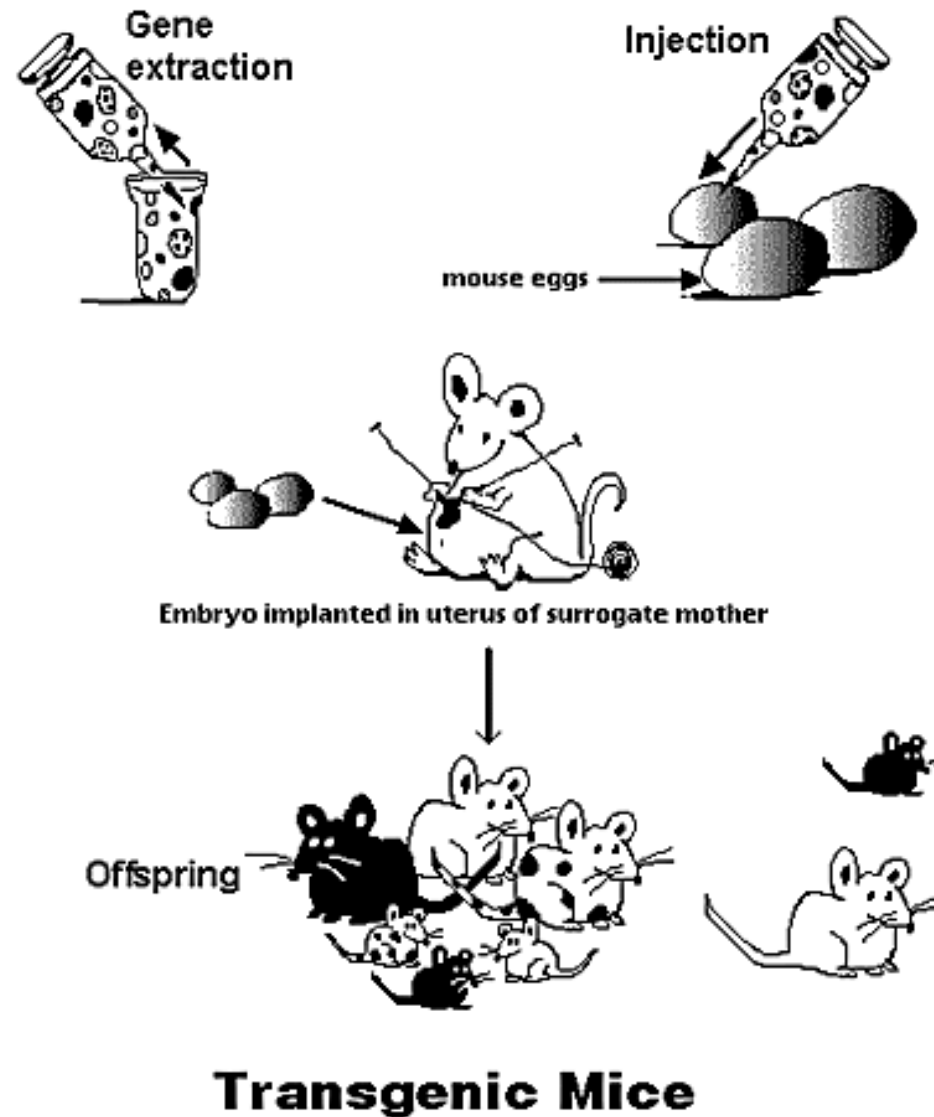


Figure 5. Expression of Transgenes in *piggyBac* Vectors

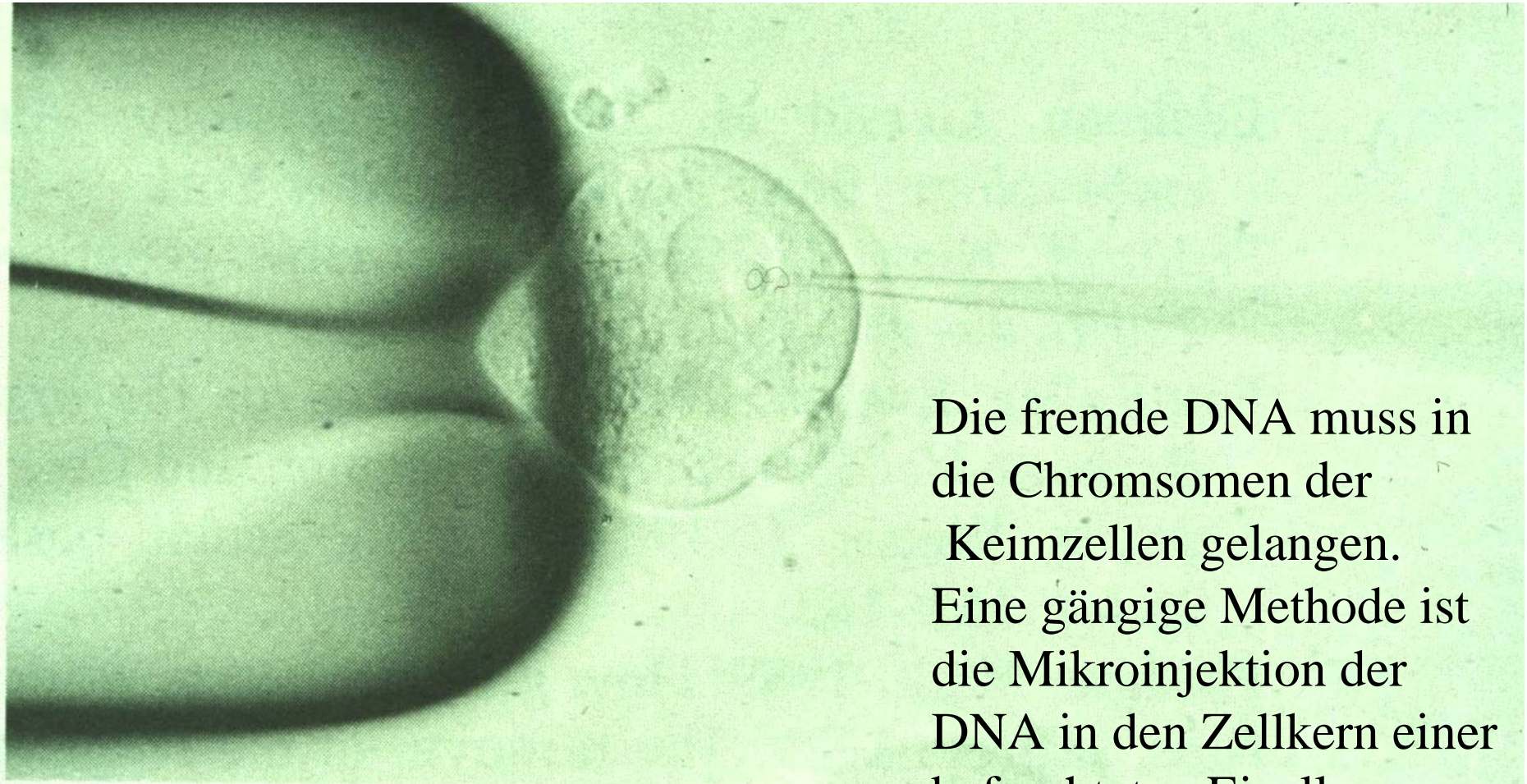
„Klassische“ DNA-vermittelte Transformation von Säugern

1. Transgene Mäuse durch DNA-Mikroinjektion
2. Transgene/knock out-Mäuse aus gentechnisch veränderten embryonalen Stammzellen

Herstellung einer transgenen Maus



**Gentechnologie an höheren Organismen ist komplizierter
als bei Bakterien wegen der Vielzelligkeit solcher Organismen**



Die fremde DNA muss in
die Chromsomen der
Keimzellen gelangen.
Eine gängige Methode ist
die Mikroinjektion der
DNA in den Zellkern einer
befruchteten Eizelle

