

Über Methoden der Grundlagenforschung

Textquelle 1

Originally published in *Science Express* on 21 September 2006

Science 27 October 2006; Vol. 314. no. 5799, pp. 664 - 666

DOI: 10.1126/science.1132341

Reports

Control of Peripheral Nerve Myelination by the β -Secretase (BACE1)

Michael Willem,¹ Alistair N. Garratt,^{2*} Bozidar Novak,¹ Martin Citron,³ Steve Kaufmann,⁴ Andrea Rittger,⁵ Bart DeStrooper,⁶ Paul Saftig,⁵ Carmen Birchmeier,² Christian Haass^{1*}

Although β -secretase (BACE1, beta-site amyloid precursor protein–cleaving enzyme 1) is essential for the generation of amyloid- β -peptide in Alzheimer's disease, its physiological function is unclear. We found that very high levels of BACE1 were expressed at time points when peripheral nerves become myelinated. Deficiency of BACE1 resulted in the accumulation of unprocessed neuregulin 1 (NRG1), an axonally expressed factor required for glial cell development and myelination. *BACE1^{-/-}* (“-/-“ means: double-knockout; on both fatherly and motherly chromosomes) mice displayed hypomyelination of peripheral nerves and aberrant axonal segregation of small-diameter afferent fibers, very similar to that seen in mice with mutations in type III NRG1 or Schwann cell–specific ErbB2 knockouts [...].

Glossar:

to cleave - schneiden

to display - aufweisen

diameter- Durchmesser

unprocessed – unbearbeitet

aberrant – abweichend

afferent - hinführend

deficiency – Mangel

segregation - Abspaltung

Aufgabe 1



- Formulieren Sie das Ziel der Untersuchung.
- Fassen Sie die Grundaussage der Untersuchung in **einem** prägnanten Satz zusammen.
- In einer weiteren Untersuchung konnte Christian Haass beobachten, dass BACE1-Doppel-Knockout-Zebrafische unter enormen Bewegungsstörungen leiden. Erläutern Sie diese Beobachtungen.

Textquelle 2

Unter Knock-out-Mäusen versteht man nur solche Tiere, bei denen ein ganz bestimmtes Gen gezielt ausgeschaltet wurde, um dessen Wirkungen zu prüfen.

Um eine gezielte Veränderung vornehmen zu müssen, muss zunächst einmal die Sequenz des still zu legenden Gens bekannt sein. Der Prozess der Herstellung einer Knock-out-Maus ist sehr komplex, und wird hier daher etwas vereinfacht dargestellt. Er lässt sich grob in zwei Teilschritte untergliedern. Der erste Schritt dient der Herstellung der genetisch veränderten embryonalen Stammzellen, der Zweite der Herstellung der Zielmäuse aus diesen veränderten Zellen.

Teil 1: Herstellung transgener, embryonaler Stammzellen:

1. Zunächst wird der Zielvektor hergestellt. Dazu wird ein DNA-Abschnitt, der für das Gen für Neomycin-Resistenz codiert, von zwei Bereichen des zu verändernden Gens flankiert. Mit diesem Genkonstrukt wird nun weitergearbeitet.
2. Embryonale Stammzellen, welche aus Blastocysten von Inzuchtmäusen mit braunem Fell gewonnen werden, werden mit dem Genkonstrukt in Kontakt gebracht. Manche von ihnen nehmen den Vektor in die Zelle auf (Transfektion), aber nur sehr wenige dieser Zellen bauen ihn auch ein. Der Einbau folgt einem Prozess, den man als homologe Rekombination kennt. (homolog – sich entsprechend, Rekombination – gegenseitiger Tausch). Auf der Ziel-DNA lagert sich der Vektor zunächst an die homologe Sequenz an. Dann wird er eingebaut während die Ursprungssequenz sich aus dem DNA-Strang löst. Auf der DNA der Zelle findet sich nun ein defektes Gen mit einem integrierten Neomycin-Resistenzgen. Im Erfolgsfall sind die entstehenden Zellen meist heterozygot, nur äußerst selten werden auf beiden homologen Chromosomen die Gene durch homologe Rekombination ersetzt, sodass die Zellen homozygot für das Genkonstrukt sind. Durch Zugabe von Neomycin ins Kulturmedium der zu verändernden Zellen überleben nur diejenigen Zellen, welche den Vektor aufgenommen haben, also transgen sind (positive Selektion). Sie werden weiter kultiviert.

