

2. Einleitung

2.1. Kommunikation zwischen Neuronen und Gliazellen

Die Synapse ist der zentrale Kommunikationsort im Nervensystem und setzt sich aus drei Teilen zusammen: Der präsynaptischen Endigung und der postsynaptischen Spezialisierung der Neuronen sowie den umhüllenden Astrozytenfortsätzen (*Tripartite-Synapse* (Araque et al., 1999)), einem Teil der Neuroglia. Das menschliche Nervensystem enthält ca. 10^{12} Neurone, die wiederum über 10^{14} bis 10^{15} Synapsen miteinander kommunizieren (Kandel et al., 2000). Die Gliazellen des Nervensystems werden in Makro- und Mikroglia unterteilt, wobei sich die Gruppe der Makrogliazellen aus Astrozyten, Oligodendrozyten (Schwannzellen im peripheren Nervensystem) sowie Ependymzellen zusammensetzt.

Die Interaktion von Neuronen und Astrozyten spielt eine wichtige Rolle in vielen physiologischen, pathophysiologischen und regenerativen Prozessen des Gehirns, da Astrozyten essentielle Aufgaben im Gehirn übernehmen. Astrozyten dienen nicht nur als Leitstrukturen für wandernde Neurone während der Embryonalentwicklung, sondern sind auch Vorläufer für corticale Projektionsneurone (Malatesta et al., 2003). Astrogliale Fortsätze umhüllen Synapsen eng (Hirrlinger et al., 2004) und kontrollieren die extrazellulären und extrasynaptischen Konzentrationen an Neurotransmittern durch verschiedene Transportsysteme (Bergles et al., 1999). Zudem exprimieren sie zahlreiche Rezeptoren für Neurotransmitter wie ionotrope AMPA- (α -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-Isloxazolpropionat) (Grass et al., 2004; Matthias et al., 2003) oder NMDA- (N-Methyl-D-Aspartat) Glutamaterezeptoren (Schipke et al., 2001). Auch metabotrope purinerge, adrenerge und glutamaterge Rezeptoren werden von Astrozyten exprimiert. Diese Neurotransmitterrezeptoren erlauben es Astrozyten, neuronale Aktivität wahrzunehmen und auf diese mit Signalwegen, die über eine Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration laufen, zu reagieren (Deitmer et al., 1998). Die hohe Kaliumleitfähigkeit und die Expression von *Gap junctions* ermöglichen es Astrozyten, als Kaliumpuffer zu wirken, und diese Kaliumpufferung ist eine Bedingung für die korrekte elektrische Aktivität von feuernenden Neuronen (Walz, 2000). Aber Astrozyten spielen nicht nur eine wichtige Rolle im gesunden, sondern auch im verletzten Gehirn. So sorgen Astrozyten für Reparaturmechanismen im akut verletzten Gehirn wie auch bei neurodegenerativen Prozessen. Dazu gehören Erkrankungen wie die

Alzheimer'sche Erkrankung, die Parkinson'sche Erkrankung aber auch der Alterungsprozess (Cotrina und Nedergaard, 2002; Heales et al., 2004; Meda et al., 2001; Minagar et al., 2002). Eine Störung dieser Prozesse ist ebenfalls Teil der Pathogenese von Erkrankungen wie der Epilepsie, des Hirnödems (Benarroch, 2005), sowie von Erkrankungen der Retina.

Astrozyten sind eine heterogene Zellpopulation und über diese Heterogenität wird schon seit längerer Zeit debattiert. Die Identifikation von sogenannten „germinalen Astrozyten“, eine Gruppe von GFAP-positiven Vorläuferzellen in neurogenen Bereichen des Gehirns, hat diese Debatte weiter angeheizt (Garcia et al., 2004). Auch in *Microarray*-Studien konnte gezeigt werden, dass nur eine geringe Zahl an Genen ubiquitär in allen Astrozytenpopulationen exprimiert wird, einige Gene aber ausschliesslich in Astrozyten bestimmter Hirnbereiche gefunden wurden (Bachoo et al., 2004). Astrozytäre Populationen wurden durch funktionelle Studien im Bezug auf verschiedene spannungsabhängige Strommuster (passiv oder komplex) und unterschiedliche Antworten auf Glutamat (Ströme, die entweder auf Glutamatttransporter oder auf AMPA-Rezeptoren zurückzuführen sind) unterschieden. Diese Arbeiten wurden durch Anwendung der transgenen Mauslinie TgN(hGFAP-EGFP) (Nolte et al., 2001) erleichtert, da in dieser Linie Astrozyten durch das grün fluoreszente Protein EGFP markiert sind und leicht in akuten Hirnschnittmodellen erkannt werden können (Grass et al., 2004; Matthias et al., 2003; Wallraff et al., 2004). Drei Subpopulationen von Astrozyten konnten unterschieden werden. Alle Gruppen zeigten durch AMPA-Rezeptoren vermittelte Einwärtsströme. Die erste Gruppe ist charakterisiert durch nichtrektifizierende, symmetrische und spannungsunabhängige Kaliumströme und eine stabile Antwort auf D-Aspartat über Glutamatttransporter. Die zweite Gruppe zeigte zusätzlich A-Typ Kaliumströme. Die dritte Gruppe, identifiziert durch Immunreaktivität gegen NG2 (ein Chondroitinsulfat-Proteoglykan und Marker für oligodendrogliale Vorläuferzellen (Stegmuller et al., 2002)), zeigte auswärts rektifizierende Kaliumströme, schwächere Kalium-Einwärtsströme und nur minimale, D-Aspartat induzierte Transporterströme (Grass et al., 2004). Diese Population ist nicht über *Gap junctions* gekoppelt. Es wird vermutet, dass diese Gruppe von Astrozyten eine wichtige Rolle bei der Plastizität neuronaler Netzwerke wie z. B. des respiratorischen Netzwerkes im Hirnstamm spielen (Grass et al., 2004). Sie könnten auch eine neue Klasse von Gliazellen neben den klassischen Oligodendrozyten, Astrozyten und Mikrogliazellen darstellen. NG2-positive Astrozyten

erhalten direkten synaptischen *Input* von neuronalen Fasern (Lin et al., 2005; Lin und Bergles, 2004). Die Signifikanz dieses *Inputs* ist allerdings unklar.

Astrozyten bilden ein weit verzweigtes Netzwerk von Fortsätzen aus, die in engem strukturellen und funktionellen Kontakt zu Neuronen und Synapsen stehen. Diese Feinstruktur konnte besonders deutlich an der Synapse zwischen Parallelfasern und Purkinje-Neuronen im Kleinhirn dargestellt werden, die von Fortsätzen der Bergmann-Gliazellen umschlossen ist (Grosche et al., 1999; Grosche et al., 2002). Die Fortsätze der Astrozyten sind sehr dynamisch (Hirrlinger et al., 2004). So bilden sich benachbart zu aktiven Synapsen Filopodien und Lamellipodien mit einer Lebensdauer im Minutenbereich (Hirrlinger et al., 2004). Der molekulare Mechanismus der Bildung dieser Fortsätze sowie ihre funktionelle Bedeutung sind noch unklar. Die morphologische Plastizität / Motilität setzt jedoch eine effiziente Koordination der Aktin-Dynamik und der Zytoskelett-Proteine, die das Aktin-Zytoskelett an Adhäsionsstellen verankern, voraus. Die Interaktion zwischen dendritischen *Spines* und dem umhüllenden Astrogliafortsatz wird durch Ephrin-A3 (auf Astrozyt) / EphA4-Rezeptor-Tyrosinkinase (auf *Spine*)-Signale beeinflusst (Murai et al., 2003). Die Aktivierung von EphA4 durch Ephrin-A3 führt zu einer Verkürzung der Länge der dendritischen *Spines* um 30 % und zum Kollaps von 20 % der *Spines*. Dadurch wird die Gesamt-*Spine*-Dichte reduziert. Andersherum führt die Inhibition von EphA4 zu einer Zunahme der *Spine*-Länge und zu einem disorganisierten Muster der *Spine*-Verteilung.

