

6. Diskussion

6.1. Transgene Mauslinien mit zytosolischer Expression fluoreszenter Proteine

In der vorliegenden Arbeit wurden transgene Mäuse mit Expression von fluoreszenten Proteinen in Astrozyten und Oligodendrozyten generiert. Es wurde ECFP als Variante des Quallenproteins AvGFP sowie AmCyan1 und AsRed2 aus der Familie der fluoreszenten Proteine aus riffbildenden Korallen (RCFPs) verwendet. Diese spektral deutlich von den viel verwendeten FPs EGFP und EYFP sowie von den wichtigen grünen Calcium-Indikatoren (Oregon Green 488 BAPTA, Fura2 u.a.) distinkten FPs wurden eingesetzt, um in Kombination mit diesen Farbstoffen Doppelmarkierungen durchführen zu können. Die Liste der transgenen Organismen mit Fluoreszenzmarkierung ist sehr umfangreich, angefangen von ubiquitär GFP-exprimierenden Mäusen (Okabe et al., 1997) bis hin zur zelltypspezifischen Expression von GFP-Fusionsproteinen, zum Beispiel Tau-GFP (Rodriguez et al., 1999). Astrozyten (Nolte et al., 2001), Oligodendrozyten (Belachew et al., 2001; Fuss et al., 2000) und Neurone (Feng et al., 2000; Zeilhofer et al., 2005) wurden transgen durch Expression von (E)GFP markiert. Im Gegensatz zur weitverbreiteten und vielseitigen Verwendung von EGFP als Reporterprotein in transgenen Mauslinien (Hadjantonakis et al., 2003; Hadjantonakis und Nagy, 2001) gibt es nur wenige Veröffentlichungen, die eine transgene Expression von ECFP (Feng et al., 2000) oder RCFPs (Hadjantonakis et al., 2003) beschreiben. Um eine spezifische Expression der FPs in Astrozyten und Oligodendrozyten zu erreichen, wurden das jeweilige FP-Gen unter die Kontrolle von 2,2 kb genomischer Sequenz des astrozytenspezifischen humanen GFAP-Promotors (Brenner et al., 1994) bzw. unter regulatorische Sequenzen des weitgehend oligodendrozytenspezifischen murinen PLP-Gens (Fuss et al., 2000; Wight et al., 1993) gestellt. In den analysierten Mauslinien folgt die FP-Expression weitgehend dem bereits bekannten und detailliert beschriebenen Expressionsprofil (Belachew et al., 2001; Brenner et al., 1994; Fuss et al., 2000; Nolte et al., 2001). Im ZNS dieser Tiere können fluoreszent markierte reife Gliazellen klar anhand ihrer Lokalisation und anhand von immunhistochemischen Anfärbungen mit Antikörpern gegen zelltypspezifische Markerproteine identifiziert werden. Die Ergebnisse der hier generierten Mauslinien wurden mit weiteren, im Labor vorhandenen Mauslinien mit zelltyp-

spezifischer Expression von FPs verglichen (TgN(Thy1.2-HcRed); TgN(mPLP-DsRed1); TgN(hGFAP-mRFP); TgN(hGFAP-EGFP)).

Die Expression von FPs interferiert nicht mit den physiologischen Eigenschaften der neuronalen Zellen. Die elektrophysiologische Analyse von DsRed1-exprimierenden Oligodendrozyten, HcRed1-exprimierenden Neuronen und EGFP-, mRFP- oder AmCyan1-exprimierenden Astrozyten konnte zeigen, dass es keinen Unterschied zu Wildtypzellen gab (Fuss et al., 2000; Hirrlinger et al., 2005; Nolte et al., 2001). Es kann davon ausgegangen werden, dass die physiologischen Eigenschaften auch bei den hier vorgestellten, nicht elektrophysiologisch analysierten Linien nicht verändert ist.

6.1.1. Das Expressionsmuster von FPs in neuronalen Zellen variiert

Es zeigte sich eine deutliche Variabilität im Expressionsmuster der astroglialen transgenen Linien. Sie zeigen eine kräftige Expression von FP in caudalen Hirnarealen wie Cerebellum, Hirnstamm, Mittelhirn und Thalamus. Im Rückenmark sind reichlich fluoreszente Zellen zu erkennen. Dieses Expressionsmuster spiegelt im Wesentlichen die endogene Expression von GFAP in adulten Tieren wider (Abb. 32). Die Areale im Vorderhirn wie Cortex, Hippocampus und Striatum sind nur wenig fluoreszent. Die mosaikartige (nicht in allen Astrozyten auftretende), nicht mit dem Expressionsmuster (GFAP-positive Zellen exprimieren das Transgen nicht) des endogenen Gens übereinstimmende Expression des Transgens kann auf die verwendete Methode zur Generierung transgener Tiere und ihre Limitationen zurückgeführt werden: 1) Es wurde nur ein 2,2 kb grosses Fragment des hGFAP-Promotors verwendet, das mit grosser Wahrscheinlichkeit nicht alle regulatorischen Elemente des Gens enthält, denn Säugetiergene beinhalten komplexe Anordnungen von spezifischen DNA-Sequenzen, die sich aus Kernpromotorelementen und sehr unterschiedlichen genspezifischen stark die Expression stimulierenden DNA-Elementen (*Enhancer*) zusammensetzen, die gemeinsam das spezifische Expressionsmuster definieren (Dyran, 1989). Zusätzlich wurde der humane GFAP-Promotor verwendet, dessen Regulation in der Maus nicht mit dem endogenen Mausgen übereinstimmt, da im Menschen die radiale Glia GFAP-positiv ist. 2) Bei der verwendeten Methode der Pronukleusinjektion integriert die DNA zufällig in das Wirtsgenom. Daher kann die transgene Expression unter die Kontrolle von *cis*-aktivierenden regulatorischen Elementen kommen, die den Integrationsort des Transgens in das Genom (Caroni, 1997) umgeben. So kann die

