

Wieso ist das Kartieren von Mutationen in Säugern nicht möglich? Man könnte die Mutanten mit homologer Rekombination retten.

Ausserhalb der Meiose findet homologe Rekombination eigentlich nur nach einer Beschädigung der DNA durch einen Doppelstrangbruch statt. Die Meiose findet in einer Zelllinienkultur aber nicht statt (nur Mitose). Klassisches Komplementationsmapping wie es in *Drosophila* und Hefe möglich ist funktioniert bei Säugetier Zelllinien also nicht.

Durch die CRISPR/Cas Technologie kann man aber inzwischen gezielt Doppelstrangbrüche erzeugen die dann durch das Anbieten einer Template DNA (z.B. auf einem Plasmid) via homologer Rekombination repariert werden kann. So kann man eine alte Version eines Gens durch eine neue ersetzen. Dies führt zwar letztendlich zum Selben Ergebniss, ist aber unvergleichlich aufwändiger als Rekombinationen bei Kreuzungen in Hefe oder *Drosophila*.

Ist der Insertionsort bei einer retroviralen Transfektion steuerbar?

Generell ist der Insertionsort zufällig. Es kann also passieren, dass die eingeführte DNA in einem Bereich des Genoms integriert wird besonders dicht oder locker gepackt ist und daher weniger bzw. mehr transkribiert wird. Zwei Zelllinien die mit demselben Virus und demselben eingeführten Gen hergestellt wurden können also potentiell unterschiedliche Phänotypen aufweisen. Es gibt aber auch Systeme die eine gezielte Einführung eines Gens an einer bestimmten Stelle im Genom erlauben. Diese sind aber wesentlich aufwändiger in der Anwendung.

Reguliert eine transient transfizierte Zelle die Plasmide herunter?

Das kann durchaus vorkommen, aber der Hauptmechanismus durch den eine transient transfizierte Zelllinie nach einer gewissen Zeit aufhört das transfizierte Gen zu exprimieren ist die Abwesenheit eines Replikationsmechanismus für die eingeführte DNA. Nach ein paar Generationen enthält also nur ein verschwindend kleiner Anteil der Zellen eine Kopie der eingeführten DNA.

Hat die Anzahl der Plasmide einen Einfluss auf den Phänotyp?

Ja die Anzahl der Kopien der eingeführten DNA in einer transient transfizierten Zelle kann durchaus einen Einfluss auf den Phänotypen haben. Je mehr eingeführte DNA desto höher ist vermutlich die Expression der enthaltenen Gene. Es gibt in der Regel auch einen grossen Prozentsatz von Zellen die gar keine Kopie der transfizierten DNA enthält. Um die Experimente reproduzierbar zu gestalten misst man daher im Regelfall nicht den Phänotypen einzelner Zellen sondern einen Mittelwert über mehrere Zellen, die alle mit derselben DNA transfiziert wurden.

Auf Seite 5 unten steht: bei unbefruchteten Eizellen wird Zellteilung angeleitet. Das ist schon vergleichbar mit einer Mitose oder, also die 23 vorhandenen Chromosomen werden repliziert, bevor sich die Eizelle teilt, oder ist mir da ein Denkfehler unterlaufen.

Ja es ist wie eine Mitose ohne vorherige Befruchtung.

Wie ist es möglich, das Medium der Zelllinien zu wechseln, ohne die Zellen selbst zu verlieren?

Die Zellen binden sich während ihrem Wachstum sehr stark an die Oberflächen des Wachstumsbehälters. Es ist also relativ einfach das Wachstumsmedium abzusaugen und durch frisches zu ersetzen.

Ist bei allen Säugetierzellkulturen stets die reverse Genetik der gewählte Ansatz? Kann bei haploiden Zelllinien auch forward genetics angewendet werden oder überdeckt die Redundanz auch hier alle Mutationen?

Haploide Zellkulturen machen in der Tat forward Genetik Ansätze an Zelllinien möglich.

