

Von der Basensequenz zur molekularen Medizin: **DAS DEUTSCHE HUMANGENOMPROJEKT (DHGP)**

» Im Mai 2000 standen die Wissenschaftler des Deutschen Humangenomprojekts (DHGP) auf dem Gipfel der öffentlichen Wahrnehmung: In Zusammenarbeit mit Kollegen aus Japan, Großbritannien und Frankreich hatten sie Chromosom 21 sequenziert. Nach Chromosom 22 im Dezember 1999 war Erbmolekül Nummer 21 damit das zweite Chromosom überhaupt, dessen Basenfolge komplett bekannt war. Und worauf die beteiligten Wissenschaftler noch heute mit Stolz verweisen: Chromosom 21 wurde mit einer Abdeckung von 99,7 Prozent besonders gründlich sequenziert. Solch ein Erfolg war wenige Jahre zuvor nicht unbedingt zu erwarten gewesen. Denn Deutschland war erst im Juni 1995 mit einem nationalen Forschungsprogramm in das weltweite Humangenomprojekt eingestiegen.

Auf dem rund 33,5 Millionen Basenpaare langen DNA-Faden von Chromosom 21 fanden die Wissenschaftler insgesamt 225 Gene, darunter auch solche, die bei der Entstehung von Alzheimer, Epilepsie, Autoimmunerkrankungen und Blutkrebs eine Rolle spielen. Bekannt ist das zweitkleinste Chromosom des Menschen aber für eine andere Krankheit: Liegen im Genom eines Menschen drei statt normalerweise zwei Kopien von Chromosom 21 vor – man spricht dann von Trisomie 21 – bildet sich das Down-Syndrom aus.

Fra GEN an: Dr. Marie-Laure Yaspo vom Max-Planck-Institut für Molekulare Genetik in Berlin. Sie koordinierte die internationale Gemeinschaftsaufgabe der Sequenzierung von Chromosom 21.



Marie-Laure Yaspo

Frau Dr. Yaspo, wie haben Sie dafür gesorgt, dass alle an diesem Projekt beteiligten Forscher möglichst reibungslos zusammenarbeiten?

Die Zusammenarbeit mit zwei Arbeitsgruppen in Japan zu koordinieren war nicht immer einfach. Was oft vergessen wird: Vor der eigentlichen Sequenzierung mussten wir ja schnell eine Karte der zu sequenzierenden Klone erstellen. Wir haben uns fast jeden Tag E-Mails geschrieben oder miteinander telefoniert. Darüber hinaus haben wir uns auch regelmäßig getroffen – entweder hier oder in Japan. Zu den Besprechungen brachten dann alle ihre unfertigen Karten mit. Wir haben diskutiert: Wieso hat die Karte hier und dort noch eine Lücke? Wie können wir das lösen? Alle im Projekt waren sehr engagiert. Und am Ende hat es ja auch gut geklappt. Man ist aber immer unter Druck, so ist das in solchen Projekten. Als Wissenschaftler existiert man damit.

Können Patienten mit Down-Syndrom heute schon von den Arbeiten des DHGP profitieren?

Es ist noch zu früh, zu prognostizieren, wann und in welcher Form unsere Arbeit im DHGP den Betroffenen zugute kommt. Die molekularen Mechanismen dieser Krankheit sind sehr schwer zu beurteilen. Die Sequenzierung von Chromosom 21 hat uns aber alle Werkzeuge an die Hand gegeben, um über das Down-Syndrom richtig forschen zu können. Wir müssen jetzt verstehen, wie die Gene zusammenarbeiten und was es für die Zelle für Konsequenzen hat, wenn drei statt zwei Kopien des gleichen Chromosoms vorliegen. Es ist sehr wahrscheinlich, dass nicht alle Gene auf dem Chromosom für die Krankheit verantwortlich sind. Klar ist aber auch: Wenn jemand mit drei Chromosomen 21 geboren wird, kann man das überschüssige nicht einfach entfernen.

