

Für eine Knockout-Maus nach Sendai

David DREWS
Charité Universitätsmedizin Berlin
Freie Universität Berlin

Ich habe immer davon geträumt, eines Tages nach Japan zu fahren und eventuell auch längere Zeit dort zu verbringen. Das Land hat mich schon immer interessiert, nicht wegen des oft erwarteten „Kulturschocks“, der Reizüberflutung oder der fortschrittlichen Technologie, sondern wegen der Mentalität. Ich war von der zurückhaltenden Art der Japaner fasziniert, ein Verhalten, wie ich es aus keiner anderen Kultur kannte.

Ich habe an der Technischen Universität medizinische Biotechnologie studiert und danach eine naturwissenschaftliche Doktorarbeit in der molekularen Neonatologie der Charité – Universitätsmedizin, Berlin begonnen. Bereits nach vier Wochen fragte mich mein Chef, ob ich mir vorstellen könne, für sechs Monate nach Japan zu gehen, um eine Knockout-Maus zu züchten. Ich zögerte keine Sekunde und freute mich über den Vorschlag. Jedoch sollte es noch zwei Jahre dauern, bis sich der Plan in die Tat umsetzen lies und ich mit einem Kurzstipendium des DAAD für ein halbes Jahr an die Tōhoku Universität in Sendai gehen konnte. Sendai ist die größte Stadt im Norden der Hauptinsel Honshū und hat etwa eine Million Einwohner. Bekannt ist die Stadt durch ihren Berühmten Stadtherrn Date Masamune (Abb. 1), einem in Japan sehr populären Samurai, und durch Matsushima (Abb. 2), einer der drei schönsten Landschaften Japans. Jedoch kann Sendai in der Popularität nicht mit Tōkyō oder Kyōto mithalten und ist daher eher selten Ziel für ausländische Touristen. Die Mehrheit der ausländischen Gäste besteht meiner Erfahrung nach aus Studenten, die an der Tōhoku Universität studieren. Die Universität hat einen sehr guten Ruf in Japan und lockt auch viele japanische Studenten aus der Region an. Ich habe in der Arbeitsgruppe von Prof. Yamamoto Masayuki gearbeitet, der unter anderem ein Spezialist auf dem Gebiet des Gen-Knockouts ist.



Abbildung 1: Bronzestatue des Date Masamune am ehemaligen Standort des Stadtschlusses von Sendai



Abbildung 2: Die Bucht von Matsushima

Ich bin mit dem Ziel nach Sendai gegangen, eine Knockout-Maus zu züchten, bei der das Gen Yin Yang 2 (YY2) ausgeschaltet ist. In meiner Doktorarbeit beschäftige ich mich mit der Biologie des Gens YY2 und versuche herauszufinden, welche Funktionen es im Körper des Menschen bzw. der Maus übernimmt. Bisher wurde die Biologie des YY2 nur wenig charakterisiert. Jedoch konnten eigene Studien zeigen, dass das YY2 unabhängig reguliert wird¹ und eine Rolle bei der Entwicklung des Gehirns spielen könnte. Es sind je nach Stadium der Entwicklung und Gewebe unterschiedliche Mengen an YY2 nachweis-

bar². Daher wäre es interessant zu untersuchen, welche Auswirkungen das Ausschalten des YY2 im Organismus nach sich zieht. Die derzeit beste Möglichkeit dafür ist, dieses Gen im Erbgut einer Maus zu entfernen und zu beobachten welche Veränderungen dieser Eingriff verursacht. Um das Verfahren des Knockouts zu erklären, sollen dazu zuerst einige Grundlagen erläutert werden.

Was ist ein Gen?

Ein Gen ist ein Abschnitt im Erbgut (DNS) jedes Lebewesens, also auch dem Menschen und der Maus. Der Mensch besitzt nach Schätzungen ca. 25.000 verschiedene Gene, wobei die Zahlen stark variieren. Gene enthalten die Erbinformationen für die Bildung von Proteinen, die nicht nur biologische Prozesse steuern, sondern auch alle Strukturen wie Haare, Haut und Knochen bilden. Bei einem Knockout werden zwar die Gene ausgeschaltet, aber Ziel ist es eigentlich, die daraus gebildeten Proteine aus dem Organismus zu entfernen. Das in meiner Doktorarbeit untersuchte Gen YY2 kodiert für das Protein mit derselben Bezeichnung. Wie bereits oben erwähnt, ist die Funktion des YY2 noch weitgehend ungeklärt. Deshalb sollte es mittels eines Knockouts ausgeschaltet werden.

Warum werden Gene ausgeschaltet?

