

# Transgene Mäuse in der Grundlagenforschung

Autor(en): **Gassmann, M. / Hennet, T. / Bauer, C.**

Objektyp: **Article**

Zeitschrift: **Schweizer Archiv für Tierheilkunde SAT : die Fachzeitschrift für Tierärztinnen und Tierärzte = Archives Suisses de Médecine Vétérinaire ASMV : la revue professionnelle des vétérinaires**

Band (Jahr): **140 (1998)**

Heft 5

PDF erstellt am: **10.07.2024**

Persistenter Link: <https://doi.org/10.5169/seals-590423>

## **Nutzungsbedingungen**

Die ETH-Bibliothek ist Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Inhalten der Zeitschriften. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern.

Die auf der Plattform e-periodica veröffentlichten Dokumente stehen für nicht-kommerzielle Zwecke in Lehre und Forschung sowie für die private Nutzung frei zur Verfügung. Einzelne Dateien oder Ausdrucke aus diesem Angebot können zusammen mit diesen Nutzungsbedingungen und den korrekten Herkunftsbezeichnungen weitergegeben werden.

Das Veröffentlichen von Bildern in Print- und Online-Publikationen ist nur mit vorheriger Genehmigung der Rechteinhaber erlaubt. Die systematische Speicherung von Teilen des elektronischen Angebots auf anderen Servern bedarf ebenfalls des schriftlichen Einverständnisses der Rechteinhaber.

## **Haftungsausschluss**

Alle Angaben erfolgen ohne Gewähr für Vollständigkeit oder Richtigkeit. Es wird keine Haftung übernommen für Schäden durch die Verwendung von Informationen aus diesem Online-Angebot oder durch das Fehlen von Informationen. Dies gilt auch für Inhalte Dritter, die über dieses Angebot zugänglich sind.

# Transgene Mäuse in der Grundlagenforschung

M. Gassmann, T. Hennet, C. Bauer

## Zusammenfassung

Was sind transgene Mäuse? Und was können wir aus ihnen lernen? In diesem Übersichtsartikel wird gezeigt, wie «klassische» transgene Mäuse sowie sogenannte «knock-out»-Mäuse entstehen. Erst der Einsatz genveränderter Mäuse ermöglichte es, die Funktion(en) einzelner Gene im Rahmen des Gesamtorganismus zu untersuchen und zu verstehen. Anhand einiger ausgewählter Beispiele wird das Potential der transgenen Technologie, die das Studium des Wechselspiels zwischen Zellen, Organen und Organsystemen in der Maus nachhaltig beeinflusst hat, illustriert.

**Schlüsselwörter:** transgene Maus – «knock-out-Maus» – embryonale Stammzellen – homologe Rekombination – embryonale Körperchen

## Einführung

Wie entstehen transgene Mäuse? Wie zuverlässig ist die Aussagekraft solcher genetisch veränderten Tiere für den Erkenntnisgewinn von biologischen Funktionen am intakten Organismus? Diese Fragen werden im Vorfeld der Genschutzinitiative sehr ausführlich, aber auch sehr kontrovers diskutiert. Vor allem wird immer wieder die Frage aufgeworfen, ob sich die Ergebnisse, die mit transgenen Tiermodellen gewonnen wurden, auch auf den Menschen übertragen lassen. Mit Tiermodellen sind hauptsächlich transgene Mäuse gemeint, da sie am häufigsten im Labor verwendet werden. Da viele Lebensvorgänge bei den Labortieren sehr ähnlich ablaufen wie beim Menschen, ist diese Frage zu bejahen. Ob dies für den Einzelfall vollumfänglich zutrifft, muss jeweils sorgfältig abgeklärt werden.

In der folgenden kurzen Abhandlung wird anhand von einigen Beispielen aufgezeigt, dass eine Wechselwirkung zwischen Zellen, Organen und Organsystemen stattfindet, welche die komplexen Reaktionen des *Gesamtorganismus* überhaupt erst möglich machen. Man bezeich-

## Transgenic mice in basic research

What are transgenic mice and what do we learn from them? In this review, we focus on the generation of “classical” transgenic and “knock-out” mice. The establishment of transgenic and gene-targeted mice provides an unique tool to study the function(s) of a given gene in the context of a whole organism. Based on selected examples, we demonstrate the potential of this transgenic technology to understand the interactions between cells, organs and organ systems in genetically engineered mice.

**Key words:** transgenic mice – “knock-out” mice – embryonic stem cells – homologous recombination – embryoid bodies

net das Wechselspiel der normalen Körperfunktionen als integrative Physiologie und im Krankheitsfalle als Pathophysiologie. Erst die Analyse solcher Funktionszusammenhänge führt dann zu aussagekräftigen Erkenntnissen für den Menschen, die z.B. an isolierten Zellkulturen oder gar durch Computersimulationen keinesfalls vollständig gewonnen werden können. Bevor diese Aussage durch einige Beispiele beleuchtet und untermauert wird, soll dargelegt werden, was man sich unter transgenen Tieren vorzustellen hat. Es sei darauf hingewiesen, dass die Mäuse im Tierstall unter streng kontrollierten Bedingungen leben, die durch das jeweilige kantonale Veterinäramt überwacht werden.