Lösliche, von Astrozyten ausgeschüttete Faktoren können sowohl die Bildung wie auch die Funktion von Synapsen begünstigen. Thrombospondin 1 und 2 wurden als lösliche Faktoren aus gliakonditioniertem Medium extrahiert, die die Bildung von Synapsen und deren funktionelle Reifung regulieren (Christopherson et al., 2005). Thrombospondine sind oligomere Proteine der extrazellulären Matrix, sind grösser als 300 kD und binden Heparin. Astrozyten sezernieren zum Beispiel auch an Apolipoprotein gebundenes Cholesterin, das die präsynaptische Funktion und die Ausschüttung von Transmittern (Mauch et al., 2001), sowie das Dendritenwachstum fördert (Goritz et al., 2002).

Obwohl Gliazellen nicht erregbar sind, ist es mittlerweile unumstritten, dass sie Neurotransmitter, sogenannte Gliotransmitter, als Antwort auf neuronale Stimulierung freisetzen (Zhang und Haydon, 2005). Die

Neurotransmitter, die von der Präsynapse freigesetzt werden, aktivieren Rezeptoren auf benachbarten Gliazellen, die ihrerseits sogenannte Gliotransmitter freisetzen (Haydon, 2001). Dies führte zum Konzept der *Tripartite-Synapse* (Araque et al., 1999). Astrozyten sind aber auch selbst in der Lage, Gliotransmitter auszuschütten, wie zum Beispiel Glutamat (Zhang et al., 2004b), ATP (Pascual et al., 2005) oder D-Serin (Miller, 2004; Mothet et al., 2005), und somit neuronale Netzwerkaktivität zu modulieren. Daher könnten Astrozyten evtl. auch bei der Gedächtnisbildung beteiligt sein, wie in theoretischen Modellen hypothetisiert wurde (Caudle, 2006). Der Freisetzungsmechanismus ist immer noch umstritten. In kultivierten Astrozyten konnte ein vesikulärer Freisetzungsmechanismus, der Efflux durch Hemikanäle, P2X7-Rezeptoren und auch volumenregulierte Ionenkanäle gezeigt werden (Allen und Barres, 2005). Bezzi und Kollegen führten Ultrastrukturuntersuchungen in hippocampalen Schnitten durch und konnten vesikuläre Glutamatttransporter in astrozytären Fortsätzen nachweisen (Bezzi et al., 2004). Allerdings konnten bisher weder neurotransmittergefüllte Vesikel identifiziert noch eine quantale Freisetzung direkt nachgewiesen werden, es wurden nur indirekte Messungen, zum Beispiel der Membrankapazität, gezeigt (Kreft et al., 2004). Es gibt bisher keine Evidenzen dafür, dass Glutamat in einem geschützten vesikulären Kompartiment in glialen Fortsätzen akkumuliert. In hippocampalen Schnitten kann die synaptische Verbindung zwischen GABAergen Interneuronen und Pyramidenzellen durch von Astrozyten freigesetztes Glutamat verstärkt werden (Kang et al., 1998). Zusätzlich zu Glutamat schütten Astrozyten auch D-Serin und ATP aus, das ebenfalls regulierend auf Neurone wirkt. Astrozyten exprimieren ein astrozytenspezifisches Enzym, die Serin-Racemase, die die Umwandlung von L-Serin zu D-Serin katalysiert (Wolosker et al., 1999). Die Freisetzung von D-Serin führt zu einer Verstärkung der synaptischen Transmission, weil D-Serin die Glycinbindungsstelle des NMDA-Rezeptors besetzt, wodurch die Rezeptoraktivität gesteigert wird (Mothet et al., 2000). Von Astrozyten freigesetztes ATP kann die neuronale Aktivität suprimieren (Pascual et al., 2005). In der Retina wird ATP durch Ektoenzyme zu Adenosin dephosphoryliert, was eine nachfolgende Hyperpolarisierung des Neurons aufgrund aktivierter neuronaler Adenosinrezeptoren bewirkt (Newman, 2003).

Die Liste der Interaktionen zwischen Astrozyten und Neuronen ist lang, es gibt neben den genannten noch viele weitere Beispiele für Interaktionen, zum Beispiel im Bereich des zellulären Metabolismus wie den Glutamatt-

Glutamin-Zyklus (Norenberg und Martinez-Hernandez, 1979) oder im Glutathionstoffwechsel (Dringen und Hirrlinger, 2003).

Andere Gliazellen, die besonders eng mit Neuronen interagieren, sind Oligodendrozyten, bzw. Schwannzellen im peripheren Nervensystem. Diese Zellen bilden die Myelinschicht um Axone von Neuronen (Baumann und Pham-Dinh, 2001). Myelin wurde zum ersten Mal 1854 von Virchow beschrieben (Virchow, 1854; zitiert nach (Baumann und Pham-Dinh, 2001)). Es handelt sich dabei um Verlängerungen der Plasmamembran der Oligodendrozyten, die um die Axone gewickelt sind. Einzelne Oligodendrozyten können dabei mehrere Segmente von Myelin an einem oder an mehreren Axonen ausbilden. Zwischen den Myelinsegmenten sind Aussparungen in der Myelinhülle, die sogenannten Ranvier'schen Schnürringe, wodurch eine saltatorische Erregungsleitung entlang der Axone ermöglicht wird. Diese Schicht erlaubt es somit auch dünnen, feinen Nervenfasern, Impulse sehr schnell weiterzuleiten (Baumann und Pham-Dinh, 2001). Die Zusammensetzung des Myelins ist dabei einzigartig, da es sehr reich an spezifischen Lipiden und zugleich arm an Wasser ist, so dass eine ausreichende elektrische Isolierung der Axone gewährleistet wird. Der Durchmesser eines Axons und die Dicke des Myelins korrelieren, dünne Axone ($< 0,8 \mu\text{m}$) sind im peripheren Nervensystem normalerweise nicht myelinisiert (Friede, 1972). Kürzlich ist axonales Neuregulin 1, Typ III als ein Faktor identifiziert worden, der die Dicke der Myelinschicht durch Aktivierung von ErbB-Rezeptoren auf Schwannzellen reguliert (Michailov et al., 2004). Bei Überexpression von Neuregulin 1, Typ III kommt es zu einer Hypermyelinisierung von Axonen, bei neuregulindefizienten Mäusen zu einer Hypomyelinisierung (Michailov et al., 2004). Auch weitere Faktoren wie der neurotrophe Faktor BDNF oder Neurotrophin-3 und die Modulation des Neuregulin 1-Signalweges durch Integrine haben einen Effekt auf die Myelinisierung (Colognato et al., 2002; Cosgaya et al., 2002; Tolwani et al., 2002).