Jedes Gen bzw. dessen korrespondierendes Protein besitzt eine Funktion und ist Teil eines komplexen Netzwerks. Die Funktion sämtlicher Proteine und deren Zusammenspiel im Netzwerk sind jedoch noch nicht völlig verstanden und müssen untersucht werden. Hat ein Protein eine Funktion und ist Teil eines Netzwerks, wird sich das Fehlen dieses Proteins im Körper bemerkbar machen und z. B. je nach Funktion den Körper verändern oder eine Krankheit auslösen, da im Prinzip eine Kette unterbrochen wurde. Beispielsweise bewirkt das Ausschalten des Yin Yang 1-Gens das Versterben der Versuchstiere (Mäuse), da dieses Gen eine lebenswichtige Funktion bekleidet.³ In der Abbildung 2 sieht man eine Knockout-Maus (links) im Vergleich zu einer unveränderten „normalen“ Maus (rechts). Die Gliedmaßen der

Knockout-Maus sind stark verkürzt. Ursache hierfür war das Ausschalten des sogenannten Ror2-Gens, das also eine Funktion in der Ausbildung der Gliedmaßen hat.⁴ Das heißt, es ist möglich, über das Ausschalten eines Gens herauszufinden, welche Rolle es im Körper der Maus und letztendlich auch im Menschen übernimmt.

Prinzip eines Knockouts



Abbildung 3: Vergleich der Skelette einer Ror2 Knockout-Maus (links) mit einer unveränderten Maus (rechts). Die Ror2 Knockout-Maus zeigt deutlich verkürzte Gliedmaßen im Gegensatz zur normalen Maus.

Ein Knockout ist eine Genmanipulation, bei der ein Gen im gesamten Organismus (Maus) ausgeschaltet wird. Es gibt verschiedene Arten des Knockouts. Man unterscheidet zwischen gerichteter und ungerichteter Mutagenese. In diesem Artikel wird nur auf die klassische Variante der gerichteten Mutagenese eingegangen.

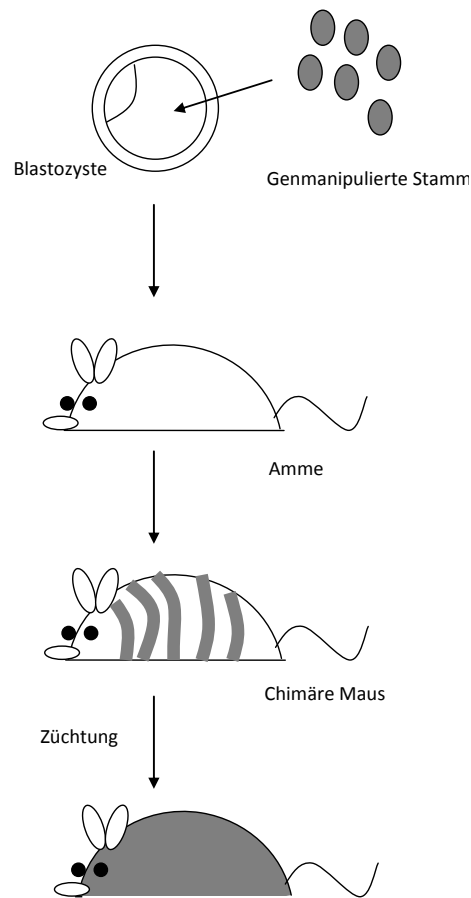
Zu Beginn wird dafür ein zirkulärer DNA-Strang (Vektor) hergestellt, der so konstruiert ist, dass er das gewünschte Gen in der DNS der Stammzelle ausschalten kann. Die dafür benötigten Stammzellen wurden zuvor isoliert. Es sind Zellen aus der frühen Entwicklung, die noch nicht auf einen bestimmten Zelltyp festgelegt sind und sich somit noch in jede beliebige Zelle entwickeln können. Der konstruierte Vektor wird in die Stammzellen transferiert und kann dort mit der DNS wechselwirken. Diese Interaktion bewirkt, dass das

gewünschte Gen entfernt wird. War diese gentechnische Manipulation erfolgreich, werden die Stammzellen in Blastozysten injiziert. Das Stadium der Blastozyste ist ein Teil der Embryonalentwicklung und wird mit 3,5 Tagen nach Befruchtung der Eizelle erreicht. Die Blastozyste besteht schon aus mehreren Zellen und ist die Stufe bevor sich der Embryo in die Gebärmutterschleimhaut einnistet. Nach der Injektion der genetisch manipulierten Stammzellen wird die Blastozyste in eine Leihmutter (Amme) verpflanzt und von ihr ausgetragen. Die manipulierten Stammzellen im Embryo können einen mehr oder weniger starken Einfluss auf die Entwicklung des Tiers haben. So entstehen Mischlinge, deren Gewebe sowohl aus normalen als auch aus genmanipulierten Zellen bestehen. Diese Mischlingstiere nennt man Chimären. Für eine Knockout-Maus werden Chimären benötigt, bei denen die manipulierten Stammzellen die Keimbahn betroffen haben, so dass die Manipulation weiter vererbt werden kann. Diese Chimären werden dann weiter verpaart bis ein Tier entsteht, dessen Zellen komplett die genetische Manipulation tragen (Abb. 3). Dieses Tier unterscheidet sich von der normalen Maus, da das jeweilige ausgeschaltete Gen seine eigentliche Funktion nicht mehr aufrechterhalten kann.

