

Ein Referat von Nadine Lauer

Institut für Pharmakologie u. Klinische Pharmakologie

Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf



Ein transgenes Tier in der Gefäßforschung

Wie wirkt sich Fitnessstraining auf molekularer Ebene auf die Gefäßwand aus?

Im Januar 1999 begann ich meine Promotion am Institut für Pharmakologie und klinische Pharmakologie der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf in der Arbeitsgruppe von Dr. Georg Kojda. Seine Arbeitsgruppe beschäftigte sich unter anderem schon lange Zeit mit den Wirkungen von Stickstoffmonoxid (NO) bei Hypertonie und Atherosklerose.



EIN REFERAT
AUS DER
PHARMAZEUTISCHEN
WISSENSCHAFT

>••|

Seit einigen Jahren ist bekannt, dass körperliches Training zu einer Heraufregulation der endothelialen NO-Synthase in der Blutgefäßwand führt. Dieses Enzym bildet NO, einen Mediator, dem gefäßprotektive Eigenschaften zugeschrieben werden. Es gibt Hinweise dafür, dass Wasserstoffperoxid an dieser Heraufregulation beteiligt ist.

Meine Aufgabe sollte es sein, zunächst eine transgene Mauslinie zu etablieren, welche endothelzellspezifisch das Enzym Catalase überexprimiert und diese Mäuse dann nachfolgend zu untersuchen. Da im Pharmaziestudium nur sehr wenig molekularbiologisch gearbeitet wird und ich auch nicht viel über transgene Tiere wusste, begab ich mich in vollkommenes Neuland. Im folgenden möchte ich über meine Erfahrungen bei dieser Arbeit berichten und einen kleinen Einblick in die Welt der Gene und transgenen Tiere geben.

Hintergrund: NO und vaskulärer oxidativer Stress

Zunächst möchte ich versuchen darzulegen, was der Idee, ein Tier herzustellen, welches Catalase überexprimiert, zugrunde liegt:

NO, ein wichtiger Mediator innerhalb des kardiovaskulären Systems, wird durch die endotheliale NO-Synthase (eNOS) in den Endothelzellen gebildet und auch als EDRF (endothelabhängiger, relaxierender Faktor) bezeichnet. NO weist vor allem gefäßerweiternde, antiaggregatorische, antiadhäsive, antiapoptische und antioxidative Effekte auf.

Kardiovaskuläre Erkrankungen wie Hypertonie, Diabetes, Atherosklerose und Herzinsuffizienz gehen mit einer endothelialen Dysfunktion einher. Dies bedeutet, dass in der Gefäßwand ein Mangel an bioaktivem

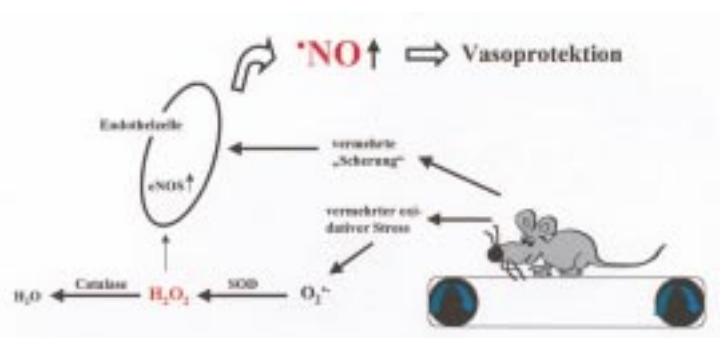
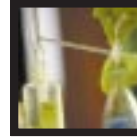


Abb. 1: Körperliches Training induziert eine Erhöhung von „shear stress“ durch den gesteigerten Blutfluss, sowie einen erhöhten oxidativen Stress durch den gesteigerten Stoffwechsel. Es ist geplant zu untersuchen, welchen Einfluss H_2O_2 auf die trainingsinduzierte Regulation der eNOS ausübt.



NO herrscht, was zu einer Verminderung der NO-abhängigen Vasorelaxation führt. Der Mangel an NO rührt daher, dass NO sehr schnell mit Sauerstoffradikalen, welche bei Hypertonie und Atherosklerose vermehrt gebildet werden, zu toxischen Produkten reagiert. So reagiert NO mit Superoxidradikalen (O_2^-) sehr schnell zu Peroxynitrit ($ONOO^-$), welches ein sehr starkes Oxidans darstellt: NO wird also durch reaktive Sauerstoffverbindungen abgefangen, wodurch dessen physiologischen Funktionen in der Gefäßwand stark gehemmt werden.