Neben der Arbeit an Chromosom 21 konzentrierten sich die Wissenschaftler in den drei deutschen Sequenzierzentren in Berlin, Jena und Braunschweig vor allem auf die Basenfolgen der Chromosomen 7, 8 und 11 sowie auf das X-Chromosom. Um jeweils Genkarten dieser Chromosomen erstellen zu können, zerlegten die Wissenschaftler die viele Millionen Basen langen DNA-Strecken der Chromosomen in handlichere Fragmente. Anschließend vermehrten sie diese DNA-Bruchstücke in Wirtszellen, beispielsweise Bakterien oder Hefezellen. Als Transportvehikel (Vektoren) zum Einschleusen der DNA in die Wirtszelle nutzten sie Plasmide, Phagen und künstliche Chromosomen. Wenn sich die Wirtszellen auf entsprechendem Nährboden vermehren, vervielfältigen sie auch das jeweils in ihnen enthaltene DNA-Fragment. Die Nachkommenschaft einer jeden Wirtszelle wird als Klon bezeichnet. Jeder Klon besteht also aus einer Population von Zellen, die alle neben der eigenen Erbinformation einen genau definierten Abschnitt der menschlichen DNA enthalten. Eine sehr umfangreiche Sammlung solcher Klone war der zentrale Baustein des Deutschen Ressourcenzentrums für Genomforschung (RZPD). Dieses Servicezentrum versorgte alle Wissenschaftler mit den gleichen Klonen um besser vergleichbare Ergebnisse zu erhalten.



Yak oder Yac?

Foto: picture-alliance/OKAPIA KG, Germany

GENial: Ein YAC ist kein zotteliges Lasttier aus dem tibetanischen Hochland, obwohl es im übertragenen Sinne auch viel aufnehmen kann. Hinter dem Kürzel verbirgt sich ein **Yeast Artificial Chromosome**, ein künstliches Chromosom der Hefe. Wie echte Chromosomen werden die Kunstchromosomen bei der Zellteilung auf die Tochterzellen verteilt. Ihr Vorteil: Mit ihnen lassen sich in Genbanken sehr viel längere DNA-Abschnitte klonieren als mit herkömmlichen Plasmiden und den ähnlichen Cosmiden und Fosmiden. Während ein Plasmid ein Insert (eingefügte Fremd-DNA), von bis zu 20 Kilobasen (kb) fassen kann, „schultert“ ein YAC mehr als das Zehnfache. Zum Kader der Kunstchromosomen gehören heute neben YACs auch BACs (Bacterial Artificial Chromosomes), PACs (künstliche Chromosomen auf Basis des Phagen P1), künstliche Säugetierchromosomen (Mammalian Artificial Chromosomes, MACs) und HACs (Human Artificial Chromosomes). Die DHGP-Forscher, die Chromosom 21 sequenzierten, nutzten die gesamte Palette der zur Verfügung stehenden DNA-Container: Sie verteilten die 33 Millionen Basenpaare des Chromosoms auf 192 BACs, 111 PACs, 101 P1-Phagen, 81 Cosmide und 33 Fosmide. Um das komplette Humangenom auf Plasmide zu verteilen, wären rund 150.000 Klone notwendig, bei YACs genügten etwa 10.000.

Andere Arbeitsgruppen des DHGP betrieben wichtige Grundlagenforschung. So war es von Beginn an ein Ziel des DHGP, schnellere und automatisierbare Sequenzierverfahren – sogenannte Hochdurchsatztechnologien – zu entwickeln, um das weltweite Projekt zu beschleunigen. Gleichzeitig entwarfen die Bioinformatiker des Projekts bessere Methoden zur Verarbeitung und Sicherung der anfallenden Datenmengen.

Zudem wurden im DHGP die Genome von Maus, Ratte, Zebrafisch, Fliege und Schimpanse sequenziert. Diese Tiere sind in der Genetik wichtige Modellorganismen. Der Vergleich des menschlichen Erbguts mit dem Genom dieser Tiere ermöglicht entscheidende Fortschritte auf dem Weg zu jenem Ziel, das bei der Gründung des DHGP formuliert wurde: die systematische Identifizierung und Charakterisierung der Struktur, Funktion und Regulation von Genen, die mit Krankheiten in Verbindung gebracht werden. Das Erbgut von Schimpansen beispielsweise gleicht dem Erbgut des Menschen zu 96 Prozent. Trotz dieser Übereinstimmungen leiden die Menschenaffen nicht an menschlichen Krankheiten wie Aids und Malaria. Die Identifizierung derjenigen Gene, die Schimpansen vor diesen Krankheiten schützen, könnte daher helfen, neue Therapien zu entwickeln.