Der beweiskräftigste Test zur Bestimmung der Funktion eines Genproduktes besteht darin, das entsprechende Gen in einen Gesamtorganismus einzuschleusen oder aber es zu inaktivieren. Danach wird beobachtet, welcher biologische Effekt durch diese Genveränderung hervorgerufen wird. Im Idealfall sollte das normale Gen durch ein abgewandeltes Gen ersetzt, ausgetauscht oder inaktiviert werden, um dann die Funktion des veränderten Genproduktes, also eines Eiweisses, untersuchen zu

können. Diese Vorgehensweise, die, wie wir noch sehen werden, zu erstaunlichen neuen Erkenntnissen geführt hat, klingt einleuchtend und einfach, in der praktischen Durchführung ist die Sache jedoch komplizierter.

## Die «klassische» transgene Maus

Individuen, die experimentell eingeführte Gensequenzen (Transgene genannt) stabil in ihrem Erbgut (Genom) integriert haben, werden als transgene Mäuse bezeichnet (Brinster und Palmiter, 1984). Im allgemeinen besteht ein Transgen aus dem zu untersuchenden Gen, das von einem ausgewähltem Promotor gesteuert wird. Das «klassische» transgene Vorgehen besteht darin, ein Trans-

gen in den männlichen Vorkern einer befruchteten Eizelle zu injizieren (Abb. 1). Die modifizierten Eizellen werden anschliessend in pseudoträchtige Empfängermäuse überführt, wo sie ausgetragen werden. In etwa 10–30% der mikroinjizierten Eizellen wird das Transgen erfahrungsgemäss im Genom eingebaut. Ziel ist es, dass dieses neue Gen überexprimiert und an die Nachkommen dauerhaft vererbt wird. Mäuse, die auf diese Weise selektioniert und gezüchtet wurden, werden als «klassische» transgene Mäuse bezeichnet. Die Überexpression des Transgens ist abhängig von verschiedenen Faktoren, vor allem von dem gewählten Promotor, den vorkommenden Regulationssequenzen, der zufälligen Integrationsstelle im Erbgut sowie von der Anzahl integrierter Kopien des Transgens.