Wasserstoffperoxid (H_2O_2) entsteht im Gefäßgewebe durch Umsetzung von O_2^- durch die Superoxiddismutase. Bisherigen Erkenntnissen zufolge könnte H_2O_2 sowohl hemmend, als auch fördernd auf die Entwicklung von oxidativ bedingten krankhaften Gefäßveränderungen wirken. Zum einen ist bekannt, daß H_2O_2 ein starkes Oxidans ist und somit ein schädigendes Agens darstellt. Zum anderen gibt es Hinweise dafür, dass H_2O_2 NO-Effekte, wie Vasorelaxation fördert. In isolierten Gefäßwandzellen ist H_2O_2 in der Lage, die Aktivität

und Expression der eNOS zu steigern.

H_2O_2 wird durch das Enzym Catalase zu H_2O entgiftet. Durch Etablierung einer Tierlinie, in der die Catalase spezifisch in den Endothelzellen überexprimiert wird, dort also das H_2O_2 vermehrt abgebaut wird, soll die Bedeutung von H_2O_2 bei Gefäßerkrankungen näher untersucht werden.

Geplante Untersuchungen

Geplant sind Blutdruckmessungen bei den transgenen Tieren im Vergleich zu Kontrolltieren. Des Weiteren ist geplant, die Tiere einem Laufbandtraining zu unterziehen. Warum Laufbandtraining? Körperliches Training ist bekanntermaßen wichtig zur Prävention kardiovaskulärer Erkrankungen. Es ist bekannt, dass Training die eNOS-Expression steigert. Wie dies genau geschieht, gilt es aufzuklären. Man weiß, dass das Training eine Steigerung der Scherkräfte und des oxidativen Stresses auf die Arterienwand bewirkt. Wir wollen nun untersuchen, welche Bedeutung dem H_2O_2 dabei zukommt und wollen die eNOS-Expression nach Laufbandtraining

bei den transgenen Tieren im Vergleich zu Kontrolltieren messen (Abb.1).

Herstellung des Genkonstruktes

Wie geht man nun die Herstellung einer transgenen Tierlinie an? Es muss zunächst das Genkonstrukt hergestellt werden, welches in das Mausgenom eingebracht wird. Dieses Genkonstrukt sollte bei uns aus der humanen cDNA der Catalase, also der genetischen Information zur Produktion der Catalase, sowie einem Promotor bestehen, welcher vor die Catalase cDNA gebaut wird. Durch den verwendeten Promotor (TIE-2-Promotor aus der Maus) wird die Expression dahingehend kontrolliert, dass sie endothelzellspezifisch ist, das heißt, dass die Catalase nur dort vermehrt gebildet wird. In der Maus reguliert dieser Promotor die Embryonalentwicklung des vaskulären Systems.

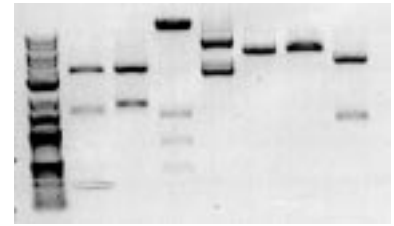


Abb. 2: Beispiel für ein Agarosegel, auf dem Fragmente, nach Restriktionsverdau mit verschiedenen Enzymen, aufgetrennt sind (linke Bande: Größenstandard).

FORTSETZUNG AUF SEITE 12



Fax-Formblatt



Ihre Anliegen, Kommentare, Anregungen und Fragen sind uns wichtig. Um die Kommunikation zu erleichtern, können Sie das mit dem Apothekenstempel versehene Formblatt an den entsprechenden Gesprächspartner des Herausgeberbeirates faxen. Für jede der vier pharmazeutischen Disziplinen steht Ihnen ein Kollege zur Verfügung. Wir werden unser Bestes tun Ihnen schnellstmöglich zu antworten.