Bei der Insertion eines Plasmids über Lipofectamin ist ja ein Vorteil, dass auch die Tochterzellen ohne zusätzliche Zugabe von Plasmiden die Insertion noch erhalten. Habe ich das richtig verstanden, dass das so ist, da sich die Zelle nur einmal teilt und deshalb die Chance gross ist, dass beide Tochterzellen ein Plasmid bekommen aus der Parentalzelle, da diese einfach durch die Zellteilung aufgeteilt werden. Und ist es dann nicht so, dass es zufällig ist ob beide Tochterzellen ein Plasmid bekommen oder eben nicht, je nachdem wie sie bei der Zellteilung im Cytoplasma gelegen sind? Respektive könnte es bei zwei Tochterzellen aus einer Parentalzelle also eine geben, welche einen veränderten Phänotyp zeigt und eine die keine Veränderung zeigt oder?

Ja Sie sehen das richtig. Die Zellpopulation die bei der transienten Transfektion erzeugt wird ist in der Tat heterogen. Deshalb misst man den Phänotyp in der Regel nicht an einer einzelnen Zelle, sondern mittelt den Phänotyp über mehrere Zellen.

Wieso braucht man reverse genetics nicht auch bei Modelorganismen?

Reverse Genetics wird durchaus auch bei Bakterien, Hefen und *Drosophila* verwendet. Umgekehrt ist bei Säugetieren und deren Zelllinien die Verwendung von Forward Genetics sehr schwierig und daher unüblich.

Säugetierzellen haben ja lineare Chromosomen. Ist die Transkription eines ringförmigen Plasmids in einer Säugetierzelle so ohne weiteres möglich? Bzw. müssen die Plasmide gewisse Eigenschaften aufweisen, damit dies möglich ist (bspw. eine minimale Grösse)?

Transkription kann sowohl von ringförmigen als auch von linearen DNA Strängen stattfinden. Die Frage ob linearisierte (also an einer Stelle geschnittene) oder ringförmig Plasmide verwendet werden haben aber einen Einfluss auf die Effizienz mit der die Plasmide in die Zelle geschleust werden können.

Warum wehren die Zellen die fremde Retroviren-DNA nicht ab?

Der primäre Abwehrmechanismus von Säugetieren gegen Viren ist das auf weissen Blutkörperchen basierende Immunsystem. Die Zellkulturen enthalten aber nur jeweils einen Zelltyp z.B. Leberzellen oder Fibroblasten die selber keine eigene Immunfunktion besitzen.

Welches sind die typischen Forschungsgebiete, bei denen mit Zelllinien gearbeitet wird, anstatt mit *Drosophila*/Hefen (neben der Krebs-Forschung)?

Generell werden Zelllinien immer dann verwendet, wenn es nicht um generelle zellbiologische Fragen geht, sondern um spezifische Prozesse die nur in einem Säugetier stattfinden bzw. bei denen Unterschiede zwischen . Gerade im medizinischen Bereich ist die Arbeit mit Zelllinien sehr verbreitet.

Über eine Erläuterung der Genomduplikation wäre ich dankbar. Im Text steht, dass das Säugetiergenom durch zwei Duplikationsereignisse nach der Abspaltung von den nonvertebraten gekennzeichnet ist. Welcher Teil des Genoms wurde dabei genau dupliziert? Was sind Beispiele von solchen duplizierten Genen?

Bei der Genomduplikation handelt es sich in der Tat um eine Duplikation des gesamten Genoms. Man kann sich dies vorstellen wie die Entstehung eines Tetraploiden Organismus bei dem sich die doppelt vorliegenden Kopien der Chromosomen durch Mutationen verändern. Durch diese Mutationen ging dann die Funktion von vielen der doppelt vorliegenden Gene verloren. Von einer grossen Anzahl der Gene blieben aber weiterhin die Kopien erhalten so dass moderne Säugetiere von vielen Genen mehrere Kopien besitzen.

Mich irritiert der Begriff „forwards genetics“. Man geht ja vom Phänotypen zurück zum Genotypen.

