

2. Abgeschlossenes Teilprojekt A12

Zwischenbericht

Thema des Projekts: **Etablierung embryonaler Stammzelllinien (ES-Linien) aus NOD (non-obese diabetic)-Mäusen zum Zwecke des „gene targetings“ im NOD Genom**

Projektleiter: Prof. Dr. Hans Jörg Fehling
Abteilung Immunologie, Universitätsklinikum Ulm

Der Abschlußbericht wird zum 30.06.2005 vorgelegt.

Für das beschriebene Teilprojekt wird zunächst keine Weiterfinanzierung beantragt, jedoch sollen die Arbeiten bis zu maximal 12 Monate über den Termin der Begutachtung hinaus weitergeführt werden. Ein ausführlicher Abschlußbericht wird spätestens zum 30.06.2005 vorgelegt.

Um den Einfluß einzelner Gene auf Entstehung und Verlauf des autoimmunen Diabetes in der NOD Maus, einem der wichtigsten Tiermodelle der Diabetesforschung, zu bestimmen, wird angestrebt, Kandidatengene im NOD Genom mittels „gene targeting“ gezielt zu verändern. Voraussetzung für die Erzeugung genetisch veränderter NOD Mäuse mittels „gene targeting“ ist jedoch die Verfügbarkeit geeigneter embryonaler Stammzellen. Trotz des offensichtlich enormen Potentials von NOD ES Zellen zur Identifizierung und Charakterisierung Diabetes-auslösender Gene, gab es bis zum Zeitpunkt der letzten Antragstellung nur eine einzige Publikation¹⁾, in der eine möglicherweise keimbahnfähige NOD ES Zelllinie beschrieben wurde, wobei deren Tauglichkeit für „gene targeting“ Experimente nicht nachgewiesen wurde. Erfahrungen verschiedener Arbeitsgruppen, darunter auch unserer eigenen, hatten gezeigt, daß die Etablierung von NOD ES Zelllinien offensichtlich äußerst schwierig, mit herkömmlichen Methoden vielleicht sogar unmöglich sein würde. Ursache dafür ist vermutlich die Neigung von Zellaggregaten der inneren Blastozysten Zellmasse, aus denen üblicherweise ES Zellen gewonnen werden, auszudifferenzieren und noch verbliebene pluripotente ES Zellen zu überwachsen. Diese Tendenz scheint bei Mäusen des Stammes NOD besonders ausgeprägt zu sein. In dem geförderten Projekt wurde vorgeschlagen, ein publiziertes transgenes Selektionssystem, das bereits zur Gewinnung von ES Zelllinien aus einem anderen wenig-permissiven Mausstamm (CBA) erfolgreich eingesetzt worden war²⁾,

hinsichtlich seiner Brauchbarkeit zur Etablierung von ES Zelllinien aus NOD Mäusen zu testen. Im Erfolgsfall sollten die neu etablierten ES Zellen dazu genutzt werden, die Beteiligung einzelner Kandidatengene an der Diabetesentstehung mittels einfacher „knock-outs“ zu untersuchen. Später sollten dann auch komplexere „gene targeting“ Experimente („knock-ins“, β -zellspezifische „knock-outs“ usw.) in Angriff genommen werden. Seit Beginn der Förderung wurden folgende Zwischenergebnisse erzielt:

1. Etablierung von NOD ES Zellen mit Hilfe eines transgenen Selektionssystems

Zur Etablierung von NOD ES Zellen sind in Vorarbeiten acht unabhängige transgene NOD Mauslinien erzeugt worden, die ein Neomycinresistenzgen unter der Kontrolle regulatorischer Sequenzen des Oct3 Transkriptionsfaktorgens tragen. Da das Oct3 Gen in undifferenzierten Zellen gut exprimiert, bei der Differenzierung dieser Zellen jedoch abgeschaltet wird, sollte mit diesem experimentellen Ansatz ein Überwachsen totipotenter ES Zellen effektiv verhindert werden, indem Zellen der „inneren Zellmasse“ aus Blastozysten unter G418 Selektion kultiviert werden. Hauptproblem zu Beginn der Förderperiode waren zu geringe Haltungskapazitäten im Tierstall verbunden mit Parasiteninfektionen meiner aus Basel importierten transgenen Mäuse. Um eine einigermaßen akzeptable Lösung dieses Problems zu finden, bedurfte es zahlreicher organisatorischer Maßnahmen, die sich bis April 2002 hinzogen (u.a. Bereitstellung eines kleinen separaten, leicht zugänglichen Raums, Ausstattung mit IVCs und Umsetzstation, Einstellung einer eigenen Teilzeit-Tierpflegerin). Weitere Verzögerungen bei der Realisierung des Projekts traten dadurch ein, daß die betreuende Wissenschaftlerin, eine im Umgang mit Mausembryonen sehr erfahrene Australierin, wegen einer schweren Erkrankung einer nahen Angehörigen nach nur 9 Monaten die Arbeit am Projekt aufgab, um in ihr Heimatland zurückzukehren. Eine neue, zunächst weniger erfahrene Mitarbeiterin konnte erst einige Monate später gewonnen und eingearbeitet werden. Trotz dieser Verzögerungen sind die bislang durchgeführten Versuche ermutigend. Mindestens zwei der unabhängigen transgenen Linien scheinen das Transgen tatsächlich in der gewünschten Weise zu exprimieren. Selektion entnommener Blastozysten in G418-haltigem Medium führt in der Tat zur Eliminierung ausdifferenzierter Zellen. Unter einer Schicht abgestorbener Zellen werden Kolonien mit ES Zellmorphologie sichtbar, die die Selektion offensichtlich unbeschadet überleben. Ein solches Stadium konnten wir mit nicht-transgenen NOD-Kontrollblastozysten ohne Selektion nie erreichen. In den kommenden Monaten wird

es darauf ankommen, Zellkulturbedingungen zu finden, die eine reproduzierbare Expansion der überlebenden Zellen ermöglichen.

2. Charakterisierung einer publizierten NOD ES Linie hinsichtlich „gene targeting“ Effizienz

Parallel zu unseren Bemühungen, eigene NOD ES Zelllinien zu etablieren, gelang es uns dank der Vermittlung von Prof. Bernhard O. Böhm, einem Mitglied des SFBs, einige Aliquots der bislang einzigen publizierten NOD ES Linie¹⁾ von Prof. Seiho Nagafuchi, Fukuoka, Japan, im Rahmen einer Kollaboration zu erhalten. Um zu testen, ob sich diese ES Zellen für „gene targeting“ Experimente eignen, wurde aus deren genomischer DNA ein klassischer „knock-out“ Vektor konstruiert. Ziel der Versuche war die Inaktivierung des MHC Klasse I K^d Gens, das von uns als ein erstes Kandidatengens ausgewählt wurde, da neuere Untersuchungen darauf hindeuten, daß dieses MHC Molekül für die Präsentation des potentiellen Autoantigens Insulin essentiell sein könnte. Darüber hinaus lassen sich K^d-defiziente NOD Mäuse nicht durch Rückkreuzungen anderer MHC-K-defizienter Mausstämmen erzeugen, da der NOD MHC für die Diabetes-Suszeptibilität unverzichtbar ist. In mehreren „gene targeting“ Experimenten haben wir mittlerweile weit über 1000 ES Kolonien analysiert ohne einen einzigen knock-out Klon identifizieren zu können. Um „targeting“ Frequenzen zwischen der NOD ES Linie und anderen gebräuchlichen ES Linien direkt vergleichen zu können, haben wir einen weiteren „tageting“ Vektor konstruiert, der in der Literatur zur Einführung von „Markergenen“ in den ROSA-26 Genlocus als sehr effizient beschrieben worden ist. Dieser Vektor ergab in unserem Labor in drei etablierten nicht-NOD ES Linien (E14.1; AB2.2; BRUCE4) ausgezeichnete „targeting“ Frequenzen zwischen 1/3 und 1/40. In der vorliegenden NOD ES Linie konnten jedoch selbst nach Analyse von über 1500 Einzelkolonien keine homolog rekombinierten Klone identifiziert werden. Zusammen genommen deuten diese Ergebnisse darauf hin, daß der vorliegenden NOD ES Linie entweder die Fähigkeit zur homologen Rekombination ganz fehlt, oder aber daß es sich bei diesen ES Zellen um eine recht heterogene Linie handelt, in der nur eine kleine Subpopulation zur homologen Rekombination fähig ist. An der Klärung dieser wichtigen Frage arbeiten wir.