Ihr Anliegen: _____



Chemie

PD Dr. K.-J. Schleifer
Fax: 0211-81-13847
Tel. 0211-81-12532
Email: kjs@pharm.uni-duesseldorf.de

Biologie

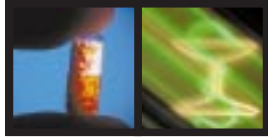
PD Dr. C. Passreiter
Fax: 0211-81-11923
Tel. 0211-81-14172
Email: passreit@uni-duesseldorf.de

Technologie

Prof. Dr. C. Leopold
Fax: 0341-4123007
Tel. 0341-4229745
Email: cleopold@uni-leipzig.de

Pharmakologie

PD Dr. G. Kojda
Fax: 0211-81-14781
Tel. 0211-81-12518
Email: kojda@uni-duesseldorf.de



>> FORTSETZUNG VON SEITE 11

Vermehrung der Ausgangsplasmide

Als Ausgangsprodukte bekam ich zwei Plasmide. Plasmide sind ringförmige DNA-Moleküle, die als Klonierungsvektoren benutzt werden. Man kann in diese Plasmide die gewünschte DNA einbauen und anschließend vermehren. Die Vermehrung erfolgt durch Transformation der Plasmide in Bakterienzellen (meist E-Coli-Zellen). Die Bakterienzellen nehmen durch einen kurzen Hitzeschock das gewünschte Plasmid auf. Anschließend lässt man die Zellen in einem antibiotikahaltigen Medium wachsen. Der Trick dabei besteht darin, dass nur die Bakterienzellen wachsen können, die ein Plasmid aufgenommen haben, da sie dadurch resistent gegen das zugesetzte Antibiotikum werden. Auf diese Weise kann man schnell das gewünschte Gen vermehren. Anschließend werden die Zellen geerntet und das Plasmid wieder aus den Bakterienzellen herauspräpariert. Von meinen Plasmiden enthielt eines die cDNA der humanen Catalase, das andere enthielt die DNA des TIE-2 Promotors.

Diese Plasmide habe ich zunächst, wie beschrieben, vermehrt um genügend DNA als Ausgangsmaterial für die Klonierung zu erhalten. Bei der Vermehrung der Plasmide musste ich mich daran gewöhnen, sehr sauber und steril zu arbeiten, da man sonst schnell unerwünschte Pilze oder Sonstiges vermehrt. Die verwendeten Medien und Lösungen, sowie die Pipetten müssen steril sein, um Kontaminationen zu vermeiden. Um zu überprüfen, ob ich auch die richtigen Plasmide vermehrt und isoliert habe, habe ich eine so genannte Restriktionsanalyse durchgeführt. Dabei macht man es sich zu Nutze, dass es bestimmte Enzyme (Restriktionsendonucleasen) gibt, die die DNA nur an der jeweils für das Enzym spezifischen Erkennungssequenz (meist 6–8 Basen) schneiden. Da ich die Gesamtgröße und die Lage der Restriktionsschnittstellen der Vektoren und der inklonierten Catalase bzw. des Promotors kannte, wusste ich, was für Fragmente beim Schneiden der DNA entstehen mussten. Diese Fragmente kann man durch eine Gelelektrophorese auf einem Agarosegel auftrennen und sichtbar machen. Die Größen der Fragmente kann man ablesen, indem man einen so genannten Marker mitlaufen lässt, der Fragmente definierter Größe enthält (Abb. 2, S.11).

Klonierungsstrategie

Ziel war es, die cDNA der Catalase in den Vektor zu klonieren der den TIE-2-Promotor enthält, und zwar direkt hinter den Promotor. Um dies zu erreichen, muss man die Genstücke zusammensetzen. Die Enden der Einzelteile müssen dabei allerdings zusammenpassen. Das kann man sich vorstellen, wie bei einem Puzzle. Der Promotor sollte mit den Enzymen Sse83871 und MluI geschnitten werden und die Catalase sollte zwischen diese beiden Schnittstellen gebaut werden. (s. Abb.3).