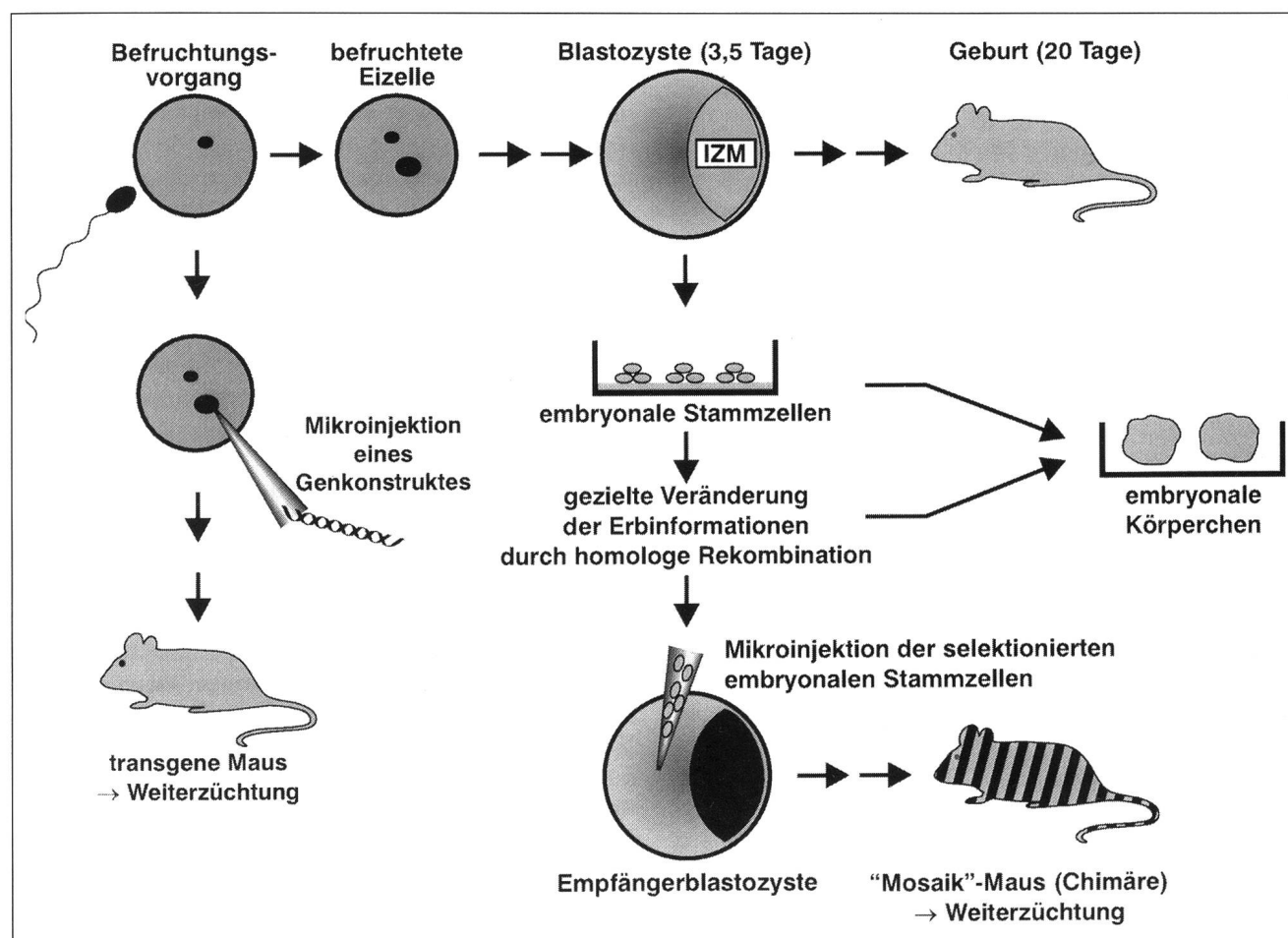


Abbildung 1: Erzeugung von «klassischen»-transgenen und «knock-out»-Mäusen sowie von embryonalen Körperchen (embryoid bodies)

Links: Das Transgen wird in den männlichen Vorkern injiziert, da er grösser und leichter zu erreichen ist als der weibliche. Eine gewisse Anzahl injizierter Transgene baut sich ins Erbgut der Maus ein.

Mitte: Das gewünschte Genkonstrukt wird in undifferenzierte (pluripotente) embryonale Stammzellen, die aus der inneren Zellmasse (IZM) von Blastozysten etabliert worden sind, eingeführt. Nach Selektion werden diejenigen Zellen, in denen der gewünschte Genaustausch stattgefunden hat (sog. homolog rekombinierte Zellen, siehe Abb. 2), in eine Empfängerblastozyste injiziert. Die Verwendung von embryonalen Stammzellen von einem sog. Aguti-Mausstamm (braune Fellfarbe) und einer Empfängerblastozyste von einem Mausstamm mit schwarzer Fellfarbe, führt zu den sog. «Mosaik»-Mäusen (Chimären) mit zweierlei Fellfarben.

Rechts, Mitte: Unter definierten Kulturbedingungen differenzieren Wildtyp oder homolog rekombinierte embryonale Stammzellen spontan zu embryonale Körperchen (engl. embryoid bodies)

Grob gesagt können zwei pathophysiologische Situationen mit Hilfe von transgenen Mäusen imitiert werden, nämlich der Effekt einer Proteinüberproduktion im gesamten Organismus und/oder die Folgen einer Proteinexpression in nicht dafür vorgesehenen Organen. Als Beispiel sei auf die Rolle von Angiotensinogen und Renin bezüglich der Hypertension hingewiesen, die aus offensichtlichen Gründen nicht in einem Zellkulturmodell untersucht werden kann. Um diese Zusammenhänge zu verstehen, wurden transgene Mäuse verwendet, die einen erhöhten Serumspiegel an Angiotensinogen oder Renin oder beidem aufwiesen. Die Untersuchungen von einfach und doppelt-transgenen Tieren führten zum Schluss, dass beide Faktoren benötigt werden, um einen hohen Angiotensinogen-II-Serumspiegel zu erreichen. Dies hatte eine arteriellen Hypertension zur Folge (Takimoto et al., 1996).

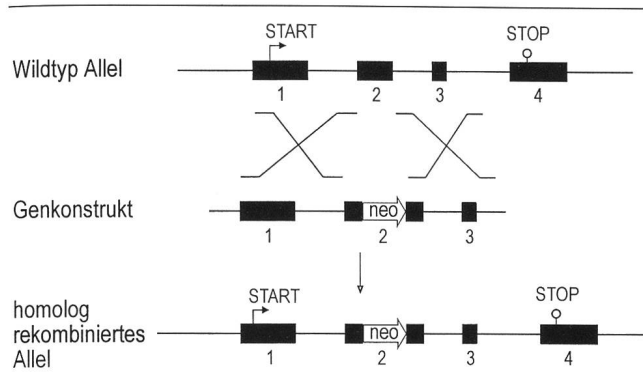
Ein weiteres Beispiel ist die Überexpression eines Fettstoffwechsellzyms, die zu hohen Lipoproteinkonzentrationen und zur Atherosklerose führt. Unter Atherosklerose versteht man die der Arteriosklerose zugrundeliegende Veränderung der Innenschicht (Intima) und der mittleren Schicht (Media) der Arterienwand. Sie wird hervorgerufen durch die Einlagerung fettartiger Substanzen (Cholesterin, Fettsäuren, später Kalkeinlagerungen), schliesslich gefolgt von Einengung der Gefässe und evtl. auch Durchbruch in die Gefässlichtung (atheromatöses Geschwür). Bestimmte Patientengruppen haben in ihrem Blut erhöhte Konzentrationen eines Fett transportierenden Plasmafaktors, der in pathologisch veränderter Form zu einer verstärkten Atherosklerose führt (s.u.). Dieser Faktor ist das HDL (engl. Abkürzung für High Density Lipoprotein). In einem kürzlich entwickelten transgenen Mausmodell konnte die menschliche Form eines Enzyms überexprimiert werden, die Lezithin-Cholesteryl-Acyltransferase (LCAT), welche bei der Modulation der Plasma-HDL-Funktion und -Konzentration eine wichtige Rolle spielt. Dieses Enzym wird primär in der Leber gebildet und ist im Plasma hauptsächlich mit HDL assoziiert. LCAT ist notwendig für die Freisetzung von Cholesterin aus HDL und für seinen Transport zurück zur Leber, wo es dann weiterverarbeitet wird. Dieser Rücktransport von Cholesterin in die Leber stellt wahrscheinlich einen wichtigen Mechanismus dar, durch welchen das Lipoprotein HDL die Entstehung der Atherosklerose beeinflusst, jedoch sind die genauen pathobiochemischen Zusammenhänge noch weitgehend ungeklärt. Eine Überexpression des Enzyms LCAT in transgenen Mäusen führte überraschenderweise zu einer verstärkten Bildung von abnormem HDL, was wiederum den normalen Cholesterintransport in die Leber beeinträchtigt (Bérard et al., 1997). Diese pathobiochemische Veränderung führt schlussendlich zu einer ausgeprägten Atherosklerose. Studien an transgenen Mäusen zeigen, dass Mechanismen, die zu einer übernormalen Erhöhung von verändertem HDL führen, zur Entstehung der Atherosklerose wesentlich beitragen. Aus diesem Grund stellen diese neuen, an transgenen Mäusen gewonnenen Erkenntnisse, einen wichtigen Beitrag zum Verständnis