Microinjection of a One-celled Mouse Embryo

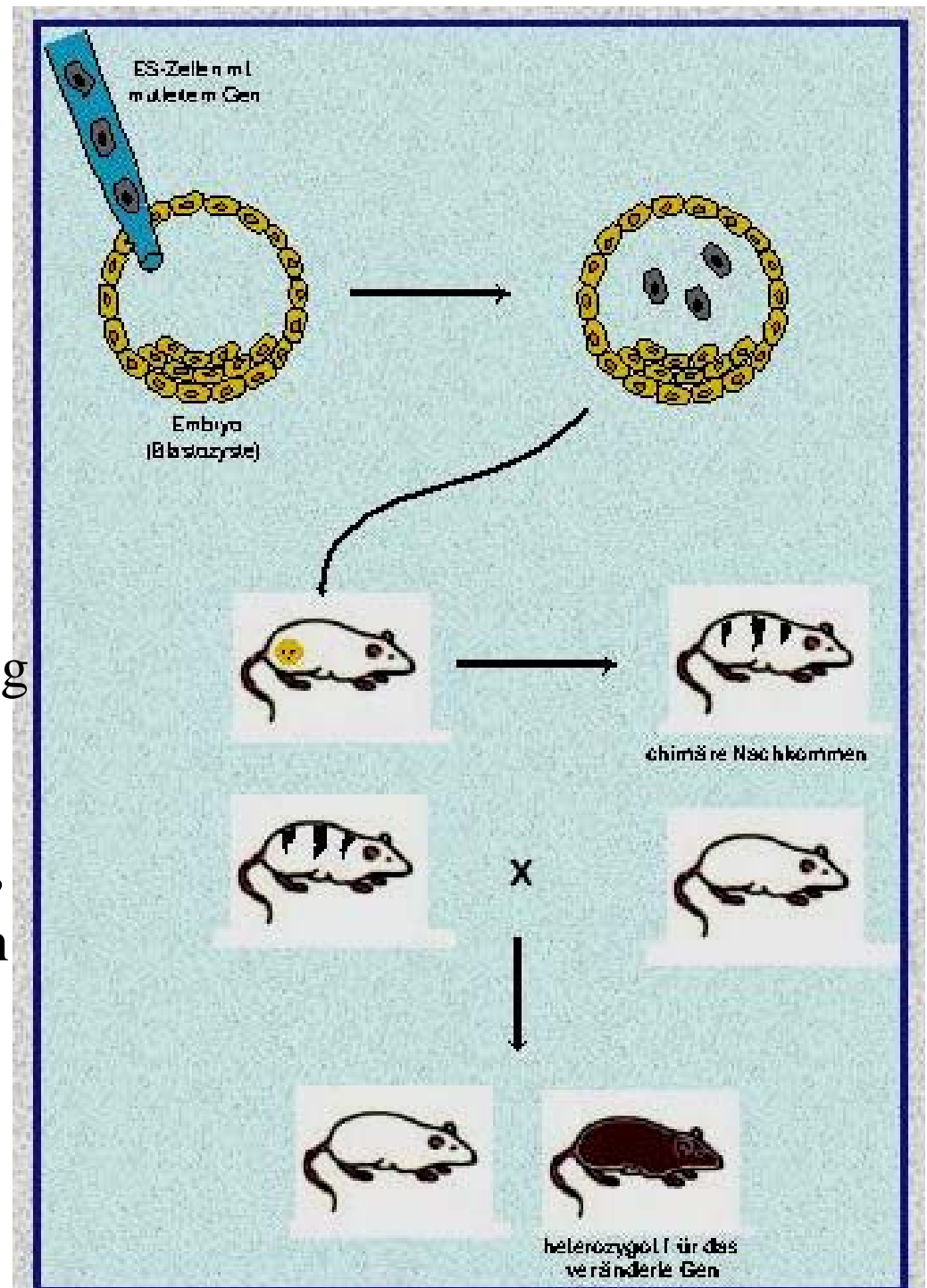
(Courtesy of Mark Steinhelper, Cold Spring Harbor Laboratory.)

Mit der DNA-Mikroinjektion ist