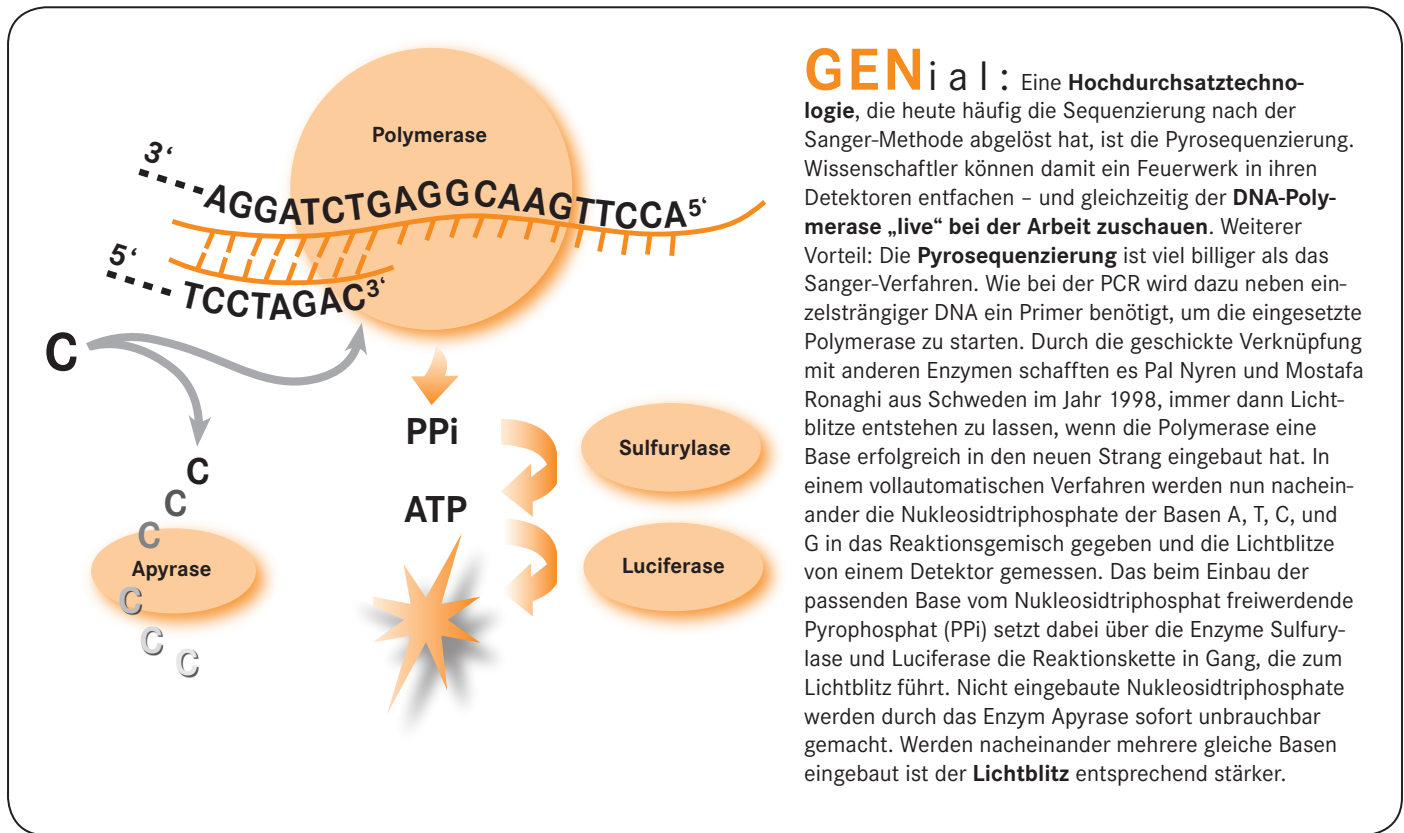
GENial: Die Bioinformatik liefert die **Browser für das Genom**. Mithilfe der von Bioinformatikern programmierten Rechenvorschriften konnten Computer zum Beispiel sequenzierte DNA-Bruchstücke zu einer Gesamtsequenz zusammensetzen. Hauptaufgabe der **Bioinformatik** ist es heute, Genkarten und den Berg der Sequenzdaten zu speichern, auf einem aktuellen Stand zu halten und für Suchanfragen verfügbar zu machen – beispielsweise wenn eine Arbeitsgruppe wissen will, wo sich ein von ihr identifiziertes Gen im Genom befindet.