2.2. Bergmann-Gliazellen des Cerebellums und deren Interaktion mit Neuronen

Gegenüber anderen Gehirnteilen zeichnet sich das Cerebellum durch einen ungewöhnlich regelmässigen dreischichtigen Aufbau aus. Die innere Körnerschicht (Stratum granulosum) und die mittlere Purkinjezellschicht (Stratum ganglionosum) stecken dicht voller Zellkörper, die äussere Molekularschicht (Stratum moleculare, so genannt wegen der

scheinbar homogenen Struktur bei klassischen histologischen Färbungen) besteht hauptsächlich aus Zellfortsätzen voller Synapsen zur Signalübertragung (Ramón y Cajal, 1911; zitiert nach (Sultan und Heck, 2003)). Als einzige afferente Neuronen der Kleinhirnrinde senden die Purkinje-Neurone über ihre Axone inhibitorische Signale aus der Kleinhirnrinde in die cerebellaren Kerne (Hausser et al., 2004). Von dort werden exzitatorische Informationen unter anderem zu Strukturen des Thalamus, des Nucleus ruber, des Vestibularsystems und verschiedenen Strukturen des Hirnstammes weitergeleitet. Inhibitorische Signale gehen zur inferioren Olive (Nauta und Feirtag, 1990). Signale erhält das Cerebellum hauptsächlich vom motorischen Cortex über die Kerne der Pons, die Informationen über Bewegungsabsichten liefert, und vom Rückenmark, das Rückmeldung über die tatsächlichen Bewegungen gibt. Das Kleinhirn kann aufgrund seines rigiden Aufbaus spezifische, rasch nacheinander eintreffende Signale als Muster erkennen. Dadurch erlaubt es dem Körper, schnelle und streng koordinierte Bewegungsabläufe durchzuführen (Heck und Sultan, 2002). Die Purkinje-Neuronen erhalten über die Parallelfasern exzitatorische Signale von den zahlreichen Körnerzellen, die ein Axon in die Molekularschicht senden, wo dieses sich gabelt. Die beiden Schenkel ziehen parallel zu den Furchen des Kleinhirns je zwei bis drei Millimeter weit und durchqueren dabei die Fächer von mehreren hundert Purkinje-Neuronen, die durch viele exzitatorische Synapsenkontakte aktiviert werden (Nauta und Feirtag, 1990). Daneben werden Purkinje-Neuronen durch Kletterfasern innerviert, die aus dem Stammhirn aufsteigend exzitatorische Synapsen bilden (Nauta und Feirtag, 1990). Körnerzellen werden von den Moosfasern inhibitorisch innerviert. Das verhindert vermutlich, dass die allgemeine Aktivität in der Molekularschicht zu stark steigt. In der Molekularschicht befinden sich weitere Interneurone, die Stern- und Korbzellen, deren Dendritenbäume ebenfalls quer zu den Furchen und damit senkrecht zur Richtung der Parallelfasern stehen. Diese Neuronen erhalten Signale von den Körnerzellen und bilden mit ihren fortleitenden Axonen inhibitorische Synapsen zu den Purkinje-Neuronen. Die Golgi-Interneurone befinden sich in der Körnerschicht, bekommen Signale von den Parallelfasern und wirken inhibitorisch auf Körnerzellen.

In der Purkinjenzellschicht befinden sich auch die Zellsomata der Bergmann-Gliazellen (Bergmann, 1875), die sich aus radialen Gliazellen entwickeln und deren Fortsätze die Molekularschicht durchspannen. Sie bilden eine wichtige Leitstruktur für wandernde Körnerneuronen während

der Entwicklung (Hatten, 1990). Neben Bergmann-Gliazellen gibt es fibröse und protoplasmatische Astrozyten im Cerebellum. Ähnlich wie Astrozyten in anderen Hirnarealen haben die Bergmann-Gliazellen wichtige Aufgaben auch in adulten Tieren, wie die Aufrechterhaltung der neuronalen Funktionalität (siehe Abschnitt 2.1.). Bei einer experimentellen Entfernung der Bergmann-Glia durch transgene Expression der Nitroreduktase aus *ESCHERICHIA COLI* und Administration einer Toxinvorstufe zeigten die Tiere auffällige Defekte in der Motorkoordination und auf histologischer Ebene eine Degeneration der Körnerzellen (Cui et al., 2001). Die Fasern der Bergmann-Glia weisen komplexe Seitenausläufer, sogenannte Mikrodomänen auf, die mit den Synapsen zwischen Parallelfasern und Dendriten der Purkinje-Neuronen interagieren (Grosche et al., 1999; Grosche et al., 2002). An diesen Stellen enger morphologischer Interaktion findet auch eine funktionelle Interaktion mit Neuronen statt, zum Beispiel bei der Kaliumhomöostase (Muller und Kettenmann, 1995) oder bei der Entfernung von Glutamat aus dem Extrazellulärraum (Chaudhry et al., 1995). Bergmann-Gliazellen exprimieren ebenfalls funktionelle Neurotransmitterrezeptoren. So werden Rezeptoren für Glutamat (AMPA- (Matsui et al., 2005; Muller et al., 1992) und metabotrope Rezeptoren mGluR1 und mGluR5 (Lopez et al., 1994)), ATP (P2Y-Rezeptor, (Kirischuk et al., 1995)), γ -Aminobuttersäure (GABA-A-Rezeptor, nur in jüngeren Tieren (Muller et al., 1994)), Adrenalin, Noradrenalin (α 1-Adrenorezeptoren, (Kirischuk et al., 1996)), und Histamin (H1-Rezeptor, (Kirischuk et al., 1996)) auf Bergmann-Gliazellen beschrieben. Es gibt auch Evidenzen für NMDA-Rezeptoren (Muller et al., 1993).

Eine elektrische Stimulation der Parallelfasern führt zu einem Einwärtsstrom über die Bergmann-Gliazellmembran und eine Depolarisation der Zellen (Clark und Barbour, 1997), der hauptsächlich durch AMPA-Rezeptoren und durch Glutamattransporter hervorgerufen wird und zu Ca^{2+} -Transienten in Ausläufern von Bergmann-Gliazellen führt (Grosche et al., 1999). Die AMPA-Rezeptoren werden durch Kombination von den Glutamatrezeptor-Untereinheiten GluRA bis GluRD gebildet (Borges und Dingledine, 1998). Die GluRB-Untereinheit ist für die Ca^{2+} -Impermeabilität des AMPA-Rezeptor-Komplex verantwortlich. Bergmann-Gliazellen exprimieren kein GluRB und sind daher Ca^{2+} -permeabel (Burnashev et al., 1992; Muller et al., 1992). Die physiologische Funktion dieser Ca^{2+} -Permeabilität ist noch ungeklärt. Zwei Vorschläge für die funktionelle Rolle der AMPA-Rezeptoren in Astrozyten wurden 2001

unterbreitet (Iino et al., 2001; Oliet et al., 2001). Es konnte gezeigt werden, dass der AMPA-Rezeptor mediierte Ca^{2+} -Influx wichtig für die Generierung und Aufrechterhaltung der strukturellen und funktionellen Assoziation zwischen neuronalen Elementen glutamaterger Synapsen des Cerebellums und Bergmann-Gliazellen ist. Parallelfasern und Kletterfasern haben synaptischen Kontakt zu den Dendriten der Purkinje-Neuronen im cerebellaren Cortex. Bergmann-Gliazellen umhüllen diese Synapsen eng (Grosche et al., 1999). Glutamat, das in diesen Synapsen ausgeschüttet wird, aktiviert AMPA-Rezeptoren sowohl auf den Purkinje-Neuronen als auch auf den Bergmann-Gliazellen, sowie Glutamat-transporter auf den Bergmann-Gliazellen. Stimulation der Parallelfaser-Purkinje-Neuron-Synapse führt zu einer Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration in den Bergmann-Gliazellen. Werden Bergmann-gliale AMPA-Rezeptoren durch Expression der GluRB-Untereinheit Ca^{2+} -impermeabel, kommt es zu einer Retraktion ihrer feinen Fortsätze und die nun gliafreien Purkinje-Neurone werden vermehrt von Kletterfasern innerviert (Iino et al., 2001). Die Entfernung von Glutamat aus dem synaptischen Spalt ist eine der wichtigen glialen Aufgaben. Neben dem Einfluss auf die Kinetik der postsynaptischen, rezeptorvermittelten Ströme konnte eine weitere Funktion der glialen Glutamatantwort gefunden werden: die Feinabstimmung der verstärkenden präsynaptischen Mechanismen, die für die Modulation der Glutamatausschüttung verantwortlich sind (Oliet et al., 2001). Es existiert also eine komplexe funktionelle Integration zwischen Astrozyten und Neuronen.