Kann Ihre Irritation gut verstehen. Mir geht es ähnlich. Historisch gesehen war das was wir nun „forward genetics“ nennen einfach nur „Genetik“. Dann wurde aber der alternative Ansatz der „reverse genetics“ entwickelt, der ja in der Tat den umgekehrten Ansatz verfolgt als es in der Genetik bis dahin üblich war. Man brauchte also nun auch einen Begriff um die „klassische“ Genetik zu bezeichnen und dafür hat sich dann der Begriff „forward genetics“ eingebürgert.

Die meisten dieser Zelllinien wurden ja per Zufall gefunden. Ist das so, weil jemand einem Patienten Zellen entnahm und sah, dass diese auch in der Petrischale noch überleben? Lebten diese dann ohne grossen Aufwand und ohne richtige Oberfläche zum Anheften? Zellkulturen waren und sind ein beliebtes Forschungswerkzeug in der biomedizinischen Forschung. Dabei versucht man Zellen aus Patientengeweben in Petrischalen so lange wie möglich am Leben zu erhalten um an ihnen Experimente durchzuführen. Dabei kommt es vor, dass diese Zellen (oft Zellen aus Tumorgeweben) manchmal einfach weiterwachsen und nicht sterben. Viel der frühen Zelllinien basierten auf solchen Zufallsfinden.

S.4: Wieso muss man ein Mapping machen, um den Genotypen festzustellen? Wieso sequenziert man nicht einfach das Genom?

Diese Frage wurde ausführlich in den Abschnitten *Drosophila* Genetik und „Entwurf einer Studie“ besprochen. Bitte schauen Sie dort noch einmal nach.

Kann man diese Zelllinie so im Internet bestellen (z.B. HPA1)? Sind diese dann immer noch die Zellen von diesem Leukämie Patienten, bei dem man sie zum ersten Mal fand?

Ob genau diese Zelllinie kommerziell erhältlich ist, ist mir nicht bekannt aber viel Zelllinien kann man von kommerziellen Anbietern beziehen. Es handelt sich dann tatsächlich um Zellen, die direkte Nachfahren der Zellen des Leukämie Patienten sind. Ein berühmter Fall sind HeLa Zellen die in der medizinischen Forschung sehr weit verbreitet sind. Alle diese Zellen stammen direkt von den Zellen einer bestimmten Patientin ab. Interessanterweise wurde die Zelllinie ohne die Zustimmung dieser Patientin angelegt was zu heftigen Diskussionen über die ethische und rechtliche Grundlage der Forschung mit diesen Zellen geführt hat.

Weshalb kann man die Methode des Flp/FRT-Systems nicht anwenden, um Crossing-over in der Mitose und dementsprechend homozygote Zellen zu generieren?

Um das Flp/FRT System in Drosophila anzuwenden müssen vorher mehrere Kreuzungen zwischen unterschiedliche Fliegen durchgeführt werden (z.B. Fliegen, die FLP Sequenz auf einem bestimmten Chromosomen Arm tragen müssen mit Fliegen gekreuzt werdend, die zu untersuchende Mutation tragen). Wenn man also erst einmal die entsprechenden Zellen hätte, könnte man eine mitotische Rekombination induzieren und homozygote Zellen erzeugen. Für die Herstellung dieser Zellen wären aber zuvor Kreuzungen nötig, die aber unmöglich sind. In Säugetieren gibt es mit dem Cre/Lox System übrigen auch ein dem Flp/FRT verwandtes System zur Induzierung von mitotischen Rekombinationen. Diese System wird aber nicht für die Herstellung von homozygot mutierten Zelllinien verwendet.

Im Skript heisst es, dass kein crossing-over in den Zelllinien statt findet, da sie diploid sind und sich asexuell teilen. Dieselbe Ausgangssituation hat man ja auch in einer ausgewachsenen Drosophila, aber dort hat man ja einen Weg gefunden, crossing-over zu induzieren. Ist das in Zelllinien nicht auch möglich?

Die Antwort auf die vorhergehende Frage beantwortet auch diese Frage.