Sehr hilfreich bei der Aufklärung von Krankheitsursachen ist auch der Vergleich mit Tieren, bei denen Ähnlichkeiten zum Menschen nicht so offensichtlich sind wie bei Primaten. Ähnliche Veränderungen in einzelnen Genen bei Menschen und Mäusen haben häufig vergleichbare Krankheiten zur Folge, denn das rund 25.000 Gene umfassende Erbgut der Nager gleicht dem menschlichen zu 95 Prozent. Rund 99 Prozent aller Mausgene haben ein funktionelles Gegenstück im Menschen. Steht ein menschliches Gen zum Beispiel unter Verdacht, Alzheimer auszulösen, kann es in eine Maus eingeschleust werden. Bestätigt sich diese Vermutung, lassen die Folgen dieses Gentransfers die molekularen Mechanismen der Krankheit erkennen. Bei sogenannten Knock-out-Mäusen können gezielt Gene ausgeschaltet werden. Durch genaues Beobachten der Folgen dieser Manipulationen lassen sich dann Rückschlüsse auf die Funktion dieses Gens beim Menschen ziehen. In den embryonalen Stammzellen dieser Mäuse wird die Basenfolge des Zielgens durch einen künstlich hergestellten DNA-Abschnitt – dem Inaktivierungsvektor – ersetzt (homologe Rekombination). Dieser enthält eine inaktive Variante des

auszuschaltenden Gens. Nach dieser Manipulation werden die Stammzellen in die Keimbahn eingebracht, sodass sich eine Maus mit einem genetischen Mangel entwickeln kann. Im Jahr 2007 wurden die grundlegenden Arbeiten zur Schaffung von Knock-out-Organismen ihrer wissenschaftlichen Bedeutung gemäß gewürdigt: Mario Capecchi und Oliver Smithies aus den USA bekamen zusammen mit ihrem britischen Kollegen Martin Evans den Nobelpreis für Medizin.

Die Schaffung und Erforschung von Mausmutanten war ebenfalls ein wichtiges Arbeitsgebiet des DHGP. Anders als im oben beschriebenen Verfahren erzeugten die deutschen Mausforscher in den Nagern Punktmutationen mithilfe einer chemischen Substanz (Ethyl-Nitroso-Harnstoff, ENU). Anschließend wurden die Tiere untersucht und anhand ihrer Symptome eingeordnet. Auf diese Weise konnten 180 Typen von Modellmäusen mit erblich bedingten Krankheiten erzeugt werden: manche hatten Allergien

und Herz-Kreislauf-Defizite, andere ein gestörtes Immunsystem. Mit Beginn des Nachfolgeprojekts des Deutschen Humangenomprojekts, dem Nationalen Genomforschungsnetz (NGFN), wurden diese Arbeiten im Jahr 2002 institutionalisiert: In München entstand eine Einrichtung, die weltweit einmalig war und auf deren Arbeiten noch heute Genomforscher in aller Welt aufbauen: die Deutsche Mauslinik (German Mouse Clinic).