2.3. Die Maus als genetisch einfach manipulierbarer Modellorganismus

Die Maus als Modellorganismus spielt eine zentrale Rolle (Beck et al., 2000), denn sie ist der neben dem Menschen genetisch am besten charakterisierte Säuger. Das öffentlich geförderte *Mouse Genome Sequencing Consortium* konnte im Mai 2002 die abgeschlossene Sequenzierung des Genoms des weitverbreiteten Mausstammes C57BL/6J zusammenfassend publizieren (Waterston et al., 2002). Die Maus kommt mit geschätzt 27000 bis 30500 Genen auf eine ähnliche Zahl an Erbinformationen wie der Mensch, obwohl sie bei 2,5 Milliarden Basenpaaren ein etwas kleineres Genom hat. 99 % dieser DNA-Abschnitte haben ein entsprechendes Pendant im menschlichen Erbgut und 96 % liegen sogar in ähnlichen Nachbarschaften vor (Waterston et al.,

2002). Die Maus ist in ihrer Entwicklung und ihrem Stoffwechsel dem Menschen ähnlich. An der Maus lassen sich physiologische Vorgänge oder auch Krankheiten gut untersuchen, sie hat eine rasche Generationsfolge, ist klein und einfach zu halten. Fortschritte in der Molekularbiologie und der experimentellen Embryologie haben das Spektrum der möglichen Manipulationen des Mausgenoms in den letzten beiden Jahrzehnten enorm erweitert. In den letzten Jahren wurde eine grosse Anzahl von Mausmutanten etabliert, vor allem auch im Bereich der Neurobiologie (Nagy und Mar, 2001).

Es sind mehrere Verfahren entwickelt worden, um Genfunktionen *in vivo* zu untersuchen: Zum einen die Erzeugung transgener Tiere durch ungerichtete Integration der Transgen-DNA durch Pronukleusinjektion (Gordon et al., 1980; Gordon und Ruddle, 1983; McKnight et al., 1983; Palmiter et al., 1982), durch Transfektion von rekombinanten Retroviren in frühe Embryonen oder durch intrazytoplasmatische Koinjektion von unbefruchteten Mausoozyten mit Spermienköpfen, deren Membran zerstört wurde (Perry et al., 1999). Eine andere Strategie ist die gerichtete Genentfernung in embryonalen Stammzellen entweder durch eine *Loss-of-function* Veränderung („*knock-out*“) oder durch die Einfügung eines Reportergens in den Genort des Interesses („*knock-in*“) oder durch konditionale Entfernung der Genfunktion in einem bestimmten Zelltyp (Doetschman et al., 1987; Gu et al., 1994; Thomas und Capecchi, 1987; Wang et al., 1996). Der Ausdruck transgen wurde 1981 von Gordon und Ruddle (Gordon und Ruddle, 1981) geprägt und bezeichnet Organismen, die eine *in vitro* zusammengesetzte DNA-Sequenz stabil in ihr Genom integriert tragen. Die in dieser Arbeit angewandte Methode ist die weitverbreitete und gut etablierte Technik der Pronukleusinjektion. In jede einzelne Zygote werden, abhängig von der Grösse der linearisierten Transgen-DNA, zehn bis mehrere Hundert nackte DNA-Moleküle injiziert. Vor der zufälligen chromosomalen Integration rekombinieren die DNA-Moleküle zu langen, hintereinander angeordneten Konkatameren. Obwohl der hauptsächlich intermolekulare Mechanismus der Rekombination in Säugerzellen nichthomolog ist, weist die vorherrschende Kopf-an-Schwanz-Anordnung auf einen homologen Rekombinationsprozess zwischen mehreren Kopien hin (Bishop und Smith, 1989). Die einfachste Methode eines Transgens besteht aus einem Promotor, der die Expression des Gens des Interesses, kloniert als cDNA, treibt und einer Polyadenylierungssignalsequenz, die für eine angemessene Termination der Transkription und die Polyadenylierung der mRNA sorgt. Diese

Minimalkonfiguration garantiert häufig nur eine wenig befriedigende Expression des Transgens. Es können daher noch weitere Elemente inkloniert werden, um die Güte der Transgenexpression zu erhöhen. Die Kozak-Konsensussequenz (TCG CCA CCA TGG), eine kleine Sequenz einer 5'-nichttranslatierten Sequenz, die die Translationsinitiation verbessert, und intronische Sequenzen können eingefügt werden.

Bei den ungerichteten Strategien können nur DNA-Sequenzen zum Genom hinzugefügt werden, wohingegen bei der gerichteten Rekombination in embryonalen Stammzellen der endogene chromosomale Genlocus verändert werden kann. Der zeitliche Umfang einer solchen gerichteten Strategie übersteigt allerdings die der ungerichteten Methoden um ein Vielfaches.

2.4. Fluoreszente Proteine als zelltypspezifische Marker im ZNS

Das grün fluoreszierende Protein (GFP) ist das Stammprotein der Familie von GFP-strukturähnlichen Proteinen. GFP-strukturähnliche Proteine sind eine Familie von homologen 25-30 kD grossen Polypeptiden, deren Emission von 442-645 nm reicht. Die Mitglieder dieser Familie bestehen aus einer kleinen, kompakten elfsträngigen β -Faltblatt-Struktur in Fassform, in welchem sich der Fluorophor spontan bildet. Die verschiedenen Farben resultieren aus der unterschiedlichen chemischen Struktur der fluoreszenten Seitenkette (Wachter, 2005).

Im Jahr 1999 wurden homologe Proteine aus nichtbiolumineszenten riffbildenden Korallen und Seeanemonen (Abteilung Coelenterata, Stamm Cnidaria, Klasse Anthozoa) gewonnen (Matz et al., 1999). Diese Proteine weisen eine unerwartet grosse farbliche Diversität auf. Die Funktion dieser Proteine ist noch unklar. Es werden verschiedene Möglichkeiten diskutiert, wie z. B. Photoprotektion für endosymbiontische Algen, Hilfe bei der Photosynthese oder eine Funktion als Photorezeptor (Salih et al., 2000; Shagin et al., 2004). Im biolumineszenten System einiger Coelenteraten inklusive aller hydroiden Polypen fungieren die fluoreszenten GFP-strukturähnlichen Proteine als zweite Emitter, die das Lumineszenzspektrum von einem weiten blauen zu einem scharfen grünen umwandeln (Shagin et al., 2004). Dieser Effekt wird als eine Anpassung an das visuelle System von potentiellen Fressfeinden im grünlichen Küstenwasser diskutiert (Shagin et al., 2004).

