

Zellliniengenetik

Einführung

Biologischen Prozessen in Säugetieren, und insbesondere im Mensch, gilt in der biologischen und medizinischen Forschung naturgemäss ein besonderes Interesse. Viele biologische Prozesse finden nur in Säugetieren statt und können daher nicht in Modelorganismen (z.B. Hefen oder *Drosophila*) untersucht werden. Andere Prozesse finden zwar auch in Modelorganismen statt, und deren generelle Prinzipien können dort Verstanden werden, aber für viele, vor allem medizinische Anwendungen (z.B. in der Medikamentenentwicklung), ist es dann doch notwendig die Details dieser Prozesse an Säugetier bzw. menschlichen Zellen zu untersuchen.

Die Forschung an Säugetiere, und in noch viel grösserem Masse die Forschung am Menschen, präsentieren aber eine Vielzahl von praktischen (lange Generationsdauer, sehr hohe Kosten etc.) und ethischen Herausforderungen, welche Arbeiten an intakten Organismen für viele Forschungsfragen impraktikabel machen. Zudem ist die Gewinnung von Zellen aus dem natürlichen Gewebe oft alles andere als trivial und kann z.B. leicht zu Kontaminationen oder zur Beschädigung der Zellen führen.

Man verwendet daher häufig Zellkulturen (Abbildung 1), also Säugetierzellen die ausserhalb des Organismus gehalten und vermehrt werden. In vielen Fällen sind die biologischen Prozesse in solchen Zelllinien ein sehr gutes Abbild der entsprechenden Prozesse im natürlichen Gewebe des intakten Organismus und erlauben so deren Untersuchung unter genau kontrollierbaren und reproduzierbaren Bedingungen.

Klassische genetische Untersuchungen, wie wir sie von Bakterien, Hefen und Fliegen kennen sind aber mit Säugetierzellen nur sehr schwer durchführbar. Warum das so ist und welche Techniken entwickelt wurden um genetische Experimente an Säugetier dennoch möglich zu machen sind das zentrale Thema dieses Handouts.

Primäre vs. Stabile Zellkulturen

Bei Zellkulturen unterscheidet man zwischen primären und stabilen Zellkulturen. Primäre Zellkulturen basieren auf Zellen die in einem Säugetier herangewachsen sind und dann durch eine Biopsie entnommen wurden. Solche differenzierten Säugetierzellen überleben in der Regel nur, wenn sie sich in ihrem natürlichen Umfeld, also in ihrem angestammten Gewebe befinden und dort mit dem entsprechenden Cocktail aus Nährstoffen und Wachstumsfaktoren versorgt werden. Werden die Zellen aus dieser Umgebung entfernt, ist es nur mit viel Aufwand und

genau kontrollierten Wachstumsbedingungen möglich diese Zellen für eine Weile als Zellkulturen (z.B. in Petrischalen) zu halten. Differenzierte Säugetierzellen besitzen zudem Mechanismen welche die Anzahl der möglichen Zellteilungen limitieren (Seneszenz). Die Zellen in primären Zellkulturen lassen sich also nicht beliebig vermehren.

Für viele Experimente ist es aber notwendig, dass man eine grosse Anzahl von genetisch identischen Zellen zur Verfügung hat. Man benötigt also Zellen die man beliebig vermehren und kontinuierlich in Zellkulturen halten kann. Für solche Studien verwendet man stabile Zellkulturen bzw. Zelllinien. Diese Zelllinien basieren auf Zellen in denen die Kontrolle des Zellzyklus und die Abhängigkeit der Zelle von ihrer natürlichen Umgebung ausser Kraft gesetzt sind und die so „unsterblich“ geworden sind (*Immortalization*). Krebszellen zeigen genau dieses unkontrollierte von der Umgebung weitgehend unabhängige Wachstumsverhalten. Und so basieren viele der in der Forschung weitverbreiteten Zelllinien auf Zellen die ursprünglich aus Tumoren gewonnen wurden. Die HeLa Zelllinie, die seit vielen Jahren ein weitverbreitetes Werkzeug in vielen Laboren ist und die Grundlage vieler bahnbrechender Zellbiologischer Studien war, basiert z.B. auf Zellen die einem Tumor einer Gebärmutterkrebspatientin entstammen.