es bei zahlreichen Tierarten gelungen, Gene dauerhaft in die Chromosomen zu integrieren

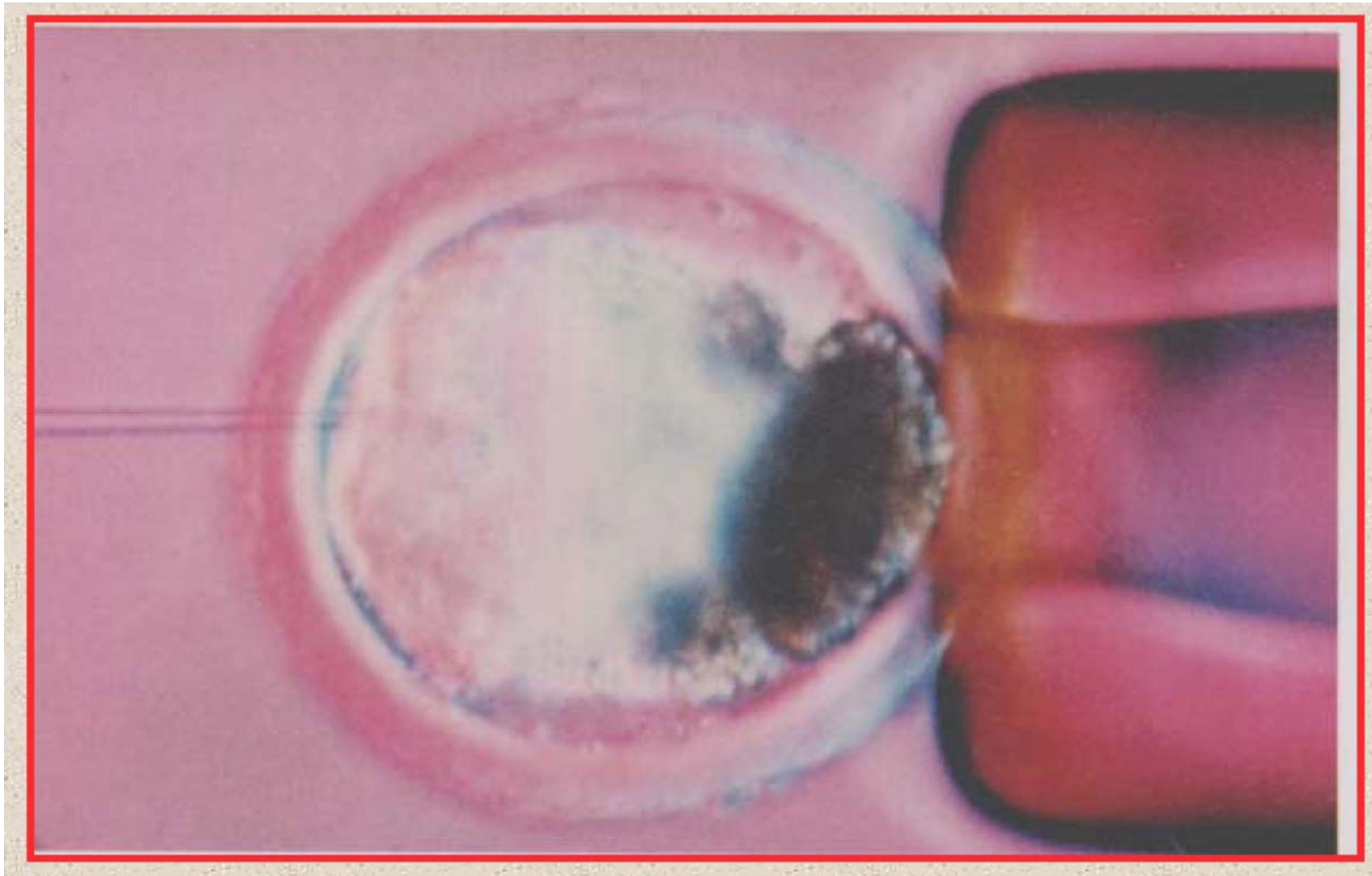
- Maus
- Rind
- Schwein
- Kaninchen
- Pferd
- Schaf