GFP aus der Hydromeduse *Aequorea victoria* (AvGFP; Abteilung Coelenterata, Stamm Cnidaria, Klasse Hydrozoa; Abb. 1 A, B) wurde als Nebenprodukt bei der Aufreinigung von Aequorin, einem chemilumineszenten Protein, entdeckt (Shimomura et al., 1962). AvGFP war das erste natürliche Protein, dessen Chromophor keine Kofaktoren benötigt, da er Bestandteil der Peptidkette ist (Abb. 1 G). Der fluoreszente Chromophor von AvGFP wird durch spontane Zyklisierung der Seitenketten von Serin 65, Tyrosin 66 und Glycin 67, ausgelöst durch die Proteinfaltung, gebildet. Es entsteht ein mit dem p-Hydroxyphenylring des Tyrosins 66 konjugierter intermediärer Zyklopentenylring, der zu einem Imidazolring oxidiert und dehydratisiert wird (Abb. 1 G; Wachter, 2005). Der Chromophor wird an einer verzerrten α -Helix gebildet, die in der Mitte eines elfsträngigen β -Fasses (Abb. 1 E) liegt (Ormo et al., 1996; Yang et al., 1996). AvGFP hat allerdings eine schlechte Quantenausbeute und bleicht unter Anregung schnell aus. Durch sequenzgerichtete Mutagenese wurde eine Reihe von Varianten (z. B. ECFP, EGFP, EYFP) erzeugt, die heller und spektral unterschiedlich sind (Heim et al., 1994; Heim et al., 1995; Heim und Tsien, 1996; Zhang et al., 1996).

Posttranslationale Zyklisierungen des Peptidrückgrates sind allerdings nicht einzigartig für GFP, es wurde neben anderen Proteinen auch bei den tetrameren roten fluoreszenten Proteinen gezeigt (Gross et al., 2000; Wiehler et al., 2001; Zagranichny et al., 2004), die einen ähnlichen Chromophor bilden (Abb. 1 E), der allerdings noch weiteren Oxidationsreaktionen unterzogen wird. Eine ganze Serie neuer Chromoproteine (RCFP, Abb. 1 C) mit zu GFP homologer Struktur wurde aus Anthozoa isoliert (Fradkov et al., 2000; Gurskaya et al., 2001; Lukyanov et al., 2000; Matz et al., 1999). RCFPs sind charakterisiert durch eine helle Fluoreszenz und einer spektralen Variabilität von zyan bis infrarot. Kristallstrukturanalysen bestätigten die Voraussagen der Sequenzanalysen, dass es sich bei den Monomeren um ein dem GFP-Strukturhomologes, elfsträngiges β -Fass mit einer α -Helix in der Mitte handelt. Autokatalytische Prozesse ähnlich wie bei GFP führen zur posttranslationalen Modifikation eines internen Tripeptids, wobei die erste Aminosäure variabel ist (Glutamin, Histidin, Lysin usw.). Die beiden weiteren Aminosäuren sind konserviert: Tyrosin und Glycin, entsprechend Tyrosin 66 und Glycin 67 im GFP (Wachter, 2005). Rotverschobene GFP-ähnliche Proteine haben ein chromophores π -System, das im Vergleich zu GFP weiter modifiziert wurde. Das grün-fluoreszierende π -System scheint in diesen eine intermediäre Stufe darzustellen (Gross et al., 2000).

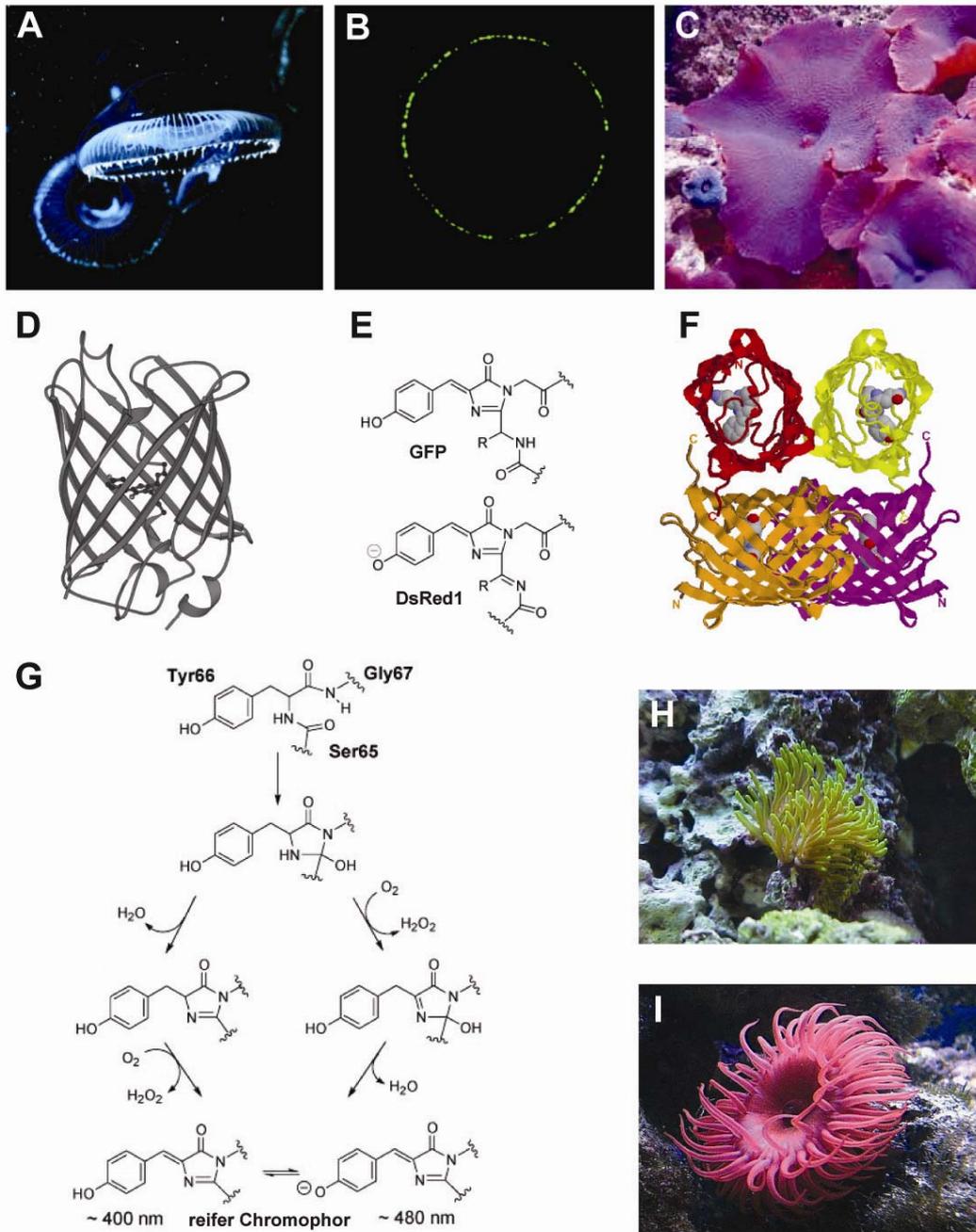


Abb. 1: Fluoreszente Proteine. Aus der Hydromeduse *Aequorea victoria* (A), wurde das fluoreszente Protein AvGFP als erstes seiner Familie extrahiert. Das Protein wird im Ringkanal des Umbrellas exprimiert (B). Die Mitglieder der GFP-Familie bestehen aus einem kleinen, kompakten elfsträngigen β -Fass (D), in welchem sich der Fluorophor spontan durch eine Zyklisierungsreaktion der Aminosäuren Ser65, Tyr66 und Gly67 bildet (G). Für die Reaktion wird nur molekularer Sauerstoff benötigt. Die verschiedenen Farben resultieren aus der unterschiedlichen chemischen Struktur der fluoreszenten Seitenkette (E). DsRed wurde aus der Scheibenanemone *Discosoma sp.* (C) isoliert und bildet ein Tetramer, bei dem die benachbarten Monomere an unterschiedlichen Grenzflächen verbunden sind (F). Weitere Vertreter von fluoreszenten Proteinen sind AmCyan1 und AsRed2, deren Wildtypvarianten aus der Seeanemone *Anemonia majano* (H), bzw. aus *Anemonia sulcata* (I) isoliert wurden.