Expression des Transgens durch inhibitorische Einflüsse in der Nähe der Integrationsstelle (*Silencer*; Insertion in Heterochromatin) verhindert oder stark gemindert werden (Clark et al., 1994). Dies kann bei den meisten potentiellen Stammtieren, die in der vorliegenden Arbeit analysiert wurden, vermutet werden. In diesen Tieren konnte keine Expression nachgewiesen werden, obwohl die Transgen-DNA im Genom integriert war. Umgekehrt kann das Transgen unter die Kontrolle von *Enhancern* kommen und so ektopisch aktiviert werden. Im Gegensatz zum *Knock-in*-Ansatz liefern die Promotoren, die in Transgenkonstrukten verwendet werden, häufig nicht das gleiche Expressionsmuster wie der endogene Promotor, sondern je nach transgener Linie und damit je nach Integrationsort im Genom völlig unterschiedliche Expressionsmuster. Das ist zum Beispiel für den Thy1.2-Promotor nachgewiesen worden (Feng et al., 2000). Daher müssen mehrere, teilweise sehr viele transgene Linien analysiert werden, um eine Linie mit dem gewünschten Expressionsmuster zu etablieren. Um dieses Problem zu vermindern, könnten chromatinorganisierende Elemente, wie *Locus control regions* (LCR) oder *Matrix/Scaffold attachment regions* (MAR/SAR), sogenannte Insulatoren, einbezogen werden, die die Positionseffekte verringern können, indem sie offene Chromatinstrukturen um das Transgen bilden. Allerdings führen auch diese zusätzlichen DNA-Sequenzen nicht immer zum gewünschten Erfolg (Rulicke und Hubscher, 2000).

Der PLP-Promotor ist als ein sehr starker Promotor bekannt. Trotzdem ist in beiden analysierten oligodendroglialen transgenen Linien die ECFP-Fluoreszenz nach PFA-Fixierung zu schwach, um sie ohne Verstärkung durch Immunodetektion zu visualisieren. Dies steht im Gegensatz zu anderen PLP-transgenen Linien, die eine starke FP-Fluoreszenz in Oligodendrozyten zeigen (Fuss et al., 2000; Hirrlinger et al., 2005), und kann auch nicht ausschliesslich durch die niedrige Quantenausbeute des ECFPs erklärt werden, da in der Linie TgN(hGFAP-ECFP) die ECFP-Fluoreszenz deutlich zu detektieren war. Im ZNS fängt die Expression von endogenem PLP am Postnataltag 1 im Hirnstamm an und setzt sich dann nach frontal fort (Fuss et al., 2000). Dies ist auch für das FP zu beobachten. Die Transkriptionsrate des PLP-Gens sinkt nach dem Postnataltag 25 wieder, trotzdem bleibt der Grad der mRNA weiterhin hoch, was durch das Vorhandensein von putativen mRNA-stabilisierenden Elementen in der 3'-untranslatierten Region erklärt werden könnte (Fuss et al., 2000; Wight et al., 1993). In den hier beschriebenen PLP-transgenen Linien kann es zu einer ungünstigen Integration der Transgen-

DNA gekommen sein. Dadurch könnte es zu einem Absinken des mRNA-Grades des Transgens durch eine Destabilisierung der mRNA aufgrund von Mechanismen kommen, die die mRNA-stabilisierenden Elemente herabregulieren oder ausschalten. Weiterhin könnte ein genomisches Polyadenylierungssignal an der Integrationsstelle mRNA-destabilisierende Elemente enthalten und zu einer schnellen Degradation der mRNA führen. Diese Mechanismen sind mögliche Ursachen der sehr schwachen Fluoreszenzintensität im Vergleich zu den schon beschriebenen Linien (Fuss et al., 2000; Hirrlinger et al., 2005) und auch zur astroglialen Linie TgN(hGFAP-ECFP). Dabei war die ECFP-Fluoreszenz in der Linie PCFP stärker als in der Linie PCFQ, in ihr konnten nach Verstärkung auch feine Fortsätze visualisiert werden. In beiden Linien konnten nach immunhistochemischen Anfärbungen mit Antikörpern gegen GFP markierte Zellen in allen wichtigen Hirnarealen wie Cerebellum, Cortex und Hippocampus gefunden werden.