- Ratte
 - Lachs
 - Barsch
 - Forelle
 - Kaninchen
- und andere

Ein besonderes Verfahren zur Herstellung transgener Mäuse ist die Verwendung embryonaler Stammzellen (ES-Zellen: gentechnisch veränderte embryonale Stammzellen („schwarze“ Zellen in der Abb.) werden in einen frühen Embryo (Blastozyste) injiziert. Die ES-Zellen nehmen an der Entwicklung teil. Es entsteht ein chimäre Maus (erkennbar am gescheckten Fell). Auch die Keimzellen dieser Maus stammen z. T. von den transgenen ES-Zellen ab. Durch Kreuzung entstehen Mäuse, die von den transgenen ES-Zellen abstammen (schwarze Maus).



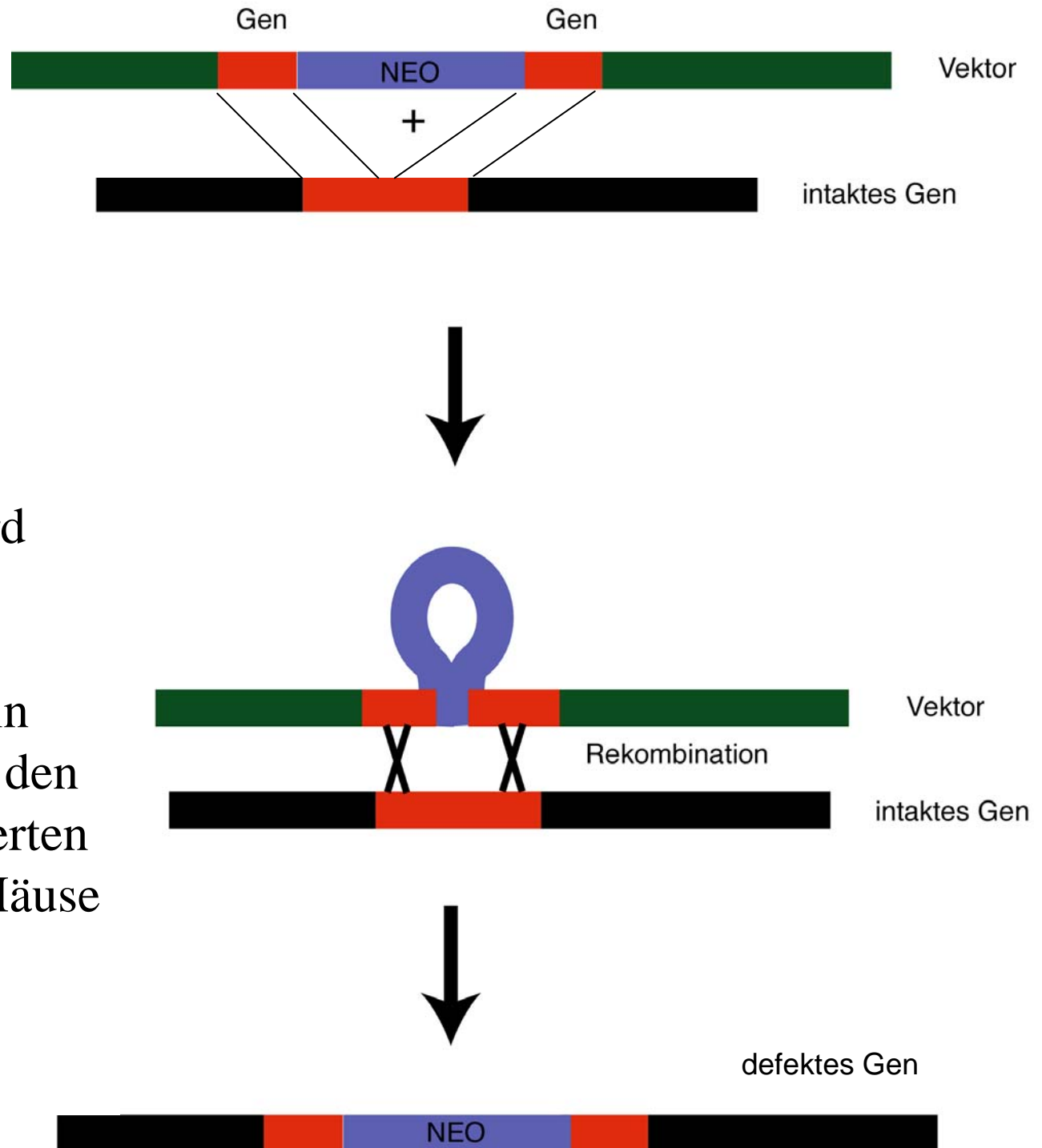
Injektion von embryonalen Stammzellen in eine Maus Blastozyste