Abbildung 1 Säugetierzellen können auch ausserhalb ihres natürlichen Gewebes in Kultur gehalten werden. Dies erlaubt die Untersuchung von zellulären Prozessen unter genau kontrollierbaren und reproduzierbaren Bedingungen. Zellkulturen stellen aber relativ hohe Anforderungen bezüglich ihrer Haltung. Sterile Bedingungen, speziell angepasste Wachstumsmedien und behandelte Oberflächen notwendig.

Es ist aber auch möglich Unsterblichkeit „künstlich“ herbeizuführen z.B. durch gezielte genetische Manipulationen welche die Seneszenzmechanismen der Zellen umgehen (z.B. die Expression bestimmter Viraler Gene) oder durch Fusionierung der Zellen mit einer Krebszelle (Hybridomazellen). Ziel ist es bei diesem Transformationsprozess die charakteristischen Eigenschaften des ursprünglichen Zelltyps so weit wie möglich zu erhalten. Die exakten Mechanismen die einer Transformation von Säugetierzellen in stabile Zelllinien zugrunde liegen sind aber noch nicht im Detail verstanden. Ob eine Transformation gelingt ist also oft eine Frage des Glücks und so ist die Erstellung von stabilen Zelllinien ein langwieriger Prozess ohne Garantie auf Erfolg. Die meisten Forschungsprojekte an Säugetierzelllinien nutzen daher eine relativ kleine Anzahl von Zelllinien die „per Zufall“ entdeckt wurden und deren biologische Eigenschaften weitestgehend denen von Zellen in natürlichen Geweben entsprechen aber trotzdem zuverlässig in Zellkultur gehalten werden können.

Haltung von Säugetierzelllinien im Labor

Säugetierzellen sind bezüglich ihrer Wachstumsbedingungen wesentlich anspruchsvoller als Mikroorganismen.

Typische Labormikroorganismen (z.B. *E. coli* oder *S. cerevisiae*) wachsen selbst auf einfachen Zuckerlösungen denen einige Mineralsalze und Vitamine zugesetzt wurden oder auch auf Nährmedien die auf Hefeextrakten (z.B. aus Brauereiabfällen) basieren.

Säugetierzellen hingegen benötigen Wachstumsmedien die eine Vielzahl von Nähr- und Botenstoffen in einem genau vorbestimmten Verhältnis enthalten. Auch sind bereits geringe Mengen der von den Zellen ausgeschiedenen Abfallstoffe toxisch für die Zellen. Das Wachstumsmedium für Säugetierzelllinien ist also nicht nur teuer, sondern muss auch noch sehr häufig gewechselt werden.

Die meisten Säugetierzelllinien wachsen ausserdem nur dann, wenn sie sich an eine Oberfläche anheften können. Diese Oberflächen müssen zudem noch mit speziellen Proteinen oder Polymeren beschichtet werden, welche die extrazelluläre Matrix simulieren und so ein Anbinden der Zellen an die Oberfläche des Wachstumsbehälters erlauben.

Die Zellen typischer Säugetierzelllinien teilen sich nur ca. alle 24 Stunden, wesentlich langsamer als Bakterien und Hefezellen. Bei einer Kontamination der Zellkulturen durch Bakterien oder Hefen, wird eine Zellkultur sehr schnell von diesen fremden Zellen überwachsen und können, gerade bei Hefeinfektionen, oft nicht mehr gerettet werden.

Säugetierzelllinien sind diploid und vermehren sich asexuell

Fast alle somatische Säugetierzellen sind diploid (Ausnahmen werden weiter unten besprochen) und vermehren sich asexuell durch simple Zellteilung. Dies hat wichtige Konsequenzen für genetische Studien. Durch die Diploidie werden rezessiven Phänotypen nur dann sicht-