und zur möglichen Therapie derjenigen Form von Atherosklerose dar, die durch ein abnormes Lipoprotein, in diesem Fall das HDL, hervorgerufen wird.

Zwei Aspekte können (noch) nicht mit der «klassischen» transgenen Technologie gelöst werden: Einerseits lässt sich der Integrationsort des Transgens gegenwärtig nicht voraussagen, was zur Folge hat, dass mehrere transgene Mauslinien miteinander verglichen werden müssen, um eine allgemeine Aussage machen zu können. Andererseits ist die gezielte Inaktivierung eines spezifischen Gens nicht möglich. Diese Aspekte wurden mit der Etablierung der homologen Rekombination in embryonalen Stammzellen gelöst.

## Embryonale Stammzellen, homologe Rekombination und «knock-out»-Mäuse

Die gezielte Geninaktivierung in einer Maus (bekannt als die «knock-out»-Maus) wurde erst möglich, als embryonale Stammzellen der Maus etabliert wurden. Pluripotente embryonale Stammzellen werden aus der inneren Zellmasse von Mausblastozysten isoliert (Abb. 1) und können zeitlich unbegrenzt in Kultur wachsen (Evans und Kaufman, 1981; Martin, 1981). Werden undifferenzierte embryonale Stammzellen in eine Mausblastozyste injiziert, können sie zur Bildung sämtlicher Gewebe im werdenden «Mosaik»-Tier (Chimäre) beitragen. Wünschenswert ist die Kolonisierung der Keimbahn, da somit das Genom der embryonalen Stammzellen weitervererbt wird. Die spezifische Veränderung im Erbgut der embryonalen Stammzellen wurde mit Hilfe der homologen Rekombination durchgeführt (Thomas und Capecchi, 1987). Unter homologer Rekombination versteht man den Austausch von genetischem Material zwischen zwei gleichen Gensequenzen. Voraussetzung dafür ist das Vorhandensein identischer Teilsequenzen innerhalb bestimmter Abschnitte sowohl im eingeführten Genkonstrukt als auch im chromosomalen Gegenstück (Abb. 2). Wie es im Zellkern zu einem Austausch des im Erbgut vorhandenen Genabschnittes mit dem übereinstimmenden (homologen), neueingeführten Gegenstück kommt, ist bis heute noch nicht restlos geklärt. Mit Hilfe von molekular- und zellbiologischen Methoden werden die gewünschten embryonalen Stammzellen selektiert, gezüchtet und in Blastozysten mikroinjiziert (Abb. 1). Diejenigen chimären Mäuse, die das veränderte Gen in ihrer Keimbahn integriert haben, erzeugen bei der Weiterzucht weibliche und männliche Nachkommen, die jeweils heterozygot bezüglich des veränderten Gens sind. Heterozygot bedeutet, dass die so gewonnenen Mäuse je ein normales und ein verändertes Gen tragen. Werden diese Mäuse untereinander verpaart, so wird nach den Mendelschen Gesetzen ein Viertel ihrer Nachkommenschaft gleichgenetisch (homozygot) für das veränderte Gen sein. Anhand sorgfältiger Untersuchungen an den hetero- und homozygoten Tieren kann auf die Funktion dieses Gens geschlossen werden.



**Abbildung 2: Homologe Rekombination in embryonalen Stammzellen der Maus**  
 Zur gezielten Inaktivierung eines spezifischen Gens wird im Reagenzglas ein Genkonstrukt hergestellt, das dem Wildtyp-Allel bis auf die mutierte Sequenz sehr ähnlich (homolog) ist. Die Exone sind als schwarze Boxen dargestellt. In unserem Fall wird der Leseraster des Exons 2 durch die Insertion eines fremden Gens, dem Selektionsmarker *neo*, unterbrochen. Nach Einführung dieses Genkonstruktes in embryonale Stammzellen kommt es in seltenen Fällen zu einer Anlagerung an das wildtyp Allel und zu einem Genaustausch (homologe Rekombination). Dank der Expression des Neomycin-Resistenzgens (*neo*) können diejenigen Zellen selektioniert werden, die das Genkonstrukt stabil im Erbgut eingebaut haben. Weitere molekularbiologische Untersuchungen erlauben die Identifikation von homolog rekombinanten Zellen. Diese werden schlussendlich in Empfängerblastozysten injiziert (Abb. 1)