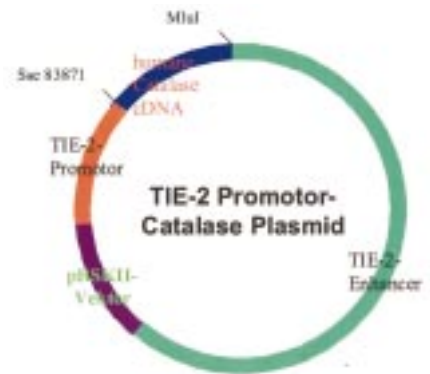


Abb. 3a: Tie-2 Promotor-Catalase Plamid nach Klonierung

Theoretisch hätte man die Catalase mit den selben Enzymen aus ihrem Vektor schneiden können. So hätte das Genstück passende Enden gehabt und man hätte die beiden Teile vereinigen können. Da aber keine derartigen Schnittstellen im Catalasevektor existierten, war dies leider nicht möglich. Mein Problem war es also ganz grob gesagt, die Teile passend zu machen. Was war also zu tun?

Zunächst habe ich versucht, die jeweils überhängenden Enden mit Hilfe eines Enzyms (T₄-Polymerase) zu einem glatten doppelsträngigen Ende aufzufüllen, bzw. abzuschneiden (s. Abb.4). Diese glatten Enden (blunt ends) wollte ich sowohl bei der aus dem Vektor herausgeschnittenen Catalase, als auch beim Promotorvektor erzeugen und dann beide Teile mit Hilfe eines weiteren Enzyms (T₄-Ligase) zusammenfügen. Diese Strategie brachte leider keinen Erfolg. Der Grund dafür liegt darin, dass man nicht sicher sein kann, dass die Polymerase 3'-Enden nicht über ein glattes Ende hinaus schneidet und so gar kein blunt end entsteht. Außerdem ist die Ligation glatter Enden möglicherweise schwieriger, als die Ligation überstehender Enden, da das Enzym dort nicht so gut angreifen kann. Kurzum: eine neue Strategie musste her!

PCR:

Ich überlegte, die Sequenzen für die Sse83871 und MluI Schnittstellen vorne bzw. hinten an die Catalasesequenz anzufügen. Die habe ich mit Hilfe der Polymerasekettenreaktion (PCR) getan. Mit Hilfe der PCR kann ein beliebiger DNA-Abschnitt selektiv und effizient vermehrt werden. Begrenzt wird der gewünschte Abschnitt durch Zusatz zweier kurzer (15–20 Basen) Oligonukleotide (Primer). Zunächst wird der Reaktionsansatz auf 94°C erhitzt, wobei sich die Doppel-

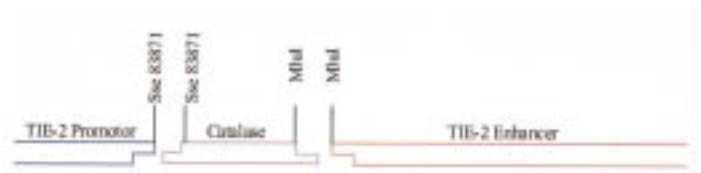


Abb. 3b: Schematische Darstellung des Konstruktes

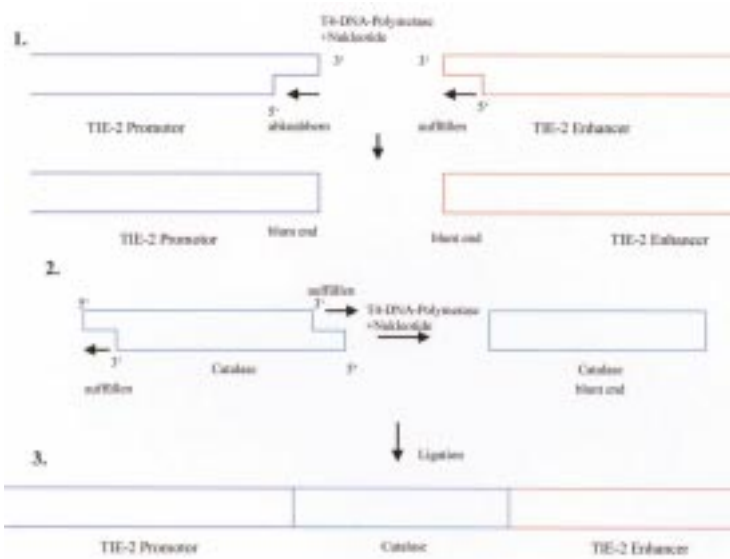
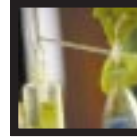