Bei drFP583 (DsRed1) aus DISCOSOMA SP. (Scheibenanemone) (Yarbrough et al., 2001) beinhaltet die weitere chemische Modifikation der aktiven Seitenkette eine weitere Oxidation, die mit der Bildung einer cis-Struktur der Peptidkette einhergeht. Das Resultat ist eine Erweiterung des chromophoren π -Systems um ein Acylimin, das an den Zyklopentenyl-Imidazolinon-Ring gebunden ist (Abb. 1 E). Daraus resultiert der spektrale Unterschied zu GFP. Nachteil der GFP-strukturähnlichen Proteine aus Anthozoa sind die obligate Oligomerisierung und die langsame oder unvollständige Chromophorreifung (Verkhusha und Lukyanov, 2004).

DsRed als erster Vertreter fluoreszenter Proteine aus Anthozoa bildet ein Tetramer (Abb. 1 F), wie kristallographische Untersuchungen bestätigt haben (Yarbrough et al., 2001). Jedes DsRed-Monomer ist über Salzbrücken und Wasserstoffbrückenbindungen, teilweise durch eingebundenes Wasser, mit zwei benachbarten Monomeren an unterschiedlichen Grenzflächen verbunden (Abb. 1 F). Die hydrophobe Grenzfläche besteht aus einem hydrophoben Mittelteil, der von polaren Seitenketten umrandet ist. Die tetramere Struktur ist zwischen Proteinen aus Anthozoa hochkonserviert (Verkhusha und Lukyanov, 2004).

Fluoreszente Proteine werden in der Neurobiologie sehr erfolgreich eingesetzt. Transgene Mauslinien mit zytosolischer Expression fluoreszenter Proteine wurden verwendet, um die Entwicklung des ZNS und Zell-Zell-Interaktionen im Nervensystem zu untersuchen. Die erste Mauslinie dieser Art war die TgN(hGFAP-S65T-GFP), eine Linie, in der selektiv Astrozyten durch die Verwendung des humanen glialen sauren Faserprotein (GFAP)-Promotors markiert sind (Zhuo et al., 2001). S65T-GFP wurde auch verwendet, um Oligodendrozyten zu markieren (Fuss et al., 2000). Der Thy1.2-Promotor (Caroni, 1997) wurde verwendet, um fluoreszente Proteine transgen in Neuronen zu exprimieren (Feng et al., 2000). Das am weitesten verbreitete fluoreszente Protein, das *enhanced green fluorescent protein* (EGFP) wurde verwendet, um Astrozyten (Nolte et al., 2001), Oligodendrozyten (Mallon et al., 2002) und Mikrogliazellen zu markieren (Jung et al., 2000). Bei letzterem wurde EGFP durch homologe Rekombination in den CX3CR1-Genlocus inseriert. GFP und seine Spektralvarianten werden häufig auch als fluoreszente Marker zur Lokalisation von Proteinen sowohl *in vivo* als auch *in vitro* (Boyden et al., 2005) verwendet. Dazu werden Fusionsproteine aus beiden Genen exprimiert.

Tab. 1: Übersicht über die wichtigsten bisher beschriebenen fluoreszenten Proteine und deren spektrale Eigenschaften.

FP	Ext.-max. (nm)	Em.-max. (nm)	Ext.-koeff. ($M^{-1}cm^{-1}$)	Quartärstruktur	Referenz
AvGFP	397 (475)	509	27600	Monomer	Shimomura et al., 1962
ECFP	433 (453)	475 (501)	26000	Monomer	Patterson et al., 2001; Tsien, 1998
EGFP	488	507	55000	Monomer	Patterson et al., 2001; Tsien, 1998
EYFP	513	527	84000	Monomer	Patterson et al., 2001; Tsien, 1998
JellyRed	584	610	44000	Monomer	Shagin et al., 2004
DsRed1	558	583	22500	Tetramer	Matz et al., 1999
HcRed1	588	618	16000	Dimer	Gurskaya et al., 2001
AsRed2	576	592	56200	Tetramer	Lukyanov et al., 2000
mRFP1	584	607	44000	Monomer?	Campbell et al., 2002
AmCyan1	458	486	40000	Tetramer	Matz et al., 1999

Ext.-max.: Extinktionsmaximum; Em.-max.: Emissionsmaximum; Ext-Koeff.: Extinktionskoeffizient.

2.5. Die Cre-Rekombinase und deren induzierbare Variante CreERT2

Verschiedene Zelltypen des Gehirns exprimieren häufig viele gemeinsame Gene (Verkhratsky und Steinhauser, 2000). Dadurch ist es oft sehr schwierig, den Beitrag eines bestimmten Gens zur Funktion in einem bestimmten Zelltyp zu quantifizieren. Pharmakologische Eingriffe wirken auf die entsprechenden Proteine in beiden Zelltypen. Um dieses Problem zu umgehen, wurden mit Hilfe des Cre/LoxP-Systems (Gu et al., 1993; Rajewsky et al., 1996) die Technik der konditionalen Mausmutanten entwickelt, die selektiv eine DNA-Rekombination im gewünschten Zelltyp ermöglicht.

Das Cre/LoxP-System (Sauer und Henderson, 1988) (Gu et al., 1993; Tsien et al., 1996) Übersicht in (Lewandoski, 2001)) besteht aus zwei

Komponenten: der Cre-Rekombinase (*causes recombination*) und den sogenannten LoxP-Sequenzen (*locus of crossover x* aus dem Bakteriophagen P1). Die Cre-Rekombinase ist ein 38 kDa grosses Protein, das aus dem Bakteriophagen P1 isoliert wurde und zur Familie der ortsspezifischen Tyrosin-Integrasen gehört (Abremski et al., 1983; Argos et al., 1986; Sauer und Henderson, 1989). Die Cre-Rekombinase katalysiert die konservative Rekombination der DNA zwischen zwei LoxP-Erkennungssequenzen (Hamilton und Abremski, 1984; Sternberg und Hamilton, 1981). Diese LoxP-Erkennungssequenzen sind 34 bp lange DNA-Sequenzen, die aus zwei 13 bp umfassenden palindromen Bereichen sowie einer *Spacer*-Region von 8 bp, die die beiden invertierten Regionen voneinander trennt, besteht. Je zwei Moleküle der Cre-Rekombinase binden an eine LoxP-Erkennungssequenz (Mack et al., 1992). Die Basenfolge der *Spacer*-Region ist ebenfalls von Bedeutung, da für eine effiziente Rekombination zwischen zwei LoxP-Sequenzen homologe Sequenzen in diesem Bereich vorliegen müssen (Hoess et al., 1986). Wenn beide LoxP-Sequenzen einen DNA-Abschnitt in der gleichen Orientierung flankieren, dann wird die dazwischenliegende DNA-Sequenz ausgeschnitten und es bleibt nur eine LoxP-Sequenz erhalten, die sich hälftig aus den beiden ursprünglichen zusammensetzt (Abremski et al., 1983). Der Mechanismus der Exzision erfolgt über die Bildung einer intermediären, fast tetraedrischen Holliday-Struktur der DNA (Vetcher et al., 2006), die durch den tetrameren Cre-Komplex stabilisiert wird (Hoess et al., 1987). Nukleophile Tyrosinreste der ersten Rekombinase-Untereinheit katalysieren die initiale DNA-Spaltung an spezifischen Phosphodiesterbindungen über die Bildung kovalenter 3'-Phosphotyrosyl-intermediate. Das entstehende zirkuläre DNA-Fragment wird von den Zellen schnell abgebaut (Van Duyne, 2001). Die Cre-Rekombinase benötigt für die Katalyse der Rekombination keine zusätzlichen Proteine oder Kofaktoren, so dass ihre Funktion auch ausserhalb des Bakteriophagen, z.B. in der Maus, gewährleistet ist (Abremski et al., 1983; Abremski und Hoess, 1984; Sternberg und Hamilton, 1981)