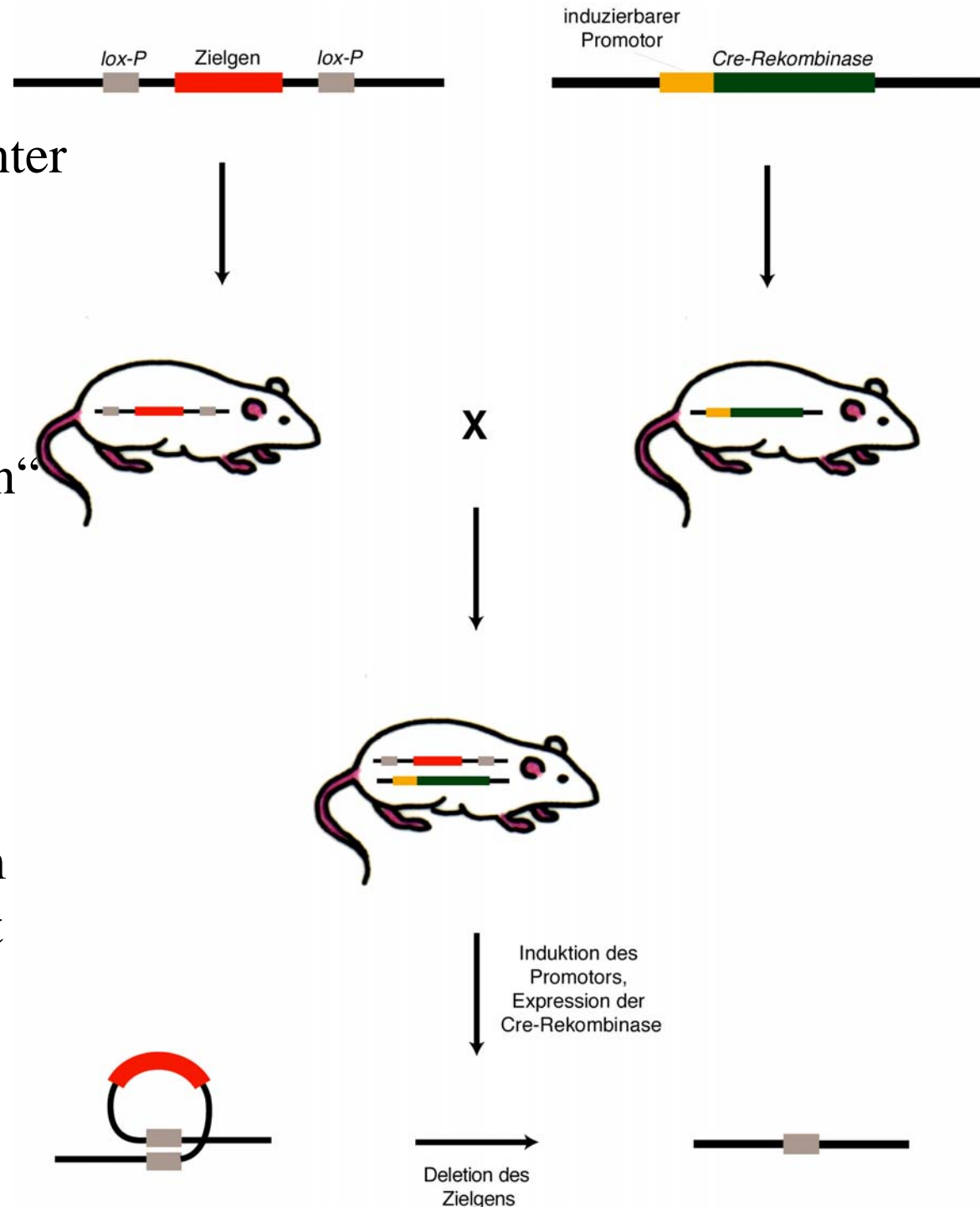
Maus-Chimären aus embryonalen Stammzellen-Transplantaten