Abb. 4: Auffüllen bzw. Abschneiden der überstehenden Enden bis zum blutend und Ligation der glatten Enden

stränge der DNA voneinander trennen (Denaturierungsschritt). Dann kühlt man auf 55–60°C ab, wobei sich die Primer an die Matrize anlagern können. Eine zugesetzte Polymerase synthetisiert dann bei etwa 72°C neue Komplementärstränge (Syntheseschritt), die sich durch erneutes Erhitzen auf 94°C wieder voneinander trennen. Dieser Zyklus wird etwa 35-mal wiederholt, wodurch die Menge der synthetisierten Stränge exponentiell ansteigt, da jeder neugebildete Strang auch als Matrize dienen kann.

Bei meiner PCR benutzte ich als Matrize die cDNA der humanen Catalase. Um nun die Erkennungssequenzen für die Enzyme Sse83871 und MluI an die DNA anzufügen, benutzte ich Primer, die diese Sequenz an ihrem 5'- bzw. an ihrem 3'-Ende besitzen, (s. Abb. 5). Die durch die PCR neugebildeten DNA-Stränge enthalten

somit zusätzlich die Erkennungssequenzen der gewünschten Enzyme.

Überprüfung der Catalasesequenz
Das um die Schnittstellen erweiterte Catalasegen habe ich dann in einen Vektor kloniert, um mehr Material zu erhalten. Nun konnte ich einfach überprüfen, ob die neuen Schnittstellen wirklich angefügt wurden, indem ich die Catalase einfach mit diesen beiden Enzymen aus dem Vektor herausgeschnitten habe. Weitere Restriktionsanalysen brachten die richtigen Fragmente.

Bei einer PCR können Fehler auftreten, indem eine Base falsch durch die Polymerase eingebaut

wird. Solche Fehler können sich fatal auswirken, weil es dadurch zu Veränderungen der Aminosäuresequenz kommen kann, d.h., dass das Protein von Interesse hier die Catalase-möglicherweise seine katalytische Aktivität nur eingeschränkt, bzw. gar nicht entfalten kann.

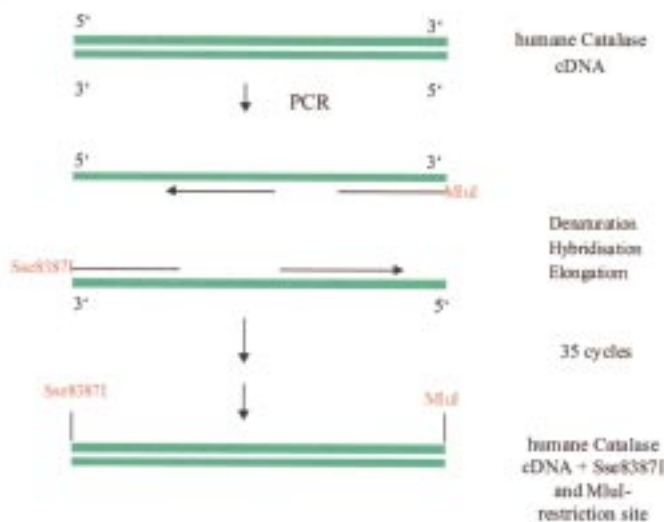
Um daher die gesamte Catalasesequenz zu überprüfen, haben wir die komplette Sequenz bestimmt. Bis auf eine Base waren alle 1700 Basen richtig. Dieser Fehler wirkt sich aber höchstwahrscheinlich nicht auf das aktive Zentrum des Enzyms aus, da es von diesem weit entfernt liegt.

Ligation der Catalase in den Promotorvektor

Da die Enden jetzt zusammenpassen, konnte ich die Einzelteile trotz der beachtlichen Größe des Promotorvektors (15 kb) ligieren. Der Ligationsansatz wurde, wie beschrieben, in kompetente Zellen transformiert und auf einer Agarplatte ausgestrichen. Endlich wuchsen Kolonien, die Ligation hatte geklappt. Auch dieses Plasmid habe ich in Bakterienzellen vermehrt und einer Restriktionsanalyse unterzogen (Abb. 6, S. 14). Da alles stimmte, konnte das Gen endlich in das Mausgenom eingebracht werden.