Das allgemeine Prinzip der Cre/LoxP-vermittelten, zelltypspezifischen Mutation beruht auf der Generierung zweier Mauslinien. In den Tieren der ersten Linie wird die Cre-Rekombinase unter der Kontrolle eines zelltypspezifischen Promotors exprimiert. Die Mäuse der zweiten Linie tragen ein Gen, das durch zwei LoxP-Sequenzen flankiert wird. Es werden essentielle Bereiche des Zielgens durch homologe Rekombination in embryonalen Stammzellen so durch zwei LoxP-Sequenzen flankiert (im

Laborjargon als "gefloxt" bezeichnet), dass diese nicht mit der normalen Expression des Gens in der Maus interferieren. Um dies zu erreichen, werden LoxP-Sequenzen zumeist in Introns platziert, wobei aber auch Insertionen in 5'- oder 3'-flankierenden Bereichen beschrieben wurden, die die Wildtyp-Expression der Zielgene nicht beeinflussten (Guy et al., 2001; Sakai et al., 2001). Durch die Kreuzung von Mäusen beider Mauslinien entstehen doppeltransgene Nachkommen. In weiteren Verpaarungen werden Tiere geboren, die für das mit LoxP-Sequenzen flankierte Allel homozygot sind. Innerhalb dieser Mäuse findet in allen Zellen, die die Cre-Rekombinase exprimieren, die Cre-vermittelte Rekombination zwischen den LoxP-Sequenzen statt. In allen Zellen, die die Cre-Rekombinase nicht exprimieren, bleibt der flankierte Locus unverändert (Abremski et al., 1983). Um eine konditionelle Expression eines Transgens, z. B. eines Reportergens zu erreichen, wird eine mit LoxP-Sequenzen flankierte STOP-Kassette zwischen dem Promotor und dem Transgen platziert, so dass die Expression des Transgens erst nach Exzision der LoxP-flankierten STOP-Kassette erfolgen kann (Lakso et al., 1992). Mit STOP-Kassette wird ein DNA-Abschnitt bezeichnet, der dazu dient, die Expression des 3'-gelegenen Gens zu verhindern.

Bisher wurde der Cre/LoxP-Ansatz erfolgreich eingesetzt, um Gene in verschiedenen Hirnregionen und Zelltypen wie corticalen, hippocampalen oder cerebellären Neurone, aber auch Oligodendrozyten und Astrozyten auszuschalten (Barski et al., 2000; Funfschilling und Reichardt, 2002; Goebbels et al., 2005; Lappe-Siefke et al., 2003; Tsien et al., 1996; Zhuo et al., 2001). Dadurch gelang es, die Nachteile des durch die Technik der homologen Rekombination in embryonalen Stammzellen generierten konventionellen *Knock-outs* (Capecchi, 1989) zu umgehen, da eine räumlich beschränkte Deletion des betreffenden Gens in bestimmten Zelltypen erreicht wird. Eine räumlich und zeitlich unbeschränkte Deletion des betreffenden Gens in allen Zellen des Individuums kann zu starken Entwicklungsdefekten oder frühzeitigem Tod führen und damit die Analyse der Genfunktion im adulten Organismus erschweren oder sogar verhindern. Mittlerweile wurden weitere ortsspezifische DNA-Rekombinasen mit anderen Eigenschaften, wie z. B. die Flp-Rekombinase, gefunden (zur Übersicht: Garcia-Otin und Guillou, 2006).

Allerdings reicht die räumliche Kontrolle der Cre-Aktivität bei vielen Anwendungen nicht aus, es muss zusätzlich noch der Zeitpunkt definiert sein, an dem die Rekombination stattfindet. Bei Verwendung einer

Mauslinie mit konstitutiver Expression der Cre-Rekombinase unter der Kontrolle des humanen GFAP-Promotors (Garcia et al., 2004; Marino et al., 2000; Zhuo et al., 2001) zur genetischen Rekombination astroglialer Gene kommt es zum Beispiel ebenfalls zur Rekombination in Neuronen und Oligodendrozyten, da der humane GFAP-Promotor auch in embryonalen radialen Gliazellen ab dem Embryonaltag 13,5 aktiv ist. Diese Zellen sind Vorläuferzellen von Neuronen (Malatesta et al., 2003; Zhuo et al., 2001) und Oligodendrozyten (Casper und McCarthy, 2006). Das bedeutet, dass zusätzlich zur gewünschten astroglialen Rekombination auch Neuronen rekombiniert sind und der Phänotyp nicht nur auf die Expression in Astrozyten allein zurückgeführt werden könnte. Zudem könnten die Tiere aufgrund der Ausschaltung von Genen in proneuronalen Zellen während der Embryonalentwicklung einen Phänotyp aufweisen, der auf schwerwiegende Entwicklungsstörungen zurückzuführen ist (Malatesta et al., 2003).

Um zusätzlich zur zelltypspezifischen auch eine zeitliche Kontrolle der Cre-Aktivität zu erreichen, wurden ligandenregulierte Formen der Cre-Rekombinase entwickelt, die es ermöglichen, die Cre-Aktivität erst im erwachsenen Organismus durch Induktion einzuschalten. Ein ideales induzierbares Cre-System sollte:

- keine Basalaktivität in Abwesenheit des Induktors aufweisen (*leakiness*)
- eine effiziente Rekombination in allen Zellen verursachen (keine mosaikartige Expression)
- einen nichttoxischen, einfach erhältlichen, kostengünstigen und einfach verabreichbaren Induktor haben, der keine weiteren Effekte im Organismus zeigt und schnell in gewünschter Konzentration im Zielgewebe ankommt

Hierzu wurden verschiedene experimentelle Ansätze verwendet, bei denen Fusionsproteine der Cre-Rekombinase mit den Ligandenbindungsdomänen von mehreren zytosolischen Hormonrezeptoren entwickelt wurden (Brocard et al., 1998; Metzger et al., 1995; Tsujita et al., 1999). Dabei wurden Cre-Varianten ohne eine Kernimportsignalsequenz verwendet. Eine erfolgreiche Strategie ist die Fusion der Cre-Rekombinase mit einer mutierten Ligandenbindungsdomäne (LBD) des Estrogenrezeptors (ER) am C-Terminus der Cre-Rekombinase (Brocard et al., 1997; Feil et al., 1996; Metzger et al., 1995; Schwenk et al., 1998).