Seit der Veröffentlichung der ersten «knock-out»-Maus im Jahr 1989 (Thompson et al., 1989) sind bis heute etwa 1000 solche Mausmodelle publiziert worden. Die meisten Tiere haben dazu beigetragen, die entwicklungsbiologische und physiologische Funktionen verschiedener Gene zu analysieren sowie menschliche Krankheiten zu untersuchen. In den folgenden Abschnitten werden einige knock-out Mäuse vorgestellt. Um sich in der immer grösser werdenden Anzahl von genetisch veränderten Mäusen zu orientieren, verweisen wir den interessierten Leser auf die «transgene» Datenbank *Tbase* (<http://www.gdb.org/Dan/tbase/tbase.html>) und weitere Internetquellen.

## Teilaspekte der Alzheimerschen Erkrankung: Was können «knock-out»-Mäuse an neuen Erkenntnissen beitragen?

Die sogenannte Amyloidose besteht in einer Störung des Eiweiss-Stoffwechsels, wobei körpereigene Eiweisse, die

normalerweise in gelöster Form vorliegen, in Geweben abgelagert werden, und zwar in abnormen, unlöslichen Proteinsträngen, die sowohl strukturelle als auch funktionelle Störungen verursachen. Alle erworbenen und vererbten Formen der systemischen Amyloidose, welche die meisten Körpergewebe betreffen, enden meist tödlich. Werden die Amyloidstränge im Gehirn abgelagert, so entsteht die Alzheimersche Erkrankung, eine schwammartige «Gehirnerweichung». Die Amyloidstränge können aus verschiedenen Eiweissen entstehen und sind resistent gegen Eiweiss-abbauende Enzyme (Proteinasen). Es gibt zahlreiche Hinweise dafür, dass diese Amyloid-Fibrillen an der Amyloidose ursächlich beteiligt sind. Ein weiteres wichtiges biochemisches Kennzeichen aller Amyloidose-Formen ist die Anlagerung eines normalen Plasmaproteins an diese Fibrillen, welches den Namen Serum-Amyloid-P-Komponente (SAP) erhalten hat. Aus früheren Untersuchungen ist bekannt, dass SAP die Amyloid-Fibrillen stabilisiert und somit zu einem schnelleren Fortschreiten der Amyloidose-Erkrankung führen kann. Diese Annahme wird durch die Beobachtung unterstützt, dass bei Mäusen und Hamstern eine hochsignifikante, positive Korrelation zwischen den zirkulierenden SAP-Konzentrationen und der Entwicklung der Amyloidose besteht. Bei Mäusen, in denen das SAP-Gen gezielt ausgeschaltet wurde (SAP-knock-out-Mäuse), konnte die Ablagerung von Amyloid verzögert werden (Botto et al., 1997). Weitere Versuche zeigten, dass der pathobiochemische Beitrag zur Amyloid-Erkrankung beim Menschen sogar noch bedeutsamer ist als bei der Maus. Da SAP in allen Amyloid-Ablagerungen vorhanden ist, einschliesslich in denjenigen, die bei der Alzheimerschen Krankheit vorkommen, ist eine ursächliche Beteiligung von SAP für die Pathogenese der Amyloidose sehr wahrscheinlich. Aufgrund der Tatsache, dass die Hemmung der Anlagerung von SAP an die Amyloid-Fibrillen die Amyloid-Ablagerung signifikant verzögert, eröffnet eine Hemmung von SAP in vivo neue mögliche therapeutische Zugänge, die zwar die Alzheimersche Erkrankung wohl nicht heilen, aber doch verzögern können. Dies bedeutet sicher einen klinischen Vorteil und eine deutlich verbesserte Lebensqualität für die betroffenen Patientinnen bzw. Patienten.

## Die «knock-out»-Maus in der Wundheilung

Nach einer mechanischen Verletzung werden zahlreiche Vorgänge aktiviert, wie z.B. die Aktivierung von Blutplättchen, welche zu einem ersten Wundverschluss führen, die plasmatische Blutgerinnungskaskade, die Neubildung von verletzten Gefässen (Angiogenese), die Einwanderung von Abwehrzellen oder die Neubildung von Fibroblasten. Die endgültige Abdeckung z.B. einer verletzten Hautstelle geschieht durch die Vermehrung von sogenannten Keratinozyten, derjenigen Zellen also, die in ihrer Gesamtheit die Epidermis bilden. Seit langer Zeit