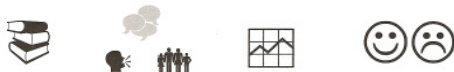
Herstellung der Knockout-Mäuse:

3. Schwangeren Mäusen einer nahezu identischen, sich aber in der Fellfarbe von den Zellspendermäusen unterscheidenden Inzuchtlinie (helles Fell) werden nun Blastocysten entnommen, in welche die transgenen embryonalen Stammzellen injiziert werden. Dann werden die Blastocysten wieder in die Gebärmutter eingepflanzt und die Embryonen entwickeln sich mit einer recht hohen Erfolgsquote im Mutterleib normal weiter. Da die entnommenen und

wieder eingepflanzten Blastocysten aber aus nicht veränderten Zellen bestanden, entsteht durch die Zugabe veränderter Zellen ein Organismus, dessen Zellen teilweise das Genkonstrukt tragen, teilweise aber nicht. Einen solchen Organismus nennt man eine Chimäre (Mosaik-Maus). Da die Chimären sich aus Zellen von Tieren mit unterschiedlicher Fellfarbe zusammensetzen, sind sie gescheckt.

4. Aus den Mosaikmäusen muss nun nur noch eine homozygote Doppel-Knockout-Maus gezüchtet werden. Keimzellen von Mosaikmäusen tragen entweder das Genkonstrukt, oder sie tragen es nicht. Kreuzt man eine solche männliche Maus mit einer normalen weiblichen Maus der Inzuchtlinie, so verschmilzt entweder eine veränderte oder eine nicht veränderte Spermienzelle mit der (unveränderten) Eizelle der weiblichen Maus. Daraus bildet sich entweder eine heterozygot das Genkonstrukt tragende Maus, (Single-Knockout) oder eine der Mutter gleichende Maus. Um nun homozygote Doppel-Knockout-Mäuse zu erhalten, kreuzt man untereinander die Single-Knockout-Mäuse. Dabei entstehen wieder die normalen Mäuse der Inzuchtlinie, aber auch homozygote Doppelknockout-Varianten, die dann ausgelesen und für die Forschung verwendet werden.

Aufgabe 2



- Weshalb verwendet man zur Herstellung immer Tiere einer Inzuchtlinie?
- Weshalb ist ein Doppel-Knockout- aussagekräftiger als ein Single-Knockout-Organismus.
- Stellen Sie die Prozesse bis zur Herstellung der Chimäre in geeigneter Form dar.
- Verdeutlichen Sie die Kreuzungsprozesse – ausgehend von der Kreuzung der Chimäre mit der Inzuchtlinie – bis hin zur Doppelknockoutmaus mit Kreuzungsschemata. Verwenden Sie für die Keimzellen symbolisch einen Kreis und fügen Sie nur das von ihnen gewählte Symbol für die Allele des Zielgens ein. Beachten Sie, dass es sich hier – anders als bei den Mendelschen Regeln, nicht um eine dominant-rezessiv-Betrachtung handelt.

Über Methoden der Grundlagenforschung



Abbildung selber erstellt nach Vorlagen:

http://www.google.de/imgres?imgurl=http://www.maeuseknast.de/img/maus_boxen.gif

Über Methoden der Grundlagenforschung

Lösungen zu Aufgabe 1a

Formulieren Sie das Ziel der Untersuchung.

Ziel der Untersuchung ist die physiologische Rolle der β -Sekretase (BACE1).

Lösungen zu Aufgabe 1b

Fassen Sie die Grundaussage der Untersuchung in **einem** prägnanten Satz zusammen.

Offensichtlich spielt die β -Sekretase in einer bestimmten Phase der Embryonalentwicklung eine wesentliche Rolle bei der Regulation der Neuronenmyelinisierung, also der Isolierung der Nervenfasern.

Lösungen zu Aufgabe 1c

In einer weiteren Untersuchung konnte Christian Haass beobachten, dass BACE1-Doppel-Knockout-Zebrafische unter enormen Bewegungsstörungen leiden. Erläutern Sie diese Beobachtungen.

Die Myelinisierung ist eine wesentliche Grundlage der schnellen Erregungsleitung in Neuronen (Stichwort „saltatorische Erregungsleitung“). Durch den Verlust der BACE1-Regulation nicht ausreichend myelinisierte Neuronen können das nicht mehr erfüllen, sodass Bewegungsstörungen auftauchen.

Lösungen zu Aufgabe 2a

Weshalb verwendet man zur Herstellung immer Tiere einer Inzuchtlinie?