Die YY2 Knockout-Maus

Für die Entstehung der YY2 Knockout-Maus waren sechs Monate vorgesehen. Diese Zeitspanne ist sehr optimistisch, da in der Forschung oft unvorhergesehene Probleme auftreten und die Rate der Misserfolge entsprechend hoch ist. Es gibt einige Versuche Gene auszuschalten, die nie in die Realität umgesetzt werden konnten. Der Grund dafür ist oft schwer zu analysieren, da die Natur sehr komplex ist.

Im Fall des YY2 Knockouts konnte nach dem halben Jahr noch kein Erfolg erzielt werden, da sich die Herstellung des Vektors für die gentechnische Manipulation der Stammzellen als sehr kompliziert



erwies. Jedoch konnte der Vektor schließlich vollendet werden. Die weiteren anstehenden Experimente werden in einer weiterführenden Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Yamamoto durchgeführt.

Arbeiten in der japanischen Forschung

Meine Erfahrung zum Thema Arbeiten in Japan bezieht sich auf den Bereich der biologischen Forschung und kann sich daher von den Erfahrungen in anderen Branchen unterscheiden. Für gewöhnlich schätzen Menschen das Leben in Japan als sehr befremdlich und schwierig ein, da man die Sprache – v. a. das Lesen – nicht schnell erlernen kann. Ich habe aber die Erfahrung gemacht, dass diese Befürchtungen nicht begründet sind. Gerade in Japan sind die Men-

schen immer bestrebt, Ausländern das Eingewöhnen sehr angenehm zu gestalten und sie bei schwierigen Situationen zu unterstützen, selbst wenn es sich um unbekannte Personen handelt. Das Arbeiten im Labor war ganz und gar nicht schwierig, da sich die Struktur, die Einrichtung an Geräten und Materialien, nicht von denen in Deutschland und wahrscheinlich in jedem anderen Labor in der Welt unterscheiden. In der Forschung gibt es schließlich allgemein gültige Regeln zum wissenschaftlichen Arbeiten und diese müssen überall eingehalten werden, um qualitativ hochwertige Resultate erzielen zu können. Somit konnte ich direkt mit dem Arbeiten beginnen, ohne mich erst an die Gegebenheiten gewöhnen zu müssen. Darüber hinaus ist die Wissenschaftssprache Englisch und jeder japanische Kollege muss diese Sprache beherrschen. Doch natürlich war es für japanische Kollegen, die bereits einen langjährigen Aufenthalt im Ausland hatten, einfacher und sie waren immer bemüht meine Forschung, meinen Aufenthalt und meine kulturelle Neugier zu unterstützen und sich auch über Wissen sowie kulturelle Unterschiede auszutauschen. Andere Kollegen waren dagegen eher schüchtern, was jedoch vermutlich auf die japanische Kultur zurückzuführen ist. Zurückhaltung wird als eine Form der Höflichkeit angesehen. Generell ist die Zusammenarbeit durch gegenseitige Achtung und Zuvorkommenheit geprägt, was eine sehr angenehme Arbeitsatmosphäre schafft und meiner Meinung nach Vorbildcharakter hat.

Fazit

Für mich war der Aufenthalt in Japan eine unvergessliche Erfahrung, die ich nicht missen und jedem empfehlen möchte. Ich konnte dabei nicht nur wertvolle Erfahrungen für meine wissenschaftliche Karriere machen, sondern auch Einblick in die japanische Kultur gewinnen. Ich möchte mich beim Deutschen Akademischen Austauschdienst (DAAD) für die Vergabe des Stipendiums bedanken. Ohne diese Förderung wäre dieser Forschungsaufenthalt nicht möglich gewesen. Durch diesen Aufenthalt konnte ich mich persönlich weiterentwickeln und habe viele neue Kontakte und Freunde gewonnen.

Referenzen

1. Klar, M., Drews, D., Dame, C. Transcriptional Activity of the Novel Identified Human YY2 Promoters is Modified by DNA Methylation. *Gene* 2009, 430:58–63.
2. Drews, D., Klar, M., Dame, C., Brauer, A.U. Developmental Expression Profile of the YY2 Gene in Mice. *BMC Dev Biol* 2009, 9:45.
3. Donohoe, M.E., Zhang, X., McGinnis, L., Biggers, J., Li, E., Shi, Y. Targeted Disruption of Mouse Yin Yang 1 Transcription Factor Results in Peri-Implantation Lethality. *Mol Cell Biol* 1999, 19:7237–44.
4. Wu, S., Ying, G., Wu, Q., Capecchi M.R. Toward Simpler and Faster Genome-Wide Mutagenesis in Mice. *Nat Genet* 2007, 39:922–30.

Abbildungsnachweise

- Abb. 1: www.daviddrews.blogspot.com
Abb. 2: www.daviddrews.blogspot.com
Abb. 3: Wu S. et al., 2007; 39: 922–30.
Abb. 4: David Drews