

TZ04-060/K

Vortragstagung der DGfZ und GfT am 29./30. September 2004 in Rostock

Erstellung α 1,3-Galaktosyltransferase defizienter Schweine durch somatischen Kerntransfer und homologe Rekombination



Björn Petersen, Michael Hölker, Wilfried Kues,
Andrea Lucas-Hahn, Erika Lemme, Petra Hassel, Monica Winkler[†], Uli Martin[†]
und Heiner Niemann

Institut für Tierzucht der Bundesforschungsanstalt für Landwirtschaft (FAL) Braunschweig,
FB Biotechnologie, Höltystraße 10, 31535 Neustadt a.Rbge./Mariensee

[†] LBAO der Medizinische Hochschule Hannover, Podbielskistraße 380, 30659 Hannover

Einleitung:

Der Erfolg der Allotransplantation führt zu einer steigenden Diskrepanz zwischen verfügbaren Organen und Patienten auf den Wartelisten. Das Schwein wird aus verschiedenen Gründen als der am besten geeignete Organspender für den Menschen angesehen. Die immunologische Abstoßung stellt die größte Hürde für den Einsatz porziner Organe in der Xenotransplantation dar. In der hyperakuten (HAR) und der nachgeschalteten akuten vaskulären Abstoßungsreaktion (AVR) stellen die α 1,3-Gal-Epitope das Hauptantigen dar (GALILI et al., 1985). Die Erzeugung α 1,3-Gal defizienter Schweine ist der sicherste Weg die Expression dieser Epitope dauerhaft zu unterbinden. Der somatische Kerntransfer bietet die Möglichkeit, Gene gezielt durch homologe Rekombination auszuschalten (DENNING et al., 2001). Ein limitierender Faktor in der Erstellung von Knockout-Tieren durch somatischen Kerntransfer ist die geringe Effizienz der Methode und die begrenzte Lebensfähigkeit somatischer Zellen unter in-vitro Kulturbedingungen (HAYFLICK, 1961; DENNING et al., 2001). Ziel dieser Arbeit war die Erstellung α 1,3-Galaktosyltransferase defizienter Schweine durch somatischen Kerntransfer und homologe Rekombination. Hierfür sollte ein Zellkultursystem entwickelt werden, das ein ausreichendes Überleben somatischer Zellen unter in-vitro Bedingungen für die homologe Rekombination und anschließendem Einsatz der Zellen im somatischen Kerntransfer ermöglicht.

Material und Methoden:

Erstellung von Wachstumskurven:

Für die Untersuchung des Wachstumsverhaltens und der Lebensspanne der Zellen in den verschiedenen Zellkulturmedien wurden Wachstumsküven erstellt. Hierzu wurden die Zellen in D10- (DMEM+10% FCS) bzw. T3-Medium (DMEM+30%FCS) auf einer 6-well Zellkulturplatte kultiviert. Bei Erreichen einer Konfluenz von 70-80% wurden die Zellen mit einer Zählkammer gezählt und in einer Dichte von $0,5 \times 10^5$ Zellen pro Vertiefung einer six-well Platte ausgesät. Die Populationsverdopplungen wurden anhand der Formel :

$$PV = \log(A/B) / \log 2$$

ermittelt. Wobei A die Gesamtzahl gezählter Zellen und B die Anzahl ausgesäter Zellen darstellt.

Transfektion porziner foetaler Fibroblasten mit einem $\alpha 1,3$ -Gal Knockoutvektor:

Foetale Fibroblasten der Passage 2 und 3 wurden mit einem Knockoutvektor für die $\alpha 1,3$ -Galaktosyltransferase (PMW8-Neo) transfiziert. Der Vektor weist am 5' Ende einen 6,5kb homologen Arm zu Intron 4 und am 3' Ende einen 1,5kb langen homologen Bereich zu Exon 9 der porzinen Galaktosyltransferase auf.

Bei Erreichen einer Konfluenz der Zellen von 70-80% in einer T75-Zellkulturflasche (3×10^6 Zellen) wurden diese trypsinisiert und nach Zugabe von 10 μ g Vektor-DNA mittels Elektroporation transfiziert. Anschließend wurden die Zellen in einer Dichte von ca. 8000 Zellen pro Vertiefung einer 96-well ausgesät und in T3- Medium kultiviert. 48h nach Transfektion wurden die Zellen für 14 Tage in Selektionsmedium bestehend aus T3-Medium supplementiert mit 800 μ g/ml G418 überführt.