Man möchte gern zwei Mäusestämme haben, die in sämtlichen Genen gleich sind und sich nur in dem Knock-out-Gen unterscheiden. Bei dem ersten Stamm ist es dann intakt, bei dem zweiten defekt. Dann müssen Unterschiede im Körperbau oder der Physiologie auf dieses Gen zurückgeführt werden. Daher benötigt man für dieses Experiment von vornherein einen Mäusestamm, bei dem alle Tiere den gleichen genetischen Hintergrund haben. Es werden deshalb Inzuchttiere verwendet. Diese Inzucht wird schon seit einigen hundert Generationen durchgeführt (konsequente Bruder-Schwester Verpaarung), was dazu führt, dass sich die Tiere genetisch gar nicht oder nur sehr geringfügig unterscheiden.

Lösungen zu Aufgabe 2b

Weshalb ist ein Doppel-Knockout- aussagekräftiger als ein Single-Knockout-Organismus.

Da beim Single-Knockout noch ein „intaktes“ Gen vorhanden ist, sind die Phänomene u.U. nicht so stark ausgeprägt zu beobachten. Allerdings lassen sich auch aus heterozygoten Organismen durchaus interessante Rückschlüsse ziehen.

Lösungen zu Aufgabe 2c

Stellen Sie die Prozesse bis zur Herstellung der Chimäre in geeigneter Form dar.

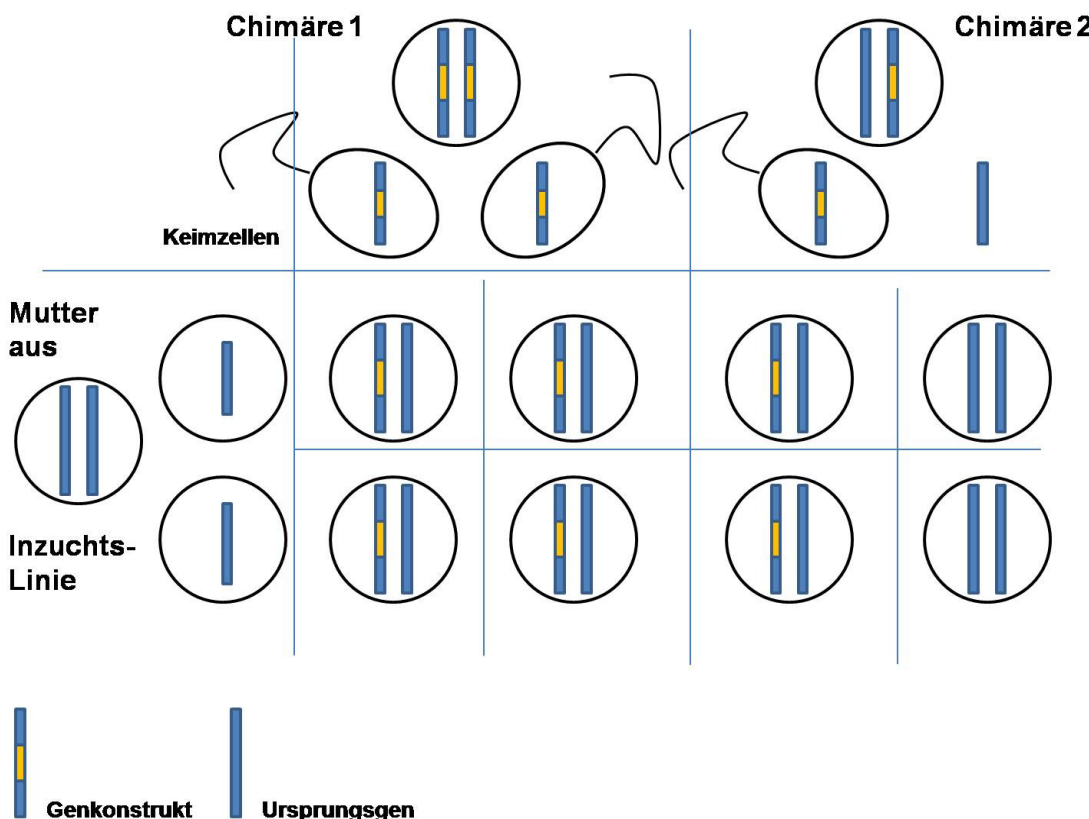
Mögliche Darstellung: Verlaufsschema oder Zeichnungen

(Quelle: http://nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/2007/info_en.pdf)

Lösungen zu Aufgabe 2d

Verdeutlichen Sie die Kreuzungsprozesse – ausgehend von der Kreuzung der Chimäre mit der Inzuchtlinie – bis hin zur Doppelknockoutmaus mit Kreuzungsschemata. Verwenden Sie für die Keimzellen symbolisch einen Kreis und fügen sie nur das von ihnen gewählte Symbol für die Allele des Zielgens ein. Beachten Sie, dass es sich hier – anders als bei den Mendelschen Regeln, nicht um eine dominant-rezessiv-Betrachtung handelt.

1. Kreuzung



2. Kreuzung