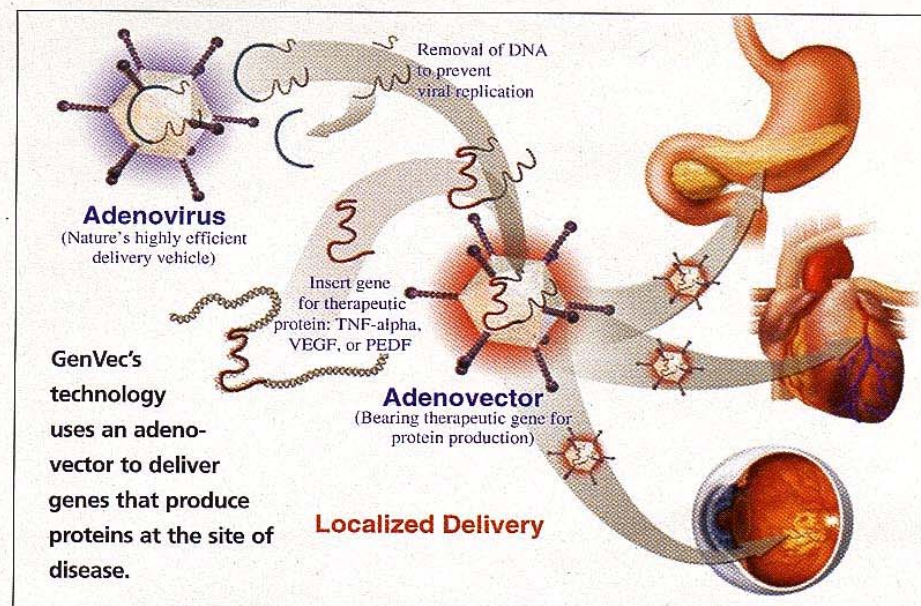
Ein besonderes Verfahren ist die Herstellung von so genannten „**knock out**“ (**k.o.**)-Mäusen: In einer ES-Zelle wird durch **homologe Rekombination** ein intaktes Gen durch ein defektes ersetzt. Aus den gentechnisch veränderten ES-Zellen werden Mäuse regeneriert mit dem defekten Gen (siehe vorherige Folie)



Der Knock-out kann auch „konditional“ sein, d. h. unter bestimmten Bedingungen, nach Belieben induziert werden, indem eine intakte Genkopie von zwei „Rekombinationssequenzen“ (z. B. lox-P-Sequenzen) flankiert in die Maus eingebaut wird. Durch Einkreuzen eines Rekombinase-Gens wird die Genkopie aus dem Chromosom heraus geworfen und damit funktionsunfähig



Gene therapy mit Hilfe von Stammzellen



Gene Activity Therapeutics Enter Phase II Trials

Bonnie Joy Sedlak, Ph.D.

The United States suspended three gene therapy trials for SCID (Severe Combined Immunodeficiency) after two of the ten French boys originally treated for SCID developed leukemia at about two and a half years of age.

All the boys in France were cured of the genetic disorder and all but two are healthy. Scientists found that in both cases the retrovirus used to deliver the gene was inserted in or near *LMO-2*, a cancer-promoting gene.

The boys were treated in 1999 when they were between one and eleven months old. The ex vivo gene therapy protocol took the boy's bone marrow stem cells, used retroviral vectors to deliver the missing gene, and injected the treated cells back into the boys. The two boys who developed can-



Klonierte schweine

Was ist Totipotenz, was ist Pluripotenz?

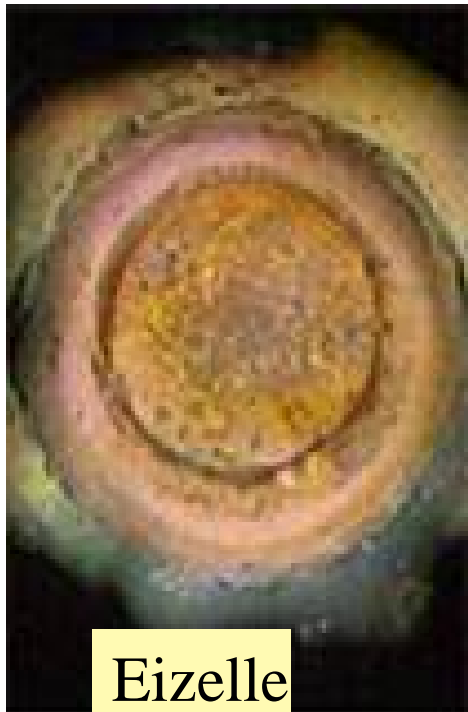
- **Totipotenz:** die Zellen sind in der Lage sich in alle in einem Organismus jemals vorhandene Zellen zu differenzieren (z. B. auch in Trophoblastenzellen)
- daraus folgt: aus solchen Zellen kann sich ein Mensch entwickeln
- **Pluripotenz:** die Zellen können sich noch in sehr viele verschiedene Zellen differenzieren, aber nicht mehr in alle (z. B. nicht mehr in Trophoblasten-Zellen)