wurde vermutet, dass ein Plasmafaktor, das Plasminogen, die geschädigte Bindegewebsmatrix («Kittsubstanz» des Gewebes) im Verlauf der Wundheilung auflöst, um so den Keratinozyten «Platz zu schaffen», welche die Wunde endgültig verschliessen. Jedoch konnte diese Annahme nicht schlüssig bewiesen werden, bis es gelang, das Gen, welches für Plasminogen kodiert, in der Maus zu inaktivieren (Rømer et al., 1996). Zusätzlich sei noch erwähnt, dass auch die Angiogenese, die Einwanderung von Abwehrzellen sowie die Neubildung von Bindegewebszellen eine Aktivierung des Plasminogensystems zu benötigen scheinen. Es zeigte sich, dass die Heilung einer Verletzung bei diesen Mäusen vermindert ist, wahrscheinlich weil die mangelnde Auflösung der zwischen den Bindegewebszellen gelegenen «Kittsubstanzen» gestört war und so eine Ausbreitung der Keratinozyten und andere Wundheilungsvorgänge verhindert wurden. Die therapeutischen Ansätze, die sich aus diesen Versuchen ergeben, beziehen sich auf eine ganze Anzahl von pathologischen Vorkommnissen: so ist es durchaus denkbar, dass die Anwendung von Plasminogen bei Krankheiten, die im weitesten Sinn als Verwundung aufgefasst werden können, einen positiven, d. h. heilenden Effekt hat. Hierzu gehören die oben beschriebene Atherosklerose wie auch die Colitis oder Dermatitis, Erkrankungen, welche alle mit schweren Gewebeschäden einhergehen. Auch an diesen Beispielen zeigt sich, dass transgene Tiermodelle nicht nur für die pathogenetische Aufklärung eines so alltäglich erscheinenden Vorkommens wie der Wundheilung entscheidende neue Erkenntnisse vermitteln, sondern auch für die Therapie von schweren Krankheiten hoffnungsvolle Ansätze bieten.

## Der Tumornekrose-Faktor als unerwarteter Schutzmechanismus bei Minderdurchblutung des Gehirns

Gehirnverletzungen, wie sie bei Schlaganfällen oder einer Schädelverletzung auftreten, verursachen einen dramatischen Anstieg des sogenannten Tumornekrose-Faktors (TNF), jedoch ist die Rolle dieses Faktors bei Gehirnverletzungen unklar. TNF gehört zu einer Familie von sogenannten Zytokinen, die meist in der unmittelbaren Nähe ihres Bildungsortes spezifische Wirkungen entfalten. Die Bildung von TNF wird durch verschiedene Substanzen angeregt, wie z. B. Wachstumsfaktoren (Mitogene) oder Entzündungsmediatoren, zu denen die Interleukine 1 und 2 und das bekannte Interferon gehören. Nach Bildung und Freisetzung von TNF in vielen Gehirngebieten bindet diese Substanz an spezifische Rezeptoren, die ihrerseits intrazelluläre, biochemische Signalwege aktivieren. Die Auswirkungen dieser Rezeptor-Bindung in vivo sind aber noch keineswegs vollständig aufgeklärt, vor allem nicht unter Bedingungen einer Minderdurchblutung des Gehirns. Um dieser Frage nachzugehen, wurden wiederum «knock-out»-Mäuse erzeugt, denen die

beiden in vivo vorkommenden TNF-Rezeptoren fehlen, so dass dieses Zytokin seine zelluläre Wirkung nicht entfalten kann (Bruce et al., 1996). Die so veränderten Tiere verhielten sich in sämtlichen Verhaltensversuchen unauffällig, woraus der Schluss gezogen werden kann, dass die Lernfähigkeit und die Gedächtnisfunktion sowie die zerebralen, biochemischen Übertragungssysteme bei diesen genveränderten Tieren normal sind. Wurde jedoch die Durchblutung einer Gehirnarterie eingeschränkt, was beim Menschen einer lokalen Mangel-durchblutung des Gehirns entspricht, so ergaben sich bei den Tieren mit inaktivierten TNF-Rezeptoren weit ausgeprägtere Schäden, als bei den Kontrolltieren. Diese Daten liefern einen direkten in-vivo-Hinweis für den Schutz von Nervenzellen durch TNF bei der zerebralen Mangel-durchblutung. Darüber hinaus konnte in dieser Studie gezeigt werden, dass ein sehr ähnlicher neuronaler Schutzeffekt durch TNF auch in organspezifischen Gewebsschnitten von einem besonders empfindlichen Gehirnabschnitt, dem Hippokampus, nachweisbar war. Die Mechanismen, die diesem TNF-induzierten «Selbstschutz» zugrunde liegen, sind noch nicht vollständig aufgeklärt, jedoch scheint hierbei eine stabilisierende Rolle des intrazellulären Kalzium-Haushaltes eine wichtige Rolle zu spielen, da TNF die Bildung eines Kalzium-bindenden Proteins, des Calbindins, in den Zielzellen anregt. Bezüglich der therapeutischen Konsequenzen der geschilderten Ergebnisse lässt sich hervorheben, dass das Gehirn einen «eingebauten» Schutzmechanismus besitzt, der die Folgen einer Minderdurchblutung vermindert. Ob und wie dieser Schutzmechanismus noch verstärkt werden kann, ist derzeit unklar, doch zeigt sich einmal mehr, dass in-vivo-Untersuchungen an genveränderten Tieren äusserst wertvolle Einblicke in die Physiologie und Pathophysiologie liefern.