Dabei wird das Fusionsprotein im Zytosol an zwei Moleküle des Hitzeschockproteins HSP90 gebunden und der Transport in den Zellkern - dem Ort der Rekombination - verhindert. Erst nach Applikation und Bindung eines adäquaten Liganden (Tamoxifen) an das Fusionsprotein wird HSP90 freigesetzt und das Fusionsprotein kann in den Zellkern transportiert werden (Abb. 2).

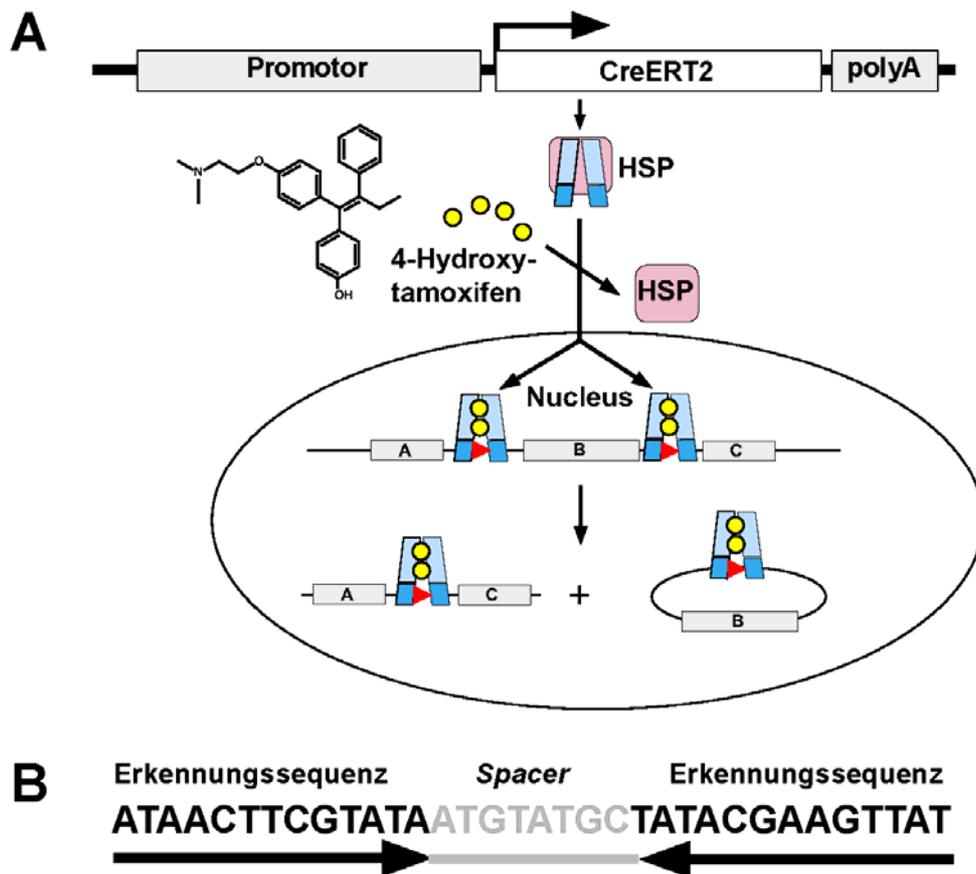


Abb. 2: Mechanismus der tamoxifeninduzierbaren Rekombination. A: Das Fusionsprotein aus der Cre-Rekombinase und der mutierten Ligandenbindungsdomäne des humanen Estrogenrezeptors wird unter einem zelltypspezifischen Promotor exprimiert. Das Fusionsprotein verbleibt gebunden an HSP90 im Zytosol. Nach Bindung von 4-Hydroxytamoxifen wird der Komplex freigesetzt und in den Zellkern eintransportiert. Dort binden jeweils zwei Moleküle an die 13 bp langen Erkennungssequenzen (B). Bei gleicher Orientierung dieser Erkennungssequenzen wird der dazwischenliegende DNA-Bereich als zirkuläres Fragment ausgeschnitten und von der Zelle schnell abgebaut.

Es existieren drei verschiedene Tamoxifen induzierbare Varianten der Cre-Rekombinase:

- murines ERTM mit G525R Mutation (Danielian et al., 1998; Guo et al., 2002; Hayashi und McMahon, 2002; Zirlinger et al., 2002)
- humanes ERT mit G521R Mutation (Feil et al., 1996; Li et al., 2000; Logie und Stewart, 1995; Metzger et al., 1995; Vooijs et al., 2001)
- humanes ERT2 mit G400V/M543A/L544A Mutation (el Marjou et al., 2004; Feil et al., 1997; Imai et al., 2001; Indra et al., 1999; Kimmel et al., 2000; Seibler et al., 2003)

Alle Varianten sind insensitiv gegen endogenes 17β -Estrogen, sprechen aber auf den synthetischen Estrogenagonisten 4-Hydroxytamoxifen (OHT) an. Allerdings wird den Tieren zur Induktion statt OHT Tamoxifen verabreicht, da dieses preiswerter ist. In der Leber wird Tamoxifen unter anderem auch in die wesentlich aktiveren Formen N-Desmethyltamoxifen und OHT umgewandelt. Bei Verwendung des CAG Promotors (Hühnchen β -Actin Promotor mit *Enhancer*-Sequenzen des Zytomegalievirus (Niwa et al., 1991) zur Expression des CreERT2 in Embryos kann in vielen Zelltypen 15 h nach Tamoxifen-Injektion bereits Rekombination nachgewiesen werden. Das Maximum der Rekombinationsereignisse erfolgt nach 48 h (Hayashi und McMahon, 2002). CreERT2 ist sowohl bei der nukleären Translokation wie auch bei der Rekombinaseaktivität um das Zehnfache sensitiver gegen OHT als CreERT (Indra et al., 1999).

Der ligandenregulierte Schalter der Rekombinaseaktivität kann in zwei prototypischen Weisen verwendet werden: 1. Bei der Expression der Rekombinase unter einem ubiquitären Promotor kann durch die CreER-Fusionsproteine eine zeitliche Kontrolle erreicht werden (Guo et al., 2002; Hayashi und McMahon, 2002; Seibler et al., 2003). 2. Eine zeitliche und räumliche Kontrolle der Rekombinaseaktivität wird durch die Expression der CreER-Fusionsproteine unter einem zelltypspezifischen Promotor erreicht (Danielian et al., 1998; Logie und Stewart, 1995; Schwenk et al., 1998).

Weitere Technologien zur Induzierbarkeit der Rekombinaseaktivität durch Fusionsproteine mit mutierten Ligandenbindungsdomänen zytosolischer Hormonrezeptoren wurden entwickelt, wie der Ligandenbindungsdomäne des Progesteronrezeptors (Brocard et al., 1998; Kellendonk et al., 1996) oder des Glukokortikoidrezeptors (Brocard et al., 1998) und erfolgreich in transgenen Mäusen eingesetzt (Kellendonk et al., 1999; Kitayama et al.,

2001; Tsujita et al., 1999). Inzwischen werden auch andere Rekombinasen, wie z. B. Flp Rekombinase aus *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*, als ligandenregulierte Formen in transgenen Mäusen verwendet (Hunter et al., 2005). Zur Zeit jedoch ist das am besten charakterisierte und am häufigsten verwendete System das CreERT2-System (Garcia-Otin und Guillou, 2006).