Totipotente Zellen können
sich in Zellen aller drei
Keimblätter entwickeln

- **Ektoderm**
- **Endoderm**
- **Mesoderm**

**Was sind (embryonale)
Stammzellen?
Wozu brauchen wir sie?**

Ein Organismus entwickelt sich
aus einer einzigen Zelle:
der befruchteten Eizelle



Eizelle



Zweizellstadium



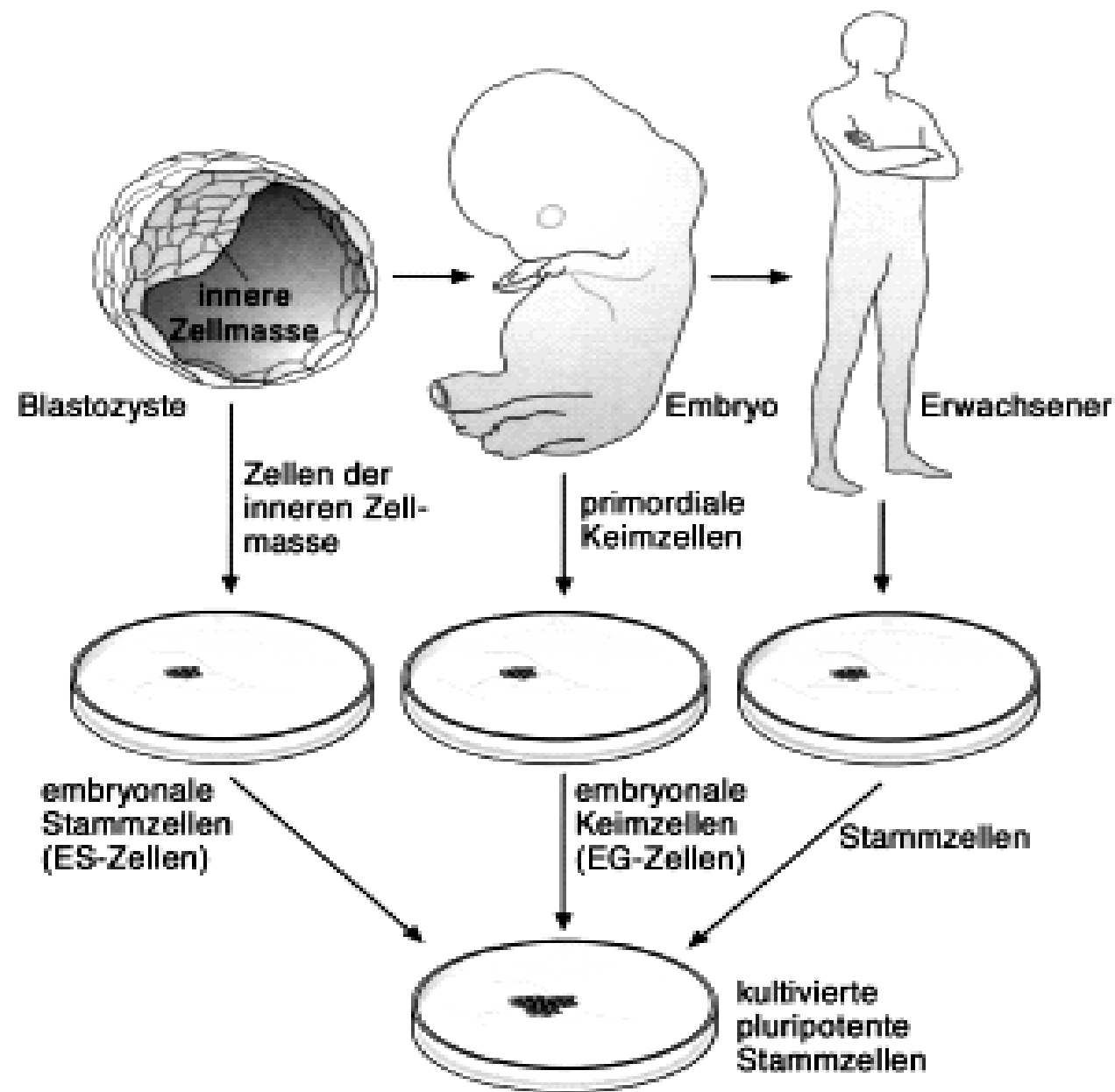
Achtzellstadium

Es gibt verschiedene Arten von Stammzellen:

- embryonale Stammzellen (ES-Zellen)
- embryonale (fetale) „Keim“-Stammzellen (EG-Zellen, von „**e**mbryonic **g**erm cells“)
- adulte Stammzellen
z. B. hämatopoetische Stammzellen aus Knochenmark