## Unerwartete Phänotypen in «knock-out»-Mäusen

Manchmal weist eine «knock-out»-Maus einen unerwarteten Phänotyp auf. Obwohl solche Entdeckungen zufälliger Natur sind, sind sie von grosser Bedeutung, dienen sie doch dem Erkenntnisgewinn über die Funktion(en) eines bestimmten Gens. So ist beispielsweise bekannt, dass Säugetiere (inkl. dem Menschen) einen Rezeptor für das Umweltgift Dioxin exprimieren. Die Bindung von Dioxin an den Dioxin-Rezeptor aktiviert den letzteren zur Bildung eines Dimers mit seinem Partnerprotein, welches Arnt genannt wird (engl. aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator). Der Dioxin-Rezeptor/Arnt-Komplex wiederum induziert die Expression von Genen, die die Detoxifikation des Körpers beeinflussen (Gassmann und Wenger, 1998). Interessanterweise führte einerseits die Inaktivierung des Dioxin-Rezeptors zu verschiedenen Leberdefekten während der Entwicklung der homozygot defizienten Mäuse und in einem Bericht gar zu einer reduzierten Immunantwort (Schmidt und

Bradfield, 1996). Offensichtlich wird der Dioxin-Rezeptor für eine normale Leberfunktion benötigt. Andererseits sind homozygote, Arnt-defiziente Mäuse nicht lebensfähig. Die entsprechenden Embryonen bilden keine Blutgefäße und werden in der Mitte der Trächtigkeit resorbiert (Maltepe et al., 1997). Diese Beobachtungen legten die Vermutung nahe, dass der Dimerisierungspartner des Dioxin-Rezeptors, Arnt, auch eine wichtige Funktion in der Blutgefäßbildung spielt. Dies konnte mit anderen Methoden verifiziert werden (Gassmann und Wenger, 1998).

## Das Potential der «knock-out»-Technologie

Obwohl die «knock-out»-Technologie, die die gezielte Inaktivierung eines Gens ermöglicht, immer häufiger angewendet wird, bedarf sie laufender Verbesserung. Wie oben erwähnt, kann die homozygote Inaktivierung eines Gens embryonal letal sein. Eine Möglichkeit, dieses Problem teilweise zu umgehen, ist die Ausnützung der Fähigkeit der embryonalen Stammzellen, sich auch in Kultur zu differenzieren. Embryonale Stammzellen sind nämlich in der Lage, zu embryonalen Körperchen (engl. embryoid bodies) zu differenzieren (Doetschman et al., 1985) (Abb. 1). Diese bestehen aus vitalen embryonalen Stammzellen (Gassmann et al., 1996), die sich zu den verschiedensten Zelltypen differenzieren. Da diese embryonalen Körperchen die Mausembryogenese bis zu einem bestimmten Grad nachahmen, lassen sich erste Voraussagen über die Funktion eines inaktivierten Gens machen.

Eine andere Möglichkeit, die letale Auswirkung einer Geninaktivierung in der Maus zu umgehen, besteht darin, das ausgewählte Gen zu einem bestimmten Zeitpunkt oder nur in spezifischen Zellen eines Organs zu inaktivieren. Eine detaillierte Erläuterung dieses noch jungen,

aber zukunftsweisenden Systems würde den Rahmen dieser Übersichtsarbeit sprengen. Der interessierte Leser wird auf die entsprechende Literatur verwiesen (Gu et al., 1994; Hennet et al., 1995; Kuhn et al., 1995).

## Schlussbemerkungen

Obschon viele Fragen, soweit sie die Funktion einzelner Gene betreffen, auf zellulärer Ebene mit Zellkulturmodellen angegangen werden können, muss man sich doch immer wieder vor Augen führen, dass ein Gen oder ein im Zusammenspiel wirkender Genverband im Laufe der Evolution entwickelt wurde, um im Gesamtorganismus zu wirken. Dies heisst wiederum, dass ein Gen seine Wirkungen im gesamtheitlichen Funktionsverbund ausübt. Aus diesem Grund kann ein Gen also – und dies sei noch einmal betont – nur im Gesamtzusammenhang, d.h. am intakten Organismus, vollständig analysiert werden. Von der Natur der Sache her können folgende, allgemeine physiologische Organ- und Regulationssysteme nicht in Zellkulturmodellen untersucht werden: Blutdruckregulation (Organdurchblutung, Umverteilung des Blutes z.B. bei körperlicher Belastung), Nierenfunktion (Harnaufbereitung, Regulation des Salz- und Wasserhaushaltes), Atmungsregulation (Lungenmechanik, Mehratmung, Lungenreflexe), Temperaturregulation (inkl. Fieberzustände), Verdauung (Kauen, Schlucken, Darmbeweglichkeit), Fortpflanzung und Schwangerschaft, die vielfache Wechselwirkung hormoneller Systeme zur Aufrechterhaltung angepasst-integrativer Körperfunktionen oder auch die koordinierten Leberfunktionen. Diese Vielzahl von ineinandergreifenden Regelmechanismen lassen sich durch transgene Tiermodelle in ihrer Komplexität derzeit noch nicht restlos aufklären. Dennoch gibt es eine Anzahl von Beispielen, die aufzeigen, dass weiterführende und richtungsweisende Erkenntnisse mit transgenen Tieren gewonnen werden konnten. Die-

### Les souris transgéniques dans la recherche médicale

Que sont les souris transgéniques et en quoi sont-elles utiles dans la recherche médicale? Dans cet article succinct, les auteurs tentent d'apporter quelques réponses à ces questions en présentant quelques exemples de souris transgéniques «classiques» et souris «knock-out», qui ont contribué à mieux comprendre le développement de certaines maladies. Il est souligné que les modèles transgéniques permettent d'étudier les fonctions de gènes donnés dans le contexte de l'animal vivant, ce qui est crucial pour comprendre les interactions entre différents organes au niveau moléculaire.

