©Ver. zur Verbr.naturwiss. Kenntnisse, download unter www.biologiezentrum.at



# Gentransfer in höhere Eukaryonten

## von Florian Rüker, Wien

Mit Hilfe der Methoden der DNA-Rekombination ist es möglich geworden, eine Vielzahl von Genen zu isolieren und zu charakterisieren. Die funktionelle Analyse dieser Gene wurde durch die Entwicklung von Methoden, diese in aktive, biologische Zellen zu transferieren, ermöglicht. In Kombination mit der in vitro Manipulation der DNA konnten Genabschnitte, die für die **Regulation der Genexpression** verantwortlich sind, untersucht werden. Neuere Arbeiten auf diesem Gebiet beschäftigen sich mit der Untersuchung der molekularen Grundlagen der **Entwicklung,** der **Differenzierung** und der **neoplastischen Transformation.**

Bedeutende Fortschritte wurden auch in der **Gentherapie** erzielt:

* Es ist heute z. B. möglich, Punktmutationen, d. h. Mutationen, die durch den Austausch eines einzelnen Nucleotids der DNA entstehen, zu korrigieren. Man bedient sich dazu in vitro mutierter Transfer-RNA-Gene, welche ein der Genmutation entsprechend mutiertes Antikodon enthalten.

©Ver. zur Verbr.naturwiss. Kenntnisse, download unter www.biologiezentrum.at



* In Tiermodellen wurde gezeigt, daß Gene, welche im Organismus nicht oder nicht genügend stark exprimiert werden, in explantierte Zellen des Organismus eingeführt werden können. Nach Reimplantation der transformierten Zellen wurde das entsprechende Gen in den betreffenden Zellen des Organismus exprimiert.
* Es ist nicht nur möglich, fehlende Gene zu ersetzen, es ist auch möglich, die Expression von Genen selektiv zu unterdrücken. Ist die Nukleotidsequenz eines Genes bekannt, so ist es möglich, eine Zelle dazu zu veranlassen, komplementäre messenger-RNA zu produzieren. Dieser komplementäre Messenger hybridisiert dann mit dem Messenger desjenigen Genes, welches man unterdrücken möchte und inaktiviert diesen, da die Transfer-RNA keine Möglichkeit mehr hat, zu binden.

Für den Biotechnologen bedeutsam ist die Möglichkeit, Proteine in großen Mengen herstellen zu können. Am Beginn des Zeitalters der DNA-Rekombination glaubte man, alle diese Probleme mit Hilfe von Bakterien lösen zu können. Sehr bald mußte man jedoch feststellen, daß Bakterien zum Teil andere Mechanismen der Protein-Produktion haben. So sind bakterielle Proteine z. B. nicht glycosiliert. Auch der Aufbau der dreidimensionalen Struktur komplexer Proteine wird von Bakterien anders vollzogen als von tierischen Zellen (siehe Abb. 1). Dies sind Faktoren, die für die Funktionalität eines Proteins von großer Bedeutung sind. Man ist deshalb, besonders wenn es

©Ver. zur Verbr.naturwiss. Kenntnisse, download unter www.biologiezentrum.at



um kompliziert aufgebaute Proteine geht, dazu übergegangen, diese in tierischen Zellen zu produzieren. Tierische Zellen eignen sich gut zur Massenproduktion, sie haben die Fähigkeit der Glycosilierung und können auch sehr komplexe dreidimensionale Strukturen aufbauen.

| | Vorteile | Nachteile |
|---|---|---|
| **Bakterien** | Massenproduktion | Komplexe Proteine<br>keine Ausschleusung<br>keine Glycosilierung |
| **Hefen** | Massenproduktion | (komplexe Proteine)<br>manchmal möglich, z.B.TPA<br>(Glycosilierung):<br>vorhanden, oft anders |
| **Tierische Zellen** | Massenproduktion<br>Glycosilierung<br>Ausschleusung<br>Komplexe Proteine | Kontamination (z. B. Viren, Oncogene)<br>Teuer |

**Abb. 1:** Herstellung von Proteinen durch genetisch manipulierte Zellen (Mikroorganismen). Vor- und Nachteile der Verwendung von Bakterien, Hefen bzw. tierischen Zellen.

Im folgenden soll ein Überblick über einige Prinzipien und Methoden des Gentransfers in tierische Zellen gegeben werden.

## 1. Methoden des Gentransfers

● Die direkteste Methode, um Gene in tierische Zellen einzubringen, stellt die *Mikroinjektion* dar.

©Ver. zur Verbr.naturwiss. Kenntnisse, download unter www.biologiezentrum.at



Man bedient sich dabei sehr feiner Glaskapillaren, mit denen es möglich ist, direkt in das Cytoplasma oder auch in den Kern einer Zelle kleine Flüssigkeitsmengen, in denen die DNA gelöst ist, zu injizieren. Die Mikroinjektion ist eine sehr effiziente Methode. Der einzige Nachteil ist der relativ hohe Arbeitsaufwand.