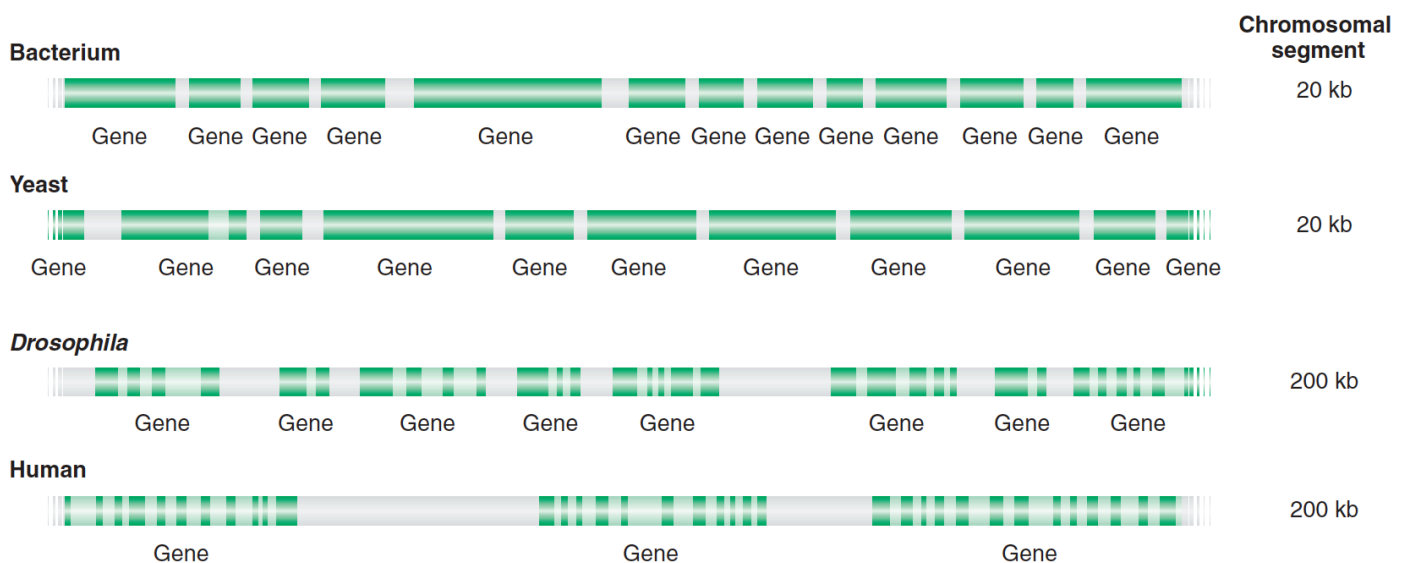


Abbildung 2 Vergleich von exemplarischen Abschnitten aus dem Genom von Bakterien, Hefe, Drosophila und Mensch. Proteinkodierende Geneabschnitte sind in dunkelgrün und Introns in hellgrün angezeigt. Beachten Sie bitte, dass der gezeigte Abschnitt der bakteriellen und Hefe Genome 20 kb und der von Drosophila und Mensch 200kb entspricht. Während das Genom von Bakterien und Hefen überwiegend aus protein-kodierenden Regionen bestehen überwiegen, insbesondere im menschlichen Genom, intronische und intergenische Abschnitte. (Abbildungsquelle Griffith et al. Introduction to genetic analysis 10th Edition)

bar, wenn beide Kopien eines Gens entsprechend verändert sind. Durch die asexuelle Fortpflanzung ist es aber nicht möglich durch Rückkreuzungen homozygote Mutationen zu erzeugen. Auch findet bei der mitotischen Zellteilung kein *crossing over* statt. Das Kartieren von Mutationen wie dies z.B. in Hefe oder *Drosophila* üblich ist kann in Zelllinien also auch nicht angewandt werden.

Säugetiergenome sind komplex und redundant

Wenn man die Struktur von Säugetiergenomen mit denen von Invertebraten oder Mikroorganismen vergleicht, so sind Genome von Säugetieren wesentlich grösser (ein haploides menschliches Genom hat mehr als 3 Milliarden Basenpaare) und komplexer. Vor allem wird ein wesentlich grösserer Teil der Sequenz von nicht protein-kodierenden Abschnitten eingenommen und die protein-kodierenden Abschnitte der Gene sind durch viele und grosse Introns unterbrochen (Abbildung 2).