GENi al: Wer Gene erforschen möchte, braucht Erbsubstanz. Am besten in leicht verfügbarer, gut aufgearbeiteter Form. Damit nicht jede einzelne Forschergruppe ihre eigene **Biobank** für die benötigten Untersuchungsmaterialien unterhalten muss, wurde 1995 **das Deutsche Ressourcenzentrum für Genomforschung (RZPD)** gegründet – damals noch im Rahmen des Deutschen Humangenomprojekts (DHGP). Das RZPD war Europas größtes Servicezentrum für die funktionelle Genomforschung und besaß weltweit die umfangreichste öffentlich zugängliche Klon Sammlung. Im Berliner Heubnerweg 6 lagerten **bei -80° Celsius** mehr als 1.200 genomische und cDNA-Bibliotheken in Tiefkühlschränken – zusammengenommen über **35 Millionen Klone** von 32 verschiedenen Spezies, insbesondere des Menschen und relevanter Modellorganismen. Seit Mitte 2007 gibt es das RZPD in seiner alten Form nicht mehr: Aus dem ursprünglich über Fördergelder finanzierten Dienstleistungs- und Forschungsprojekt sind inzwischen zwei eigenständige Firmen hervorgegangen.

AUFGABEN:

1. a) Erklären Sie den Begriff **Knock-out-Maus**! Nennen Sie ein weiteres Verfahren zur Herstellung von Mausemutanten!
 b) Wie viele verschiedene **Knock-out-Mäuse** gibt es inzwischen? Stellen Sie einen dieser Mäusestämme vor! Nutzen Sie dazu das Internet als Quelle.
2. Welche Vorteile bietet die **Pyrosequenzierung**? Erläutern Sie den Vorgang mithilfe der Abbildung!
3. Lesen Sie den Artikel über die **Mauslinik** und fassen Sie zusammen:
 a) Welche Untersuchungen werden an Mäusen durchgeführt?
 b) Worin liegt die besondere Bedeutung dieser Versuche?

Von Beethoven und anderen Mäusen

Als der sehr hohe, kaum hörbare Ton erschallt, schrickt der kleine Patient kurz zusammen: Hörtest bestanden! Es ist nur eine von vielen Stationen im Gesundheits-Check-up, die jeder Patient in der ungewöhnlichen Klinik in Neuherberg bei München durchlaufen muss. Das Besondere an dieser Klinik: Die Patienten sind keine Menschen – es sind Mäuse!

Im Alter von neun Wochen geht es los: In der Deutschen Mauslinik (German Mouse Clinic, GMC) am GSF-Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit in Neuherberg werden die Mausmutanten auf Herz und Nieren geprüft. Als Erstes wiegen und vermessen Klinik-Mitarbeiter die Mäuse und untersuchen, ob Auffälligkeiten vorliegen. Anschließend tragen sie alle Ergebnisse und das Geburtsdatum in eine Datenbank ein. Doch damit nicht genug: Insgesamt vierzehn Stationen werden die Mäuse in den nächsten zwei Monaten durchlaufen. Denn die Deutsche Mauslinik ist eine Diagnoseklinik, in der genetisch veränderte Mäuse systematisch phänotypisiert werden. Verhalten und Lungenfunktion werden dabei ebenso untersucht wie Gehirn, Herz-Kreislauf-System und Allergien – kein wichtiger Bereich wird ausgelassen. „Selten wird ein Patient so umfassend durchgecheckt wie unsere Mäuse“, sagt Professor Martin Hrabé de Angelis, Direktor der GMC. „Unser Ziel ist es, Tiermodelle für genetisch bedingte menschliche Krankheiten zu finden, um diese besser zu verstehen.“ Die Mauslinik deckt deshalb das ganze Spektrum der Mausgenetik ab, angefangen bei der Erstellung genetisch veränderter Mauslinien, über die Phänotypisierung bis hin zur Archivierung der Mauslinien. „Mausmutanten herzustellen ist die eine Sache“, erläutert Hrabé de Angelis. „Wichtig ist dann vor allem die gründliche Diagnose. Denn nur wenn wir bis ins letzte Detail verstehen, was in den Mutanten passiert, können wir Genfunktionen mit medizinischer und biologischer Relevanz aufklären.“