Charakterisierung G418-resistenter Zellklone:

Resistente Zellklone wurden mittels PCR auf Integration der Neomycinresistenz-Kassette untersucht. Neo-positive Klone wurden einer LR-PCR unterzogen, wobei ein Primer außerhalb des homologen Bereiches und einer innerhalb des Konstruktes lag, damit sollte die korrekte Integration des Konstruktes am 5' Ende des Gal-Locus gezeigt werden. Erhaltene Banden in der LR-PCR (9kb) wurden aus dem Gel eluiert und dienten als Template für weitere Nested-PCRs, um die Spezifität der erhaltenen Bande zu überprüfen.

Kerntransfer:

Als Ausgangsmaterial dienten aus Schlachthofovarien gewonnene Kumulus-Oozyten-Komplexe nach 40- stündiger Reifung in NCSU37-Medium. Die Spenderzellen wurden durch Serumentzug (0,5%FCS) für 48 Stunden in der G0/G1 Phase des Zellzyklus synchronisiert. Nach Entkumulierung und E nukleation der Eizellen unter UV-Licht Kontrolle, wurde jeweils ein Fibroblast eines charakterisierten Zellklons in den perivitellinen Raum eingebracht und mit der Eizelle fusioniert. Die rekonstruierten Komplexe wurden elektrisch und chemisch

T207-060

B6

(DMAP) aktiviert. Zur Erstellung von Nachkommen durch somatischen Kerntransfer wurden durchschnittlich 98 Komplexe chirurgisch auf 2 synchronisierte Empfängertiere übertragen.

Ergebnisse:

T3-Medium mit einem 30%igem Serumanteil führte zu einer signifikant erhöhten Proliferation und Lebensspanne aller untersuchten Zelllinien (adulte bzw. foetale Fibroblasten) gegenüber einer Kultur in Standardkulturmedium (D10, ANOVA, tukey-test $a < b$ 0,001, s. Abb. 1). In T3-Medium wurden bei foetalen Fibroblasten über 80 Populationsverdopplungen erreicht, während in D10-Medium lediglich 54 Populationsverdopplungen und Erscheinungen von Seneszenz beobachtet wurden. Eine FACS-Analyse kultivierter Zellen nach 20 Passagen (~50 Populationsverdopplungen) in T3-Medium, ergab keine Hinweise auf einen veränderten Karyotyp (nicht gezeigt).

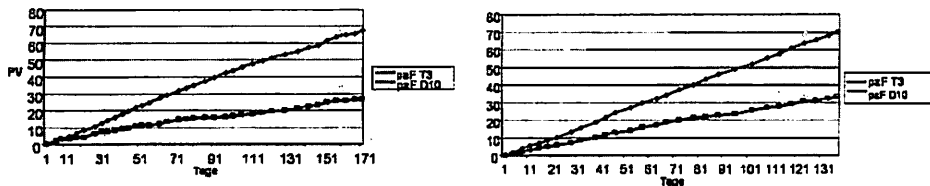


Abbildung 1: Wachstumskurven der untersuchten Zelllinien (links adulte, rechts foetale Fibroblasten)

Aus den Transfektionsexperimenten mit einem Knockoutvektor für die $\alpha 1,3$ -Galaktosyltransferase konnten aus insgesamt 6 Transfektionen, 9 Klone gewonnen werden, welche eine 9kb Bande in der LR-PCR aufwiesen (Tab. 1). Die Spezifität dieser Bande konnte durch zwei Nested-PCRs mit 2 unterschiedlichen Primerkombinationen nachgewiesen werden. Zudem konnten bei den charakterisierten Zellklonen keine Vektorsequenzen in der PCR amplifiziert werden. Eine LR-PCR über das 3' Ende brachte kein eindeutiges Ergebnis.