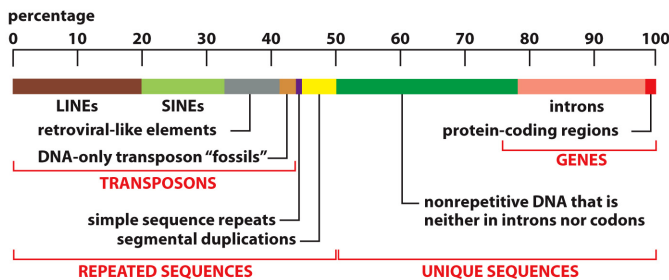


Abbildung 3 Prozentualer Anteil verschiedener Sequenzelemente am menschlichen Genom. Etwa die Hälfte des Genoms besteht aus repetitiven transposonartigen und retroviralen Sequenzen (LINEs, SINEs etc.). Die andere Hälfte des Genoms besteht zum weit überwiegenden Anteil aus Sequenzen deren Funktion bisher weitgehend unbekannt ist. Nur ca. 1,5% der Genomsequenz kodieren für Proteine. (Abbildungsquelle: Alberts et al. *Molecular Biology of the Cell*, Garland Sciences)

Die langen Abschnitte zwischen den Genen werden in Säugetiergenomen zu einem grossen Teil von repetitiven DNA Sequenzen eingenommen (Abbildung 3). Diese Sequenzen sind das Resultat der Kolonisation des Genoms durch Transposons, die sich rasch über das gesamte Genom ausgebreitet haben. Die Struktur von Säugetiergenomen ist zudem durch zwei Duplikationsereignisse (Abbildung 4) gekennzeichnet, welche nach der Abspaltung von Vertebraten und Nonvertebraten stattgefunden haben. Obwohl viele Kopien der vervielfältigten Gene über die Zeit durch Mutationen inaktiviert wurden, gibt es in Säugetieren weiterhin viele Gene deren Funktion redundant sind.

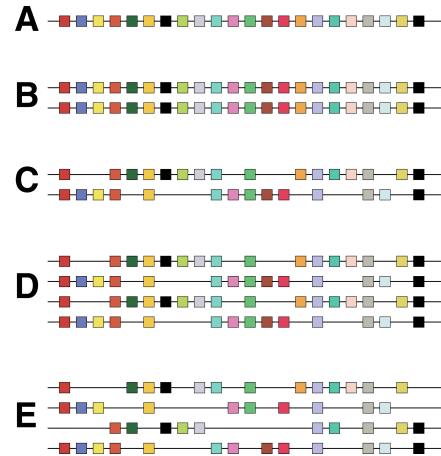


Abbildung 4 Schematische Darstellung der zwei, in der Genomgeschichte von Säugetieren stattgefundenen, Genomduplikationen. Farbige Boxen repräsentieren einzelne Gene. Die erste Genom Duplikation (B) ist gefolgt von Mutationen und Geninaktivierungen (C) bevor die zweite Duplikation (D) stattgefunden hat, die wiederum von Mutationen und Inaktivierungen gefolgt ist (E). Das Resultat ist ein Genom in dem viele aber nicht alle Gene redundant sind. (Abbildungsquelle: Dehal & Boore PLOS Biology 2005)

Die Eigenschaften von Säugetierzelllinien verlangen nach neuen genetischen Ansätzen

Die genetischen Studien, die bisher im Kurs behandelt wurden, folgten stets einem ähnlichen Muster: In genetisch diversen Populationen (oft erzeugt durch Zufallsmutagenese) wurden Individuen identifiziert, die einen bestimmten Phänotyp aufwiesen. Ausgehend von diesem Phänotyp wurde dann dasjenige Gen identifiziert, dessen Inaktivierung (oder Änderung) diesen Phänotyp hervorgerufen hatte. Dieser „klassische“ Ansatz wird im Englischen als *forward genetics* (wörtlich „Vorwärtsgenetik“) bezeichnet und ist besonders bei Mikroorganismen und Invertebraten (z.B. *Drosophila*) beliebt und sehr erfolgreich (Abbildung 5).

Bei Säugetierzellen, stösst dieser Ansatz aber an seine Grenzen. Wie wir gesehen haben sind die Genome von Säugetieren diploid und durch Ihre asexuelle Fortpflanzung ist die Erzeugung von homozygoten Mutanten durch Kreuzungen nicht möglich. Zudem führt die hohe Redundanz von Säugetiergenome dazu, dass selbst homozygote *loss-of-function* Mutationen manchmal keinen erkennbaren Phänotyp hervorrufen.