● Eine Methode, die bei gewissen Zelltypen mit großem Erfolg angewendet wird, ist die *Calciumphosphat-Präzipitation der DNA*. Einer phosphathältigen DNA-Lösung werden Calcium-Ionen zugegeben, wodurch Calciumphosphat ausfällt. Dieser Niederschlag hat die Eigenschaft, DNA zu binden. Die so behandelte DNA kann unter gewissen Bedingungen von Zellen aufgenommen werden. Der Wirkungsmechanismus dieser Methode ist weitgehend unbekannt.

● Die Verwendung oberflächenaktiver Substanzen wie z. B. *DEAE-Dextran* brachte bei verschiedenen Zelltypen Erfolge, die Ausbeuten an transformierten Zellen sind im allgemeinen aber gering.

● Entfernt man von Bakterien durch enzymatische Behandlung die Zellwand, so erhält man *Protoplasten*. Diese Protoplasten können mit tierischen Zellen fusioniert werden, wodurch Gene direkt von Bakterien in tierische Zellen eingeschleust werden können.

● Eine neue Methode, die auf viele Zelltypen anwendbar und relativ einfach auszuführen ist, stellt

©Ver. zur Verbr.naturwiss. Kenntnisse, download unter www.biologiezentrum.at



die *Elektroporation* dar. Es wurde beobachtet, daß durch hochgespannte elektrische Pulse Poren in Membranen induziert werden können. Durch diese Poren diffundieren Substanzen, wie z. B. aus dem Medium, in dem sich die Zellen befinden, in das Innere der Zellen.

**2. Schicksal der transferierten DNA**

Mit Ausnahme der Mikroinjektion, mit der es, wie oben erwähnt, möglich ist, DNA direkt in den Zellkern zu injizieren, erleichtern alle anderen erwähnten Methoden bloß den Durchtritt der DNA durch die Zellmembran. Um exprimiert zu werden, muß die DNA in der Folge durch das Cytoplasma zum Kern gelangen und in diesen eindringen. Wie das in der Zelle funktioniert, ist weitgehend unbekannt. Im Kern baut sich die DNA meistens nicht gleich in ein Chromosom ein, sondern liegt während ein bis zwei Zellteilungen, bis zu 48 Stunden lang, extrachromosomal vor. Meistens wird die DNA während dieser Phase nicht repliziert, sie wird aber exprimiert, was durch biochemische Analyse der Genprodukte nachweisbar ist. Um stabil in der Zelle erhalten zu bleiben, muß die DNA in ein Chromosom eingebaut werden. Da die Häufigkeit dieses Ereignisses ($10^{-2}$ — $10^{-6}$) relativ gering ist, ist es nötig, transformierte Zellen in Selektionsmedien anzureichern.

Eine dritte Möglichkeit besteht in der Verwendung gewisser Zelltypen in Verbindung mit Vektoren, die

©Ver. zur Verbr.naturwiss. Kenntnisse, download unter www.biologiezentrum.at



auf der Basis bestimmter Viren konstruiert wurden. Als Beispiel soll hier der Rinder-Papillomavirus erwähnt werden, der die Fähigkeit besitzt, ohne Integration in das Chromosom, also autonom zu replizieren. Die DNA stabilisiert sich dann extrachromosomal.

**3. Vektorkonstruktion**

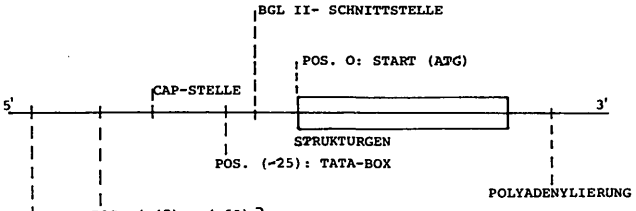
Als Beispiel für die Vorarbeiten, die nötig sind, um einen Expressionsvektor für tierische Zellen zu konstruieren, soll hier in groben Umrissen gezeigt werden, wie die regulatorischen Teile und das Strukturgen der Tymidinkinase (TK) von Herpes simplex Virus (HSV) kloniert, analysiert und manipuliert wurden. Voraussetzung für diese Arbeiten war das Vorhandensein einer Tymidinkinase-negativen ($TK^-$) Mauszellinie. Diese Zellinie wurde mit HSV infiziert, und man beobachtete Klone, die sowohl Genotyp als auch Phänotyp von $TK^-$ zu $TK^+$ geändert hatten. Die Folgerung aus diesen Experimenten war: HSV verfügt über ein in Maus-Zellen funktionelles TK-Gen.

Analoge Experimente wurden sodann mit UV-inaktiviertem HSV sowie mit gereinigter HSV-DNA durchgeführt. In beiden Fällen blieb die Aktivität des TK-Gens erhalten. Um den Abschnitt der HSV-DNA, der die TK-Aktivität trägt, näher zu identifizieren, wurde sodann die HSV-DNA mit verschiedenen Restriktionsenzymen geschnitten, und ein Restriktionsenzym identifiziert, welches die TK-Aktivität

©Ver. zur Verbr.naturwiss. Kenntnisse, download unter www.biologiezentrum.at



nicht beeinflußt. Mit Hilfe dieses Restriktionsenzyms konnte ein 3,4 Kilobasenpaare langes Fragment von HSV-DNA isoliert werden, welches immer noch die Eigenschaft hatte, $TK^-$ Zellen zu $TK^+$ Zellen zu transformieren. Dieser 3,4 Kilobasen DNA-Abschnitt wurde sodann kloniert und eingehend analysiert. Man gelangte in der Folge zu einem funktionellen Plan des TK-Gens, welcher in Abbildung 2 dargestellt ist.