FORTSETZUNG AUF SEITE 14

Abb. 5: Schematische Darstellung der PCR, bei der die Restriktionschnittstellen Sse83871 und MluI an die Catalase cDNA angefügt wurden: Die DNA wird bei 94 °C denaturiert, wobei sich die beiden Stränge voneinander trennen. Bei einer Temperatur von 55°C lagern sich dann im Hybridisierungsschritt die Primer an und synthetisieren bei 72°C je einen neuen komplementären Strang.



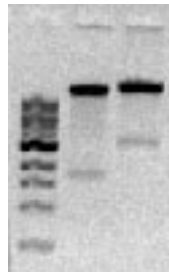
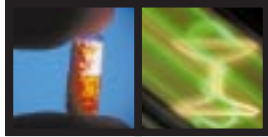


Abb. 6: Verdau des fertigen Plasmides. Die Catalase wurde mit Sse8387I/MluI aus dem Plasmid herausgeschnitten (Spur 1), wobei sich ein 1,6 kb Fragment ergibt. Auf Spur 2 sieht man den Verdau mit Sal I, wobei der Vektor vom Konstrukt getrennt wird.

>> FORTSETZUNG VON SEITE 13

Generierung der transgenen Tiere

Zur Generierung des transgenen Tieres muss die fremde genetische Information, in unserem Fall das Tie-2-Promotor-Catalase-Konstrukt, in das Genom des Tieres eingebracht werden. Dazu wurde der Vektor zunächst mit dem Enzym Sall abgetrennt, da keine Vektoranteile mitinjiziert werden dürfen und die DNA daraufhin hochgereinigt. Wir bedienen uns zum Einbringen der DNA der DNA-Mikroinjektionsmethode (Abb.7), die ich im Folgenden etwas näher beschreiben werde:

Weibliche Tiere werden zur Superovulation angeregt, indem man sie mit follikelstimulierendem Hormon behandelt. Sie erhalten Serum Gonadotropin einer schwangeren Stute und 48 Stunden später humanes Chorion- Gonadotropin. Anschließend werden sie verpaart. Die befruchteten Weibchen werden am folgenden Tag getötet und die Eier aus den Eierstöcken entnommen und in einem Medium bei 37°C inkubiert.

In diese Eier, und zwar in die männlichen Vorkerne, wird dann die DNA eingebracht. Da man dabei zwei Membranen durchstoßen muss, kann man sich vorstellen, wie genau und vorsichtig man dabei arbeiten muss. Die Eier werden fixiert, indem man sie mit einer Haltepipette ansaugt. Mit einer Injektionspipette, deren Nadel einen Durchmesser von 1µm hat, injiziert man dann eine sehr geringe Menge DNA in die männlichen Vorkerne, bis diese anschwellen.

Das Ei wird dann bis zum Zweizellstadium weiterinkubiert. So kann man sichergehen, dass das Ei nach der Mikroinjektion seine Teilungsfähigkeit behalten hat. Ist das Ei noch intakt, wird es in den Eierstock eines scheinchwangeren Weibchens transplantiert, das das Tier dann austrägt und aufzieht. Scheinschwangere Tiere erhält man durch Paarung der Weibchen mit Männchen, deren Samenleiter durchtrennt wurden. Die Weibchen besitzen durch diese Verpaarung den gleichen Hormonhaushalt, wie nach Verpaarung mit einem sexuell intakten Männchen. 3 Wochen später erfolgt die Geburt der Jungtiere.