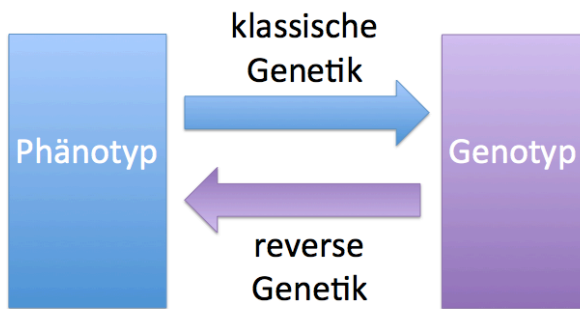


Abbildung 5 In der klassischen Genetik (forward genetics) sucht man ausgehen von einem Phänotyp die für diesen Phänotyp verantwortlichen Gene. Bei der reversen Genetik verändert man gezielt ein bestimmtes Gen und beobachtet dann welche Phänotypen durch diese Veränderung hervorgerufen werden.

Wird durch eine Zufallsmutation dennoch einmal ein Phänotyp generiert so ist es überaus schwierig die dafür verantwortliche Mutation zu identifizieren. Der Grund hierfür ist, dass durch die asexuelle Fortpflanzung der Zelllinie keine Kreuzungen möglich sind und auch keine *crossing-over* stattfinden wodurch klassische Kartierung unmöglich ist. Das Zusammenwirken dieser Faktoren macht *forward genetics* Studien an Säugetierzelllinien so zeitaufwendig, ressourcenintensiv und teuer, dass sie in der Forschung kaum eine Rolle spielen.

Stattdessen verwendet man in der genetischen Forschung an Säugetierzellen zumeist einen sogenannten *reverse genetics* Ansatz (). Bei diesem Ansatz verändert (oder inaktiviert) man gezielt ein bestimmtes Gen und beobachtet dann, ob diese genetische Veränderung zu phänotypischen Veränderungen führt. Eine *reverse genetics* Studie beginnt also mit einem Gen und endet mit einem Phänotyp und nimmt somit den umgekehrten (engl. *reverse*) Weg einer traditionellen genetischen Studie.

Beim *reverse genetics* Ansatz fällt auch die Kartierung der für den Phänotyp verantwortlichen Mutation fort. Denn die Mutation wurde ja von dem Experimentator gezielt eingeführt.

Für *reverse genetics* Experimente stehen eine Reihe von Experimentellen Techniken zur Verfügung von denen die wichtigsten in den folgenden Abschnitten besprochen werden.

Transiente und stabile Überexpression von Genen in Zelllinien

Eine der klassischen Methoden der reversen Genetik ist die Expression von Genen welche künstlich in die Zelle eingeführt wurden. Dabei werden entweder zusätzliche Kopien des wild-typ Gens verwendet und diese dann überexprimiert oder eine veränderte Variante des Gens

wird zusätzlich zum wild-typ Gen exprimiert. Um dieses neue genetische Material in eine Zelle einzuschleusen und dort zu exprimieren stehen Forschern eine Vielzahl von verschiedenen Labormethoden zur Verfügung. Eine Gruppe dieser Methoden beruht auf der Einschleusung von DNA Plasmiden, welche die gewünschten Gene enthalten, mittels chemisch / physikalischer Methoden. Besonders beliebt ist hier die Verwendung von Lipofectamin, einem kationischen Lipid mit dem man die einzuführende Plasmid DNA umhüllt. Die so erzeugten liposomen-artigen DNA-Lipid Komplexe werden dann zur Nährlösung gegeben, fusionieren dort mit der vorwiegend aus anionischen Lipiden geformten Zellmembran und gelangen so in das Innere der Zelle und von dort in den Zellkern. Diese Transfektionsmethode wird vor allem für transiente Genexpression verwendet. Bei transienter Expression wird die in die Zelle eingeschleuste DNA von der Zelle nicht repliziert und auch nicht in das Genom integriert, sondern Transkription findet direkt von dem eingeschleusten DNA Molekül statt. Hier ist die relativ lange Generationszeit von Säugetierzellen ausnahmsweise ein Vorteil. In auf transienter Transfektion basierenden Experimente wird der Phänotyp der Zellen in der Regel nur über 1-2 Tage beobachtet. Während dieser Zeit teilen sich die Säugetierzellen also maximal einmal. Das Einschleusen einiger weniger Kopien einer Plasmid DNA in eine Zelle reicht also aus um selbst die durch Zellteilung entstehenden Tochterzellen mit Plasmid DNA zu versorgen, ohne dass diese DNA dazu von den Zellen repliziert werden muss.