Das Mäuseprojekt ist ein Teil des Nationalen Genomforschungsnetzes, in dem die Kooperation von Wissenschaftlern aller Fachrichtungen gefördert wird. Ärzte und Genforscher, sie alle können von den kranken Mäusen in der Mäuseklinik eine Menge lernen. Wie zum Beispiel von der Beethoven-Maus, die wie ihr berühmter Namensgeber taub ist. Die Beethoven-Maus hatte den Hörtest nicht bestanden. Als die Wissenschaftler nachforschten, weshalb diese Maus nicht hören kann, stellten sie fest, dass die Haarzellen des Innenohrs nicht mehr vorhanden waren. Solche Haarzellen braucht man, um Schallwellen wahrzunehmen. Die Taubheit der Beethoven-Maus ist erblich, denn auch bei den Nachkommen degenerieren die Haarzellen. Um der Krankheitsursache auf die Spur zu kommen, musste man also nach einer Veränderung im Erbgut suchen. Eine Sisyphos-Arbeit, denn jede Maus besitzt etwa 25.000 Gene. Aber die Gen-Fahnder waren erfolgreich. Sie fanden die Veränderung in einem Gen namens Tmc1. Tmc 1 enthält die Bauanleitung für ein Eiweiß, das in der Hülle der Haarzellen vorkommt.

Aber sind diese Forschungsergebnisse auch auf den Menschen übertragbar? In vielen Fällen sind die Krankheitsursachen bei Maus und Mensch sehr ähnlich, denn das Erbgut von Mensch und Maus ist zu fast 95 Prozent identisch. Man untersuchte Familien, in denen im Alter ein Gehörverlust auftritt. Und tatsächlich: Manche dieser Familien hatten Veränderungen im menschlichen Tcm1-Gen. Dank der Beethovenmaus kennt man jetzt also eine weitere Ursache für Taubheit und kann gezielt nach Behandlungsmöglichkeiten suchen.

Andere Patienten der Mauslinik leiden an Bluthochdruck, Diabetes oder Fettleibigkeit. In der Mauslinik gibt es 5.000 Mäuse, darunter 450 Modelltiere für menschliche Krankheiten. Für die vielfältigen und umfassenden Untersuchungen arbeitet die Mauslinik mit zahlreichen Spezialisten zusammen. So testen zum Beispiel Neurologen der Ludwig-Maximilians-Universität in München Reflexe und Muskelspannung, während Wissenschaftler der Technischen Universität München Blutproben der Mäuse auf immunologische Erkrankungen untersuchen. Für die Diagnose setzen die Wissenschaftler Geräte ein, die man auch aus einer normalen Klinik kennt: Elektrokardiogramm, Röntgen- und Ultraschallgeräte sowie Blutanalysemaschinen. Sie unterscheiden sich lediglich in der Größe. So wurde zum Beispiel ein Mikro-Computertomograf speziell für Mäuse entwickelt. Nach Abschluss des Primärscreens liegen den Wissenschaftlern dann 320 unterschiedliche Parameter vor. Anhand dieser Daten können sie beurteilen, ob es sich um eine Mauslinie mit einem Phänotyp handelt, der einer menschlichen Erkrankung ähnelt. Siebzig genetisch veränderte Mauslinien haben die Neuherberger Wissenschaftler seit dem Aufbau der GMC bereits untersucht. „Bei fast allen fanden wir zahlreiche Abweichungen im Vergleich zu den genetisch unveränderten Mäusen“, erzählt Hrabé de Angelis.

Nur Krankheiten, die von Viren oder Bakterien verursacht werden, wird man hier nicht finden. Denn die Mäuse sind in supersauberen Käfigen untergebracht, in einer absolut sterilen Umgebung. Würden hier Krankheitserreger eindringen, wäre unbezahlbare Forschungsarbeit von Jahren vernichtet. Die Mäuse wären den Krankheitserregern hilflos ausgeliefert, denn es gibt meist keine Medikamente, die schädliche Bakterien oder Viren stoppen könnten. Die Vorschriften in der Mauslinik sind daher mindestens so streng wie in einem Operationsaal. Wer hier rein will, muss erst durch eine Schleuse, und es gibt sterile Kleidung und einen Mundschutz, den man sich anlegen muss. Erst dann können die Forscher der Mauslinik mit ihren Untersuchungen beginnen.