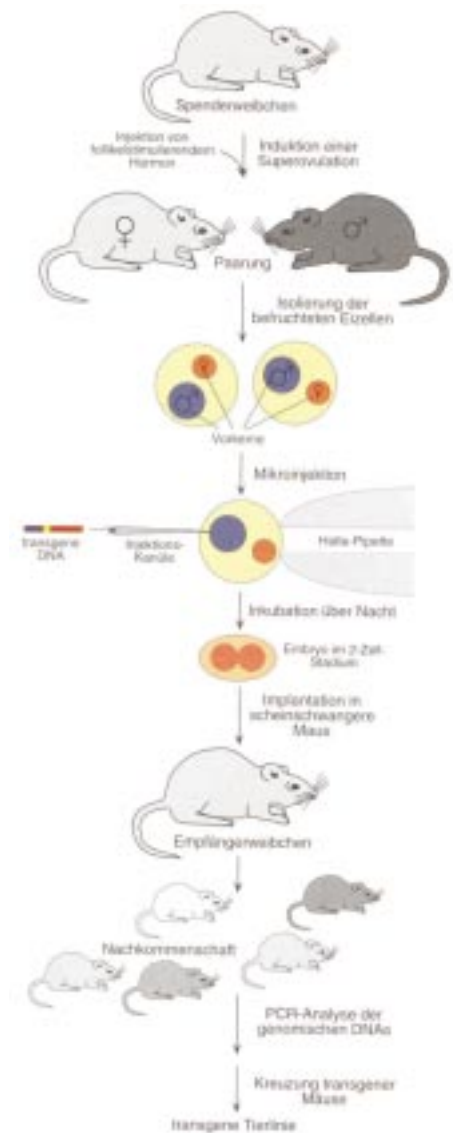


Abb. 7: Mikroinjektion transgener DNA in den männlichen Vorkern befruchteter Eizellen (mit freundlicher Genehmigung aus: Dingermann: Gentechnik Biotechnik, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart, 1999)

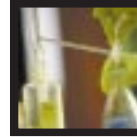


Abb. 8: Foundertier mit acht Jungtieren

Genotypisierung

Hat man nun die Tiere, muss man überprüfen, bei welchen von Ihnen das Transgen in das Genom integriert wurde. Äußerlich ist es Ihnen nämlich nicht anzusehen (Abb. 8).

Dies überprüft man mithilfe einer PCR, die spezifisch für das eingebrachte Transgen ist. Die dafür benötigte genomische DNA wird aus den Schwanzspitzen der Tiere präpariert. Ist das Transgen in das Genom integriert, erhalte ich ein Fragment, das 470 Basenpaare lang ist und auf einem Agarosegel detektiert werden kann (Abb. 9).

Wie auf den Bildern zu erkennen ist, sind 11 der 44 Tiere transgen positiv. Diese Tiere werden zur Zeit weiterverpaart und es wird überprüft, ob das Transgen auch auf weitere Generationen übertragen wird, also in den Keimzellen vorhanden ist.

Ausblicke

Mit den aus der nun laufenden Zucht stammenden transgenen Tieren werden wir eine Reihe Studien durchführen, um die Frage nach der Beteiligung von H_2O_2 an der trainingsinduzierten Hochregulation der eNOS beantworten zu können. Die Ergebnisse sollten dazu beitragen, die vaskulären molekularen Mechanismen der positiven Effekte von körperlichem Training besser zu verstehen.

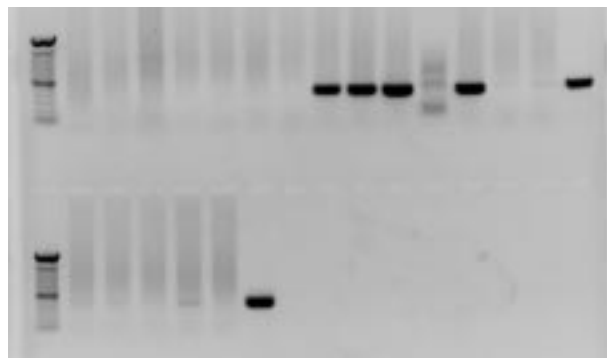


Abb. 9: Zwei Agarosegele mit den Ergebnissen der Genotypisierungs-PCR der 44 Foundertiere: 11 Tiere enthalten in ihrem Genom das Transgen.

Über die Autorin

Frau Nadine Lauer, Apothekerin, Studierte von 1993 –1997 Pharmazie an der Heinrich-Heine-Universität in Düsseldorf und erhielt 1998 ihre Approbation als Apothekerin. Seit Januar 1999 ist Frau Lauer als Doktorandin am Institut für Pharmakologie und Klinische Pharmakologie der Heinrich-Heine Universität in Düsseldorf tätig und wird ihre Dissertation Mitte nächsten Jahres abgeschlossen haben.

Kontaktadresse:
Nadine Lauer
Institut für Pharmakologie u. Klinische Pharmakologie,
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf,
Moorenstrasse 5,
40225 Düsseldorf
lauern@uni-duesseldorf.de