Die verschiedenen Stammzellen werden nach ihrer Herkunft benannt

- ES-Zellen werden aus frühen Embryonen gewonnen
- EG-Zellen werden aus primordialen Keimzellen aus Foeten isoliert
- „Adulte“ Stammzellen werden aus verschiedenen Organen (Knochenmark, Gehirn, Blut, Leber, Retina etc) gewonnen



Quellen für Stammzellen aus menschlichen Geweben, verändert nach Gearhart, J.D. (2001, Potential der Stammzellenforschung für die Regeneration von Geweben und Organen, in BMBF, Humane Stammzellen, Schattauer Verlag, Seite 7)

Die verschiedenen Stammzellen unterscheiden sich in ihren Eigenschaften

- **ES-Zellen** und **EG-Zellen** sind pluripotent (differenzieren zu Zellen aller drei Keimblätter) und bilden sog. „embryonic bodies“ in Kultur
- **ES-Zellen** wachsen besser (>500 Verdopplungen) in Zellkultur als **EG-Zellen** (max. 80 Verdoppl.)
- **ES-Zellen** bilden Teratome, **EG-Zellen** keine T.
- **Adulte Stammzellen** sind nicht pluripotent, die Plastizität der Zellen ist noch nicht abschließend geklärt

Gewinnung von Stammzellen

ES-Zellen werden
aus frühen
Embryonen im
Blastocysten-
stadium
gewonnen

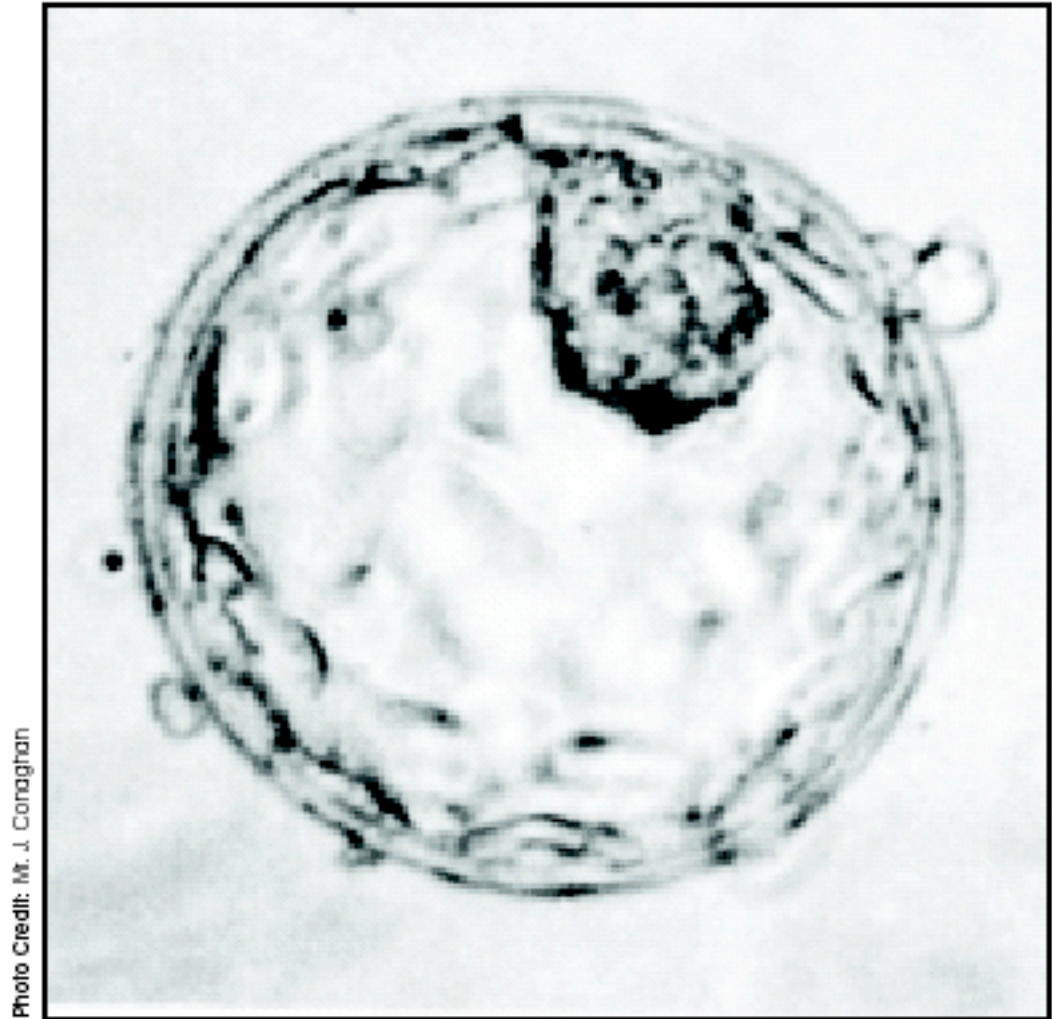


Photo Credit: Mt. J. Coraighan

Figure 3.1. Human Blastocyst Showing Inner Cell Mass and Trophectoderm.

Entnahme embryonaler Stammzellen