About Beethoven and Other Mice

When the very high, hardly discernible tone resounded, the small patient winced: a passing grade on the hearing test! It is only one of many stations in the medical check-up each patient must pass through in this unusual clinic in Neuherberg near Munich. What is special about this clinic? The patients are not people – they are mice!

At the age of nine weeks the process begins: in the German Mouse Clinic (GMC) at the GSF Research Center for Environment and Health in Neuherberg the mouse mutants are given thorough medical check-ups. First the clinic staff weighs and measures the mice and looks for abnormalities. Then all of the results and the birth date are entered into a database. But that is not all: the mice will progress through 14 stations in the next two months. The German Mouse Clinic is a diagnostic clinic in which genetically modified mice are systematically phenotyped. Behavior and lung function are included in the examination modules along with neurology, cardiology and allergies – no important area is left out. “Hardly any patient is examined as thoroughly as our mice,” says Professor Martin Hrabé de Angelis, director of the GMC. “Our goal is to find mammalian models for genetically determined human diseases in order to understand them better.” For that reason, the Mouse Clinic covers the entire spectrum of mouse genetics, ranging from the creation of genetically modified mouse lines, phenotyping, to the archiving of mouse lines. “Creating mouse mutants is one aspect,” Martin Hrabé de Angelis explains. “But most important is the subsequent thorough diagnosis. Only when we have understood everything down to the last detail about what happens in the mutants can we elucidate gene functions with medical and biological relevance.”

The mouse project is part of the National Genome Research Network, in which the cooperation of scientists from all disciplines is encouraged. Physicians and gene researchers, all of them can learn a lot from the sick mice in the mouse clinic. Such as from the Beethoven mouse who, like its famous eponym, is deaf. The Beethoven mouse had failed the hearing test. When the scientists searched for an answer as to why this mouse was not able to hear, they discovered that the hair cells of the inner ear were no longer present. Such hair cells are needed to capture sound waves. The deafness of the Beethoven mouse is hereditary because the hair cells degenerate in the descendants as well. To trace the cause of the disease it was therefore necessary to search for a mutation in the DNA. A genuine Sisyphos work, for each mouse has approximately 25,000 genes. But the gene researchers were successful. They found the mutation in a gene named *Tmc1*. *Tmc1* has the blueprint for a protein, that is in the membrane of the hair cells.

But are these research findings transferable to humans as well? In many cases the causes of disease in mouse and man are very similar, for the DNA of man and mouse is almost 95 percent identical. Families were studied in which loss of hearing developed in advanced age. And indeed: many of these families had mutations in the human *Tcm1* gene. Thanks to the Beethoven mouse, another cause for deafness is now known and new treatment possibilities can be targeted.

Other mouse clinic patients suffer from hypertension, diabetes, or adiposity. In the mouse clinic there are about 5 000 mice, including 450 model animals for human diseases. The mouse clinic cooperates with numerous specialists in performing the multifaceted, comprehensive examinations. Thus, for instance, neurologists of the Ludwig Maximilian University in Munich test reflexes and muscle tension. Scientists of the Technical University Munich screen blood specimens of mice for immune diseases. To make a diagnosis, the scientists use devices like in a normal clinic: electrocardiogram, x-ray and ultrasound devices and blood analysis machines. The only difference is in the size of the machines. For example, a micro-MRI machine was developed especially for mice. After completing the primary screening, the scientists can refer to 320 different parameters. With this data they can judge whether the particular mouse line represents a phenotype that is similar to a human disease. Since the GMC was established, the Neuherberg scientists have already examined seventy genetically modified mouse lines. “In almost all of them we found numerous deviations in comparison to the genetically unmodified mice,” Hrabé de Angelis explains.

Only diseases which are caused by viruses or bacteria will not be found here. The mice are housed in ultra-clean cages, in an absolutely sterile environment. If pathogens penetrated here, many years’ invaluable research work would be destroyed. The mice would be helpless against the pathogens because there are almost no drugs capable of stopping the damaging bacteria or viruses. The rules and regulations in the mouse clinic are at least as strict as in an operation room. Whoever wants to enter must first pass through a sluice. And he or she must put on sterile clothing and a mask over the mouth and nose. Only after this procedure can the mouse clinic researchers begin with their examinations.