BGL II (= RESTRIKTIONSENZYM) TRENNT REGULATORISCHEN TEIL VON STRUKTURGEN.

**Abb. 2:** Ungefähre Position der regulatorischen Regionen und des Strukturgens von Herpes simplex Thymidinkinase.

| | |
|---|---|
| CAP - Stelle: | Beginn der messenger-RNA. Bis zur Pos. 0 befinden sich die sogenannten 5'-nicht translatierten Regionen. |
| TATA-Box: | T A T A/T A T A. Basensequenz, welche essentiell für Transkription ist. |
| Bgl II: | Restriktionsenzym, welches im TK-Gen zwischen regulatorischem Teil und Strukturgen schneidet. |
| Polyadenylierung: | befindet sich am Ende der 3'-nicht translatierten Regionen. poly-A-Schwanz vermittelt Bindung der messenger-RNA an Ribosom. |

©Ver. zur Verbr.naturwiss. Kenntnisse, download unter www.biologiezentrum.at



**4. Selektierbare Gene (Selektionsmarker)**

Da, wie erwähnt, die stabile Transformation von Zellen ein eher seltenes Ereignis ist, ist es nötig, Selektionsmarker einzusetzen, welche das Isolieren der transformierten Zellen ermöglichen. Dazu gibt es prinzipiell zwei Möglichkeiten:

1. **rezessiv:** Rezessive Marker sind solche, die nur in Zellen angewandt werden können, welche einen bestimmten Defekt haben. Dieser Defekt ist zwar nicht tödlich für die Zellen, ermöglicht aber nach Komplementierung durch den Selektionsmarker das Überleben in entsprechend modifizierten Kulturmedien, während nicht transformierte Zellen, also solche, die den Selektionsmarker nicht eingebaut haben, zugrunde gehen.
2. **dominant:** Oft ist es nicht leicht, entsprechende Mutanten von Zellen zu erhalten, um rezessive Selektionsmarker einsetzen zu können. In solchen Fällen ist die Anwendung dominant wirkender Marker nötig. Diese stellen Gene dar, welche für Enzyme kodieren, die gewisse für die Zelle toxische Substanzen entgiften. Dadurch wird transformierten Zellen in Gegenwart dieser toxischen Substanzen das Überleben ermöglicht, während nicht transformierte Zellen absterben.

Zusammenfassend kann gesagt werden, daß durch die Möglichkeit, klonierte Gene in tierische Zellen einzuschleusen, sowohl für die Grundlagenforschung als

©Ver. zur Verbr.naturwiss. Kenntnisse, download unter www.biologiezentrum.at



auch für die „Anwender" bedeutende Einblicke und Möglichkeiten eröffnet wurden. Als Beispiel für eines der heute besonders intensiv bearbeiteten Gebiete der Grundlagenforschung sei hier das Krebsproblem erwähnt, welches in innigem Zusammenhang mit Fragen der Entwicklung und Differenzierung, aber auch mit Mutationsauslösung und Korrektur sowie mit der Molekularbiologie bestimmter Viren zu sehen ist.

Die industrielle Bedeutung der Kultivierung tierischer Zellen liegt bei der Produktion von komplex aufgebauten Proteinen, wie z. B. Antikörpern, Faktor VIII (Antihämophiliefaktor), Interferone sowie von Untereinheiten von Viren (z. B. Hepatitis B), welche als Vakzine eingesetzt werden können.

**5. Literatur**

R. KUCHERLAPATI, A. I. SKOULTCHI (1984): Introduction of purified genes into mammalian cells. Critical Reviews in Biochemistry 16 (4): 349-379.

J. R. WARR (1984): Genetic engineering in higher organisms. The Institute of Biology's studies in biology No 162. Edward Arnold (Publishers) Ltd., London.

J. D. WATSON, J. TOOZE, D. T. KURTZ (1985): Rekombinierte DNA. Eine Einführung. Spektrum der Wissenschaft Verlagsgesellschaft, Heidelberg.

**Anschrift des Verfassers:**
Univ. Assist. Dipl.-Ing. Florian Rüker
Institut f. angewandte Mikrobiologie d.
Universität f. Bodenkultur
Peter-Jordan-Straße 82
A-1190 WIEN

# ZOBODAT - www.zobodat.at

Zoologisch-Botanische Datenbank/Zoological-Botanical Database

Digitale Literatur/Digital Literature

Zeitschrift/Journal: Schriften des Vereins zur Verbreitung naturwissenschaftlicher Kenntnisse Wien

Jahr/Year: 1987

Band/Volume: 126

Autor(en)/Author(s): Rüker Florian

Artikel/Article: Gentransfer in höhere Eukaryonten. 63-71