Im Text wird erwähnt, dass durch die hohe Redundanz selbst homozygote loss-of-function Mutationen manchmal keinen erkennbaren Phänotyp hervorrufen. Bezieht sich das darauf, dass teils mehrere Kopien eines Gens vorhanden sind oder wie muss ich das verstehen?

"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"; Wenn man doch das wild-typ Gen einsetzt wird das Gen doch nicht ausgeschaltet?

Das Hand-Out erklärt zunächst warum forward genetics, welche sehr stark auf der Generierung von homozygoten loss-of-function Mutationen basiert, in Säugetierzelllinien nicht wirklich praktikabel ist. Einer der Gründe dafür ist, dass man keine einfache Methode hat um aus heterozygoten loss of function Mutanten durch Kreuzung homozygote Mutanten zu machen. Ein zweiter Grund ist, dass die Genome von Säugetieren generell redundant sind, wodurch selbst homozygote Mutanten, in denen sowohl die mütterliche als auch die väterlichen Kopien eines Genes inaktiviert sind, oft keinen Phänotyp zeigen, weil ein anderes Gen die Funktion des inaktivierten Gens übernehmen kann.

Aufgrund dieser Schwierigkeiten verwendet man bei Zelllinien reverse genetics Ansätze. Einer dieser Ansätze ist die Überexpression von Genen oder die Expression von Genen die gezielt verändert wurden so dass sich ihre Funktion von der des wild-typ Gens unterscheiden. Dies wären dann gain-of-function Mutationen (also mehr Aktivität des wild-typ Gens oder eine zusätzliche neue Aktivität des veränderten Gens). Der Phänotyp der dabei erzeugt wird ist natürlich ein anderer als der, der bei einer Inaktivierung des Gens auftritt. Anders als bei loss-of-function Mutationen verhindert bei gain-of-function Mutationen die Anwesenheit einer funktionalen Kopie des Gens nicht die Expression des Phänotyps.

Die folgenden Fragen sollten bereits in der Vorlesung beantwortet worden sein.

Ich erinnere mich, dass im Praktikum im 2. Semester erwähnt wurde, dass man Zelllinien auch immer mal wieder überprüfen muss, ob sie sich nicht durch Mutationen etc. verändert haben. Ist es wirklich so einfach Zelllinien über Jahrzehnte (wie die HeLa-Zellen) im Labor zu halten? Und was passiert, wenn sich die Zellen tatsächlich verändern? Werden sie entsorgt und durch neue ersetzt, oder wird weiter untersucht, wo die Veränderung liegt und wie man einen scheinbaren Nachteil für weitere Forschung verwenden könnte? Und wie sieht es aus, wenn mit den verwendeten Zelllinien eine Publikation zustande kommt? Welche Angaben zu diesen Zellen müssen gemacht werden, damit Resultate vollständig reproduzierbar sind?

In haploiden Zelllinien gibt es immer noch redundante Gene. Kann man immer direkt vom Genotyp auf den Phänotyp schließen?

Gibt es Prozesse in Säugern die auf ein diploides Genom angewiesen sind?

Mir ist nicht klar, wie man "zufällig"; eine (fast) haploide Zelllinie wie die HPA1 Zellen erschafft.

Wo liegt das Hauptproblem bei der Herstellung dieser haploiden Zelllinien. Also wieso benötigt zB HPA1 noch weitere Mutationen um haploid überleben zu können? Was sind das für Mutationen?

In welche Richtung wird sich die Forschung in der Zukunft entwickeln? Wird CRISPR/CAS9 die Methoden des Gebrauchs von Plasmide als Transfektionsmethode oder retrovirale Transduktionssysteme ersetzen?

Meine Frage bezieht sich auf die reverse Genetik. Ist diese Methode auf einen ganzen Organismus anwendbar? Kann man alle Zellen mit CRISPR/Cas bearbeiten, oder müsste man das mit den Gameten und der Eizelle am Anfang der Entwicklung machen?

Wie weiss man, ob eine Zellkultur eine gute Näherung für einen vollständigen Organismus ist?

Ich würde gerne mehr über die Haploidisierung von Säugetierzelllinien erfahren.