Transfektionsversuche mit PMWS-Neo										
Elektroporationsparameter	Gesamtzahl eingesetzt Zellen n	G418-resistente Kolonien	Seneszenz	Nachweis von					LR-PCR positiv	
				5' Ende Vektorsequenzen	3' Ende VS	5' * 3' Ende VS	keine VS	Neo-positiv		
450V/ 350 μ F	2	6x10 ⁶	169 32,70%	52 18,70%	20 44 28	44 41,10%	28 28,20%	16 14,00%	14 13,10%	5 4,70%
240V/ 500 μ F	4	1,2x10 ⁷	269 42,00%	113 42,00%	66 42,30%	33 21,20%	36 23,10%	21 13,50%	15 9,60%	4 2,60%
Gesamt	6	1,8x10⁷	428 18,62%	165 38,62%	68 32,70%	77 29,20%	64 24,30%	36 13,70%	28 81%*	9 3,40%

* Alle prozentualen Angaben sind auf die Gesamtzahl erhaltener G418-resistenter Klone berechnet
 ° bezogen auf Vektorsequenzen-freie Klone (29/36)

Tabelle 1: Ergebnisse der Transfektionsexperimente

Einer dieser Zellklone wurde im somatischen Kerntransfer eingesetzt. Insgesamt wurden 274 Kerntransferkomplexe erstellt, von denen 227 fusionierten. 196 Embryonen konnten auf 2 Empfängertiere chirurgisch übertragen werden. Nach Ultraschalluntersuchung an Tag 26 und 33 konnte bei einem Tier eine Trächtigkeit diagnostiziert werden, welches an Tag 115 zur Abferkelung von 5 männlichen Ferkeln kam. 2 Ferkel wurden tot geboren, 1 mußte nach 24 Stunden euthanasiert werden. 2 Ferkel waren äußerlich gesund, wovon eines nach drei Wochen aus unbekannter Genese verstarb. Das verbleibende Tier entwickelte sich normal (Abb.2), ist jetzt 9 Monate alt und wurde bereits im Deckakt eingesetzt.

Durch Untersuchung von Gewebeproben der Klonferkel, konnte in allen Proben durch LR-PCR eine korrekte Integration des Vektors am 5'Ende des Gal-Locus gezeigt werden. Ein Nachweis der korrekten Integration des Knockoutvektors in den α -Gal-Locus mittels Southern Blot konnte bisher nicht erzielt werden. Trotz des Fehlens dieses Nachweis kann aus den Ergebnissen der PCR-Untersuchungen zumindest von einer korrekten Integration des Knockoutvektors am 5'Ende des Gal-Locus ausgegangen werden. Durch die Integration von 3 Stopcodons innerhalb des Knockoutvektors, ist zu erwarten, dass ein funktioneller Knockout erreicht werden konnte. Zellen dieses Tieres werden zur Zeit für eine zweite Transfektion zur Generierung von null-Gal-Zellen eingesetzt.



Abbildung 2: Gal-Ko Ferkel

Literatur

DENNING, C., P. DICKINSON, S. BURL, D. WYLIE, J. FLETCHER u. A. J. CLARK (2001): Gene targeting in primary fetal fibroblasts from sheep and pig. *Cloning Stem Cells* 3, 221-231

GALILI, U., B. MACHER, J. BUEHLER u. S. SHOHET (1985): Human natural anti-alpha-galactosyl IgG. II. The specific recognition of alpha (1----3)-linked galactose residues. *J Exp Med.* 162, 573 -582

HAYFLICK L, M. PS. (1961): The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp Cell Res.* 25, 585-621

**Vortragstagung
der
Deutschen Gesellschaft für Züchtungskunde e.V.
und der
Gesellschaft für Tierzuchtwissenschaft**

29. und 30. September 2004 in Rostock

**AUS DER ARBEIT DER FORSCHUNGSSTÄTTEN
FÜR TIERPRODUKTION**

KURZFASSUNGEN



Veranstaltungsort: Universität Rostock, Hörsaalgebäude Biowissenschaften,
Albert-Einstein-Str. 3, 18059 Rostock-Stadt

Lokale Veranstalter: Forschungsinstitut für die Biologie
landwirtschaftliche Nutztiere
Wilhelm Stahl Allee 2
18196 Dummerstorf

Universität Rostock
Agrar & Umweltwissenschaftliche
Fakultät
Justus-von-Liebig-Weg 6
18051 Rostock