### I topi transgenici nella ricerca medica

Che cosa sono i topi transgenici e cosa possono insegnare alla ricerca medica? In questo articolo, vogliamo focalizzare la nostra attenzione su come vengono generati i cosiddetti topi transgenici «classici» e quelli definiti «knock-out». La possibilità di ottenere topi transgenici costituisce uno strumento unico per studiare le funzioni di singoli geni in organismi viventi. In questo lavoro presentiamo alcuni esempi di come l'uso di animali transgenici ha portato alla comprensione di fenomeni fisiologici a livello molecolare.

se erfolgversprechenden Ansätze wären nicht mehr möglich, wenn durch die Annahme der Genschutzinitiative die Schaffung, Zucht und Weitergabe von transgenen Mäusen verboten würde. Dieser methodische Zugang ist unentbehrlich für die Zukunft der biologisch-medizinischen Wissenschaften.

## Literatur

- Brinster R.L., Palmiter R.D.* (1984): Introduction of genes into the germ line of animals. *Harvey Lect.* 80, 1-38.
- Bérard A.M., Föger B., Remaley A., Sbamburek R., Vaisman B.L., Talley G., Paigen B., Hoyt Jr. R.F., Marcovina S., Brewer Jr. H.R., Santamarina-Fojo S.* (1997): High plasma HDL concentrations associated with enhanced atherosclerosis in transgenic mice overexpressing lecithin-cholesteryl acyltransferase. *Nature Med.* 3, 744-749.
- Botto M., Hawkins P.N., Bickerstaff M.C.M., Herbert J., Bygrave A.E., McBride A., Hutchinson W.L., Tennent G.A., Walpoet M.J., Pepys M.B.* (1997): Amyloid deposition is delayed in mice with targeted deletion of the serum amyloid P component gene. *Nature Med.* 3, 855-859.
- Bruce A., Boling W., Kindy M.S., Peschon J., Kraemer P.J., Carpenter M.K., Holtersberg F.W., Mattson M.P.* (1996): Altered neuronal and microglial responses to excitotoxic and ischemic brain injury in mice lacking TNF receptors. *Nature Med.* 2, 788-794.
- Doetschman T.C., Eistetter H., Katz M., Schmidt W., Kemler R.* (1985): The in vitro development of blastocyst-derived embryonic stem cell lines: formation of visceral yolk sac, blood islands and myocardium. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 87, 27-45.
- Evans M.J., Kaufman M.H.* (1981): Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* 292, 154-156.
- Gassmann M., Fandrey J., Bichet S., Wartenberg M., Marti H.H., Bauer C., Wenger R.H., Acker H.* (1996): Oxygen supply and oxygen-dependent gene expression in differentiating embryonic stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 2867-2872.
- Gassmann M., Wenger R.H.* (1997): HIF-1, a mediator of the molecular response to hypoxia. *News Physiol. Sci.* 12, 214-218.
- Gu H., Marth J.D., Orban P.C., Mossman H., Rajewsky K.* (1994): Deletion of the DNA polymerase  $\beta$  gene in T cells using tissue-specific gene targeting. *Science* 265, 103-106.
- Hennet T., Hagen F.K., Tabak L.A., Marth J.D.* (1995): T-cell-specific deletion of a polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase gene by site-directed recombination. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 12070-12074.
- Kuhn R., Schwenk F., Aguet M., Rajewsky K.* (1995): Inducible gene targeting in mice. *Science* 269, 1427-1429.
- Maltepe E., Schmidt J.V., Baunoch D., Bradfield C.A., Simon M.C.* (1997): Abnormal angiogenesis and responses to glucose and oxygen deprivation in mice lacking the protein ARNT. *Nature* 386, 403-406.
- Martin G.R.* (1981): Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78, 7634-7638.
- Römer J., Bugge T.H., Pyke C., Lund L.R., Flick M.J., Degen J.L., Danø K.* (1996): Impaired wound healing in mice with disrupted plasminogen gene. *Nature Med.* 2, 287-292.
- Schmidt J.V., Bradfield C.A.* (1996): Ah receptor signalling pathways. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 12, 55-89.
- Takimoto E., Isbida J., Sugiyama E., Horiguchi H., Murakami K., Fukamizu A.* (1996): Hypertension induced in pregnant mice by placental renin and maternal angiotensinogen. *Science* 274, 995-998.
- Thomas K.R., Capecchi M.R.* (1987) Site-directed mutagenesis by gene targeting in mouse embryo-derived stem cells. *Cell* 51, 503-512.
- Thompson S., Clarke A.R., Pow A.M., Hooper M.L., Melton D.W.* (1989): Germ line transmission and expression of a corrected Hprt gene produced by gene targeting in embryonic stem cells. *Cell* 56, 313-321.

## Dank

Die Autoren danken R.H. Wenger und P.E. Thomann für die kritische Durchsicht des Manuskriptes und dem Schweizerischen Nationalfonds für die finanzielle Unterstützung.

*Korrespondenzadresse: PD Dr. med. vet. Max Gassmann, Physiologisches Institut der Universität Zürich-Irchel, Winterthurerstrasse 190, CH-8057 Zürich.*

Manuskripteingang: 22. Januar 1998

In vorliegender Form angenommen: 2. Februar 1998