Für andere Anwendungen ist es interessant fremde oder veränderte Versionen von zelleigenen Genen permanent in das Genom der Zelle zu integrieren. Hierzu verwendet man in der Regel retrovirale Transduktionssysteme bei denen die gewünschte Gensequenz in das Retrovirusgenom eingesetzt wird. Die Zellen werden dann mit diesem Virus infiziert und die virus-eigene Maschinerie bewirkt dann den Einbau dieser Gensequenzen in das zelluläre Genom. Die neue Gensequenz wird dann bei jeder Zellteilung an die Tochterzellen weitergegeben. Oft werde dabei zusammen mit der gewünschten Gensequenz zusätzlich Markergene (z.B. GFP oder Resistenzgene) in das Genom eingeschleust. Dadurch ist es dann leicht möglich die Integration der neuen Gensequenzen in das Genom der Säugetierzelle zu verifizieren.

RNAi

Die RNAi Technologie, welche Sie bereits im Kurs kennen gelernt haben ist in Zelllinien besonders beliebt. RNAi ist wohl die einfachste Methode mit *reverse genetics* Methoden einen *loss-of-function* Phänotyp zu approximieren. Wie Sie aber wissen wird Genfunktion durch den RNAi Ansatz zumeist nur reduziert und nicht vollständig ausgeschaltet.

CRISPR/CAS9

Die hohe Effizienz mit der mittels der CRISPR/Cas9 Technologie Mutationen in genomischer DNA eingeführt werden können macht es neuerdings möglich in einer Zelle beide Kopien eines Gens gleichzeitig auszuschalten. Auf diese Weise ist es möglich mit den entsprechenden sgRNA Libraries Zellpopulationen zu erzeugen in denen systematisch jedes einzelne Gen homozygot ausgeschaltet ist. Die Details dieser Methode haben sie bereits im Kursabschnitt RNAi – CRISPR/Cas9 kennengelernt.

Haploide Zelllinien ein besonders Werkzeug für die Zelllinien Genetik

Wie oben beschriebenen, stellt die Diplodie von Säugerzellen für viele genetische Untersuchung ein zentrales Problem dar (z.B. bei der Untersuchung von rezessiven *loss-of-function* Mutationen). Wären Zelllinien haploid fiel dieses Problem fort. Wie aber kann man Haploide Zelllinien erzeugen?

Auch hier kommen dem Forscher wieder durch Zufall entstandene Krebszellen zur Hilfe. Die HPA1 Zelllinie, die von Zellen eines Leukämie Patienten abstammen, besitzt, mit Ausnahme von Chromosomen 8 und 15, von jedem Chromosom nur eine Kopie. Diese Zelllinie ist also fast haploid und kann dennoch stabil und ohne Probleme über viele Generationen im Labor gehalten werden. Dies ist aber nur möglich, weil diese Zellen eine Reihe von zusätzlichen genetischen Veränderungen besitzen, welche ein Überleben in diesem haploiden Zustand ermöglichen. Diese Veränderungen beeinflussen auch gewisse andere Eigenschaften der Zellen. HPA1 Zellen sind z.B. deutlich kleiner als äquivalente diploide Zellen. Bei der Arbeit mit haploiden Zellen gilt es wie schon so oft im Kurs darum die experimentellen Vorteile, welche die besonderen Eigenschaften dieses experimentellen Systems bieten, gegen die Tatsache abzuwägen, dass die untersuchten Prozesse nicht exakt denen einer natürlichen Zelle entsprechen.

Andere Tierzellen können künstlich in einen haploiden Zustand versetzt werden. Dazu wird in Eizellen durch Behandlung mit entsprechenden Wachstumsfaktoren eine Zellteilung eingeleitet, ohne, dass diese zuvor befruchtet wurde. Die Technologie zur Herstellung und Propagierung solch haploider Zelllinien werden nur von wenigen Labor beherrscht. Details dieses Prozesses und deren Anwendung in der aktuellen Forschung werden in der Vorlesung von Prof. Wutz besprochen.