3. Charakterisierung der publizierten NOD ES Linie hinsichtlich Keimbahnfähigkeit

Die publizierten Daten zur vorliegenden NOD ES Linie ließen vermuten, daß nur ein Bruchteil der Zellen zur Keimbahntransmission befähigt sein würde¹⁾. Durch Subklonierung der primären ES Linie haben wir versucht einen Klon mit hoher Keimbahnfähigkeit zu

identifizieren. Dazu wurde ein von uns erstelltes transgenes Konstrukt bestehend aus (I) dem Ratten-Insulin Promotor, (II) einer Cre-Rekombinase kodierenden cDNA und (III) einer Neomycinresistenz-vermittelnden Expressionskassette in NOD ES Zellen elektroporiert. Zehn Neo-resistente ES Klone wurden willkürlich isoliert und auf ihre Keimbahnfähigkeit getestet. Um die Wahrscheinlichkeit der Keimbahntransmission zu erhöhen, wurden die ES Zellen nicht in Blastozysten gewöhnlicher Mäusestämme injiziert, sondern in Blastozysten aus heterozygoten c-kit-defizienten Mäusen (W/+ Mäuse). Homozygot c-kit defiziente Mäuse sterben bereits in der ersten Lebenswoche aufgrund defekter Erythropoese. Darüberhinaus ist in diesen Mausmutanten die Entwicklung eigener Ei- und Samenzellen blockiert. Homozygot c-kit defiziente Blastozysten (statistisch jede 4. Blastozyste aus heterozygoten Eltern) sollten daher „leere Entwicklungsnischen“ für die Reifung von ES Zellen in Keimzellen bieten. Tatsächlich ist es uns gelungen durch Injektion von NOD ES Zellen in c-kit defiziente Blastozysten lebensfähige chimäre Nachkommen zu erzeugen. Diese Ergebnisse zeigen, daß die injizierten NOD ES Zellen zumindest die Hämatopoese ausreichend rekonstituieren können. Ob auch die Fertilität in NOD-W/W chimären Tieren wiederhergestellt ist, werden die kommenden Wochen und Monate zeigen. Da statistisch nur etwa 1/4 der aus heterozygoten c-kit-defizienten Mäusen gewonnenen Blastozysten für die Keimbahnkomplementation relevant sind, erfordert die Erzeugung von NOD-W/W Chimären einen besonders hohen Injektionsaufwand und läßt sich auch aufgrund begrenzter Haltungskapazitäten für die Blastozystenspender nur zeitlich gestreckt durchführen.

Perspektiven

Nachdem nun unter beträchtlichen Anstrengungen eine tragbare Infrastruktur im Tierstall aufgebaut wurde, um regelmäßig und verlässlich eine Mindestzahl an transgenen Blastozysten gewinnen zu können, möchten wir unsere Versuche zur Etablierung eigener NOD ES Zellen gerne über den Förderzeitraum hinaus fortsetzen. Parallel dazu möchten wir weiterhin versuchen, aus der existierenden NOD ES Linie von Prof. Nagafuchi Subklone zu isolieren, die zur Keimbahntransmission fähig sind und in denen homologe Rekombinationsereignisse mit einer Frequenz stattfinden, die „gene targeting“ Experimente zulassen. Eine Fortsetzung dieser Arbeiten erscheint uns auch deshalb sinnvoll, weil das Interesse an einer brauchbaren NOD ES Linie zum Studium der Genetik des autoimmunen Diabetes in den letzten Jahren noch weiter zugenommen hat und bis zum heutigen Tag keine neue, reine NOD ES Linie beschrieben worden ist. Dennoch möchte ich zunächst auf einen Weiterförderungsantrag

verzichten, zum einen, weil es uns nach nun fast 2.5 Jahren Förderung noch nicht gelungen ist, Ergebnisse zu erzielen, die einen Erfolg des Projektes als sicher erscheinen lassen, und zum anderen, weil die mit dem Projekt betraute und gut eingearbeitete Wissenschaftlerin, Dr. Babita Madan, aufgrund bevorstehender Mutterschaft voraussichtlich ab Februar 2004 vorübergehend nicht mehr zur Verfügung stehen wird, so daß die Arbeit am NOD Projekt wiederum für einige Monate eingestellt werden muß. Sollte es uns innerhalb der 12 Monate nach Ablauf der jetzigen Förderphase gelingen, brauchbare NOD ES Zellen zu gewinnen, würde ich gerne einen Neuantrag/Einzelantrag stellen, um bei positiver Begutachtung wenn möglich um Wiederaufnahme in den SFB 518 zu bitten.

Zitierte Literatur

- Nagafuchi S, et al. Establishment of an embryonic stem (ES) cell line derived from a non-obese diabetic (NOD) mouse: in vivo differentiation into lymphocytes and potential for germline transmission. FEBS letters 1999; 455: 101-104
- McWhir J, et al. Selective ablation of differentiated cells permits isolation of embryonic stem cell lines from murine embryos with a non-permissive genetic background. Nat Genetics 1996; 14: 223-226