Die Linie PCFP zeigte eine ektopische Expression von ECFP in cerebellaren Purkinje-Neuronen. Eine solche ektopische Expression in Purkinje-Neuronen wurde bereits bei anderen Linien beschrieben, die unter Verwendung des hier verwendeten Promotors hergestellt wurden (Anke Schardt, persönliche Mitteilung). Daher muss angenommen werden, dass die regulatorischen DNA-Elemente dieses Konstruktes bei ungünstigen Insertionsstellen im Genom nicht immer sicher zu einer ausschliesslichen Expression in Oligodendrozyten führen und der Promotor gerade im Hinblick auf die Expression in Purkinje-Neuronen sensibel auf die genomische Integrationsstelle reagiert.

Die integrierte Transgen-DNA kann auch mutagene Effekte haben, da das Gen in der Integrationsstelle zerstört oder verändert werden kann (Baum und Fehse, 2003). Dies kann einerseits zu letalen Defekten führen, andererseits zu falsch interpretierten Phänotypen, da der beobachtete Phänotyp auf das exprimierte Transgen zurückgeführt wird, obwohl es sich in Wahrheit um den Phänotyp der Insertionsmutation handelt. Daher sollten beim Auftreten von phänotypischen Veränderungen immer mehrere transgene Linien verglichen werden, um zu verifizieren, dass es sich nicht um ein Integrationsartefakt handelt. Das ist weniger notwendig bei Reporterexpression, die keinen Einfluss auf den Phänotypen haben sollten. Auch sollten heterozygot verpaarte Tiere mit homozygoten verglichen werden, da viele transgene Effekte erst bei homozygoten Tieren auftreten. Es wurden im Rahmen dieser Arbeit bei keiner

analysierten Mauslinie (mit Ausnahme des Stammtiers TgN(hGFAP-AsRed2)-GREL) auffällig veränderte Phänotypen gefunden, auch bei Verpaarungen, die potentiell homozygote Tiere hervorbringen können. Die Tiere waren allesamt lebensfähig, züchteten normal und zeigten keine Verhaltensauffälligkeiten oder phänotypische Veränderungen im Vergleich zu Wildtyptieren. Daher kann man davon ausgehen, dass die Integration der Transgen-DNA keine wichtigen genomischen Sequenzen zerstört hat und nicht mit der endogenen Expression von Genen interferiert. Die Anzahl der integrierten Kopien hat auch einen Einfluss auf die Menge der Transskripte und damit der Proteinmenge. Dies ist in den hier charakterisierten Mauslinien allerdings unerheblich, da nur Reporterproteine oder CreERT2, bei dem wenige Proteinmoleküle ausreichen sollten, transgen exprimiert wurden. Der Grad der Überexpression spielt dabei keine wesentliche Rolle.

Der genetische Hintergrund kann einen grossen Einfluss auf den Expressionsgrad und das Expressionsmuster haben (Opsahl et al., 2002). So konnte gezeigt werden, dass der Expressionsgrad von EGFP in Astrozyten bei einer Rückkreuzung der TgN(hGFAP-EGFP) (Nolte et al., 2001) vom FVB/N- in den C57/BL6-Hintergrund wesentlich geringer ist (F. Kirchhoff, persönliche Mitteilung). Auch bei der Linie TgN(hGFAP-EGFP)-GCFD konnte eine Veränderung im Expressionsmuster festgestellt werden. Die Zahl der fluoreszenten Astrozyten im Bulbus olfactorius hat nach einer Rückkreuzung aus dem FVB/N-Hintergrund über mehr als fünf Generationen in den C57/BL6-Hintergrund deutlich zugenommen (Daten nicht gezeigt).

6.1.2. RCFPs bilden Aggregate bei transgener Expression in neuronalen Zellen

Transgen exprimierte RCFPs bilden fluoreszente Aggregate, deren Anzahl mit steigendem Alter der Tiere deutlich zunahm. Die im Rahmen dieser Arbeit generierten Mauslinien mit transgener Expression von spektral unterschiedlichen RCFPs in Astrozyten wurden mit anderen transgen RCFPs in neuronalen Zellen wie Neuronen, Astrozyten und Oligodendrozyten exprimierenden Mauslinien verglichen. Fluoreszente Ablagerungen wurden bei der transgenen Expression aller untersuchten RCFPs (AmCyan1, AsRed2, HcRed1, DsRed1 und mRFP1) gefunden, und zwar sowohl im Soma wie auch in den Fortsätzen der Zellen, wobei jedoch nicht in allen Zellpopulationen eines Zelltypus eine vergleichbar starke Aggregatbildung beobachtet wurde. Durch die Eigenschaft der

RCFPs, fluoreszente Aggregate zu bilden, wird eine morphologische Analyse der Zellstruktur erschwert, bzw. verhindert. Die Aggregate der RCFPs zeigen ein identisches Emissionsspektrum wie das lösliche Protein. Daher kann ausgeschlossen werden, dass aggregierte RCFPs durch Oxidationen oder andere Modifikationen in ihrer chemischen Struktur stark verändert wurden. Die Fähigkeit zur Aggregation scheint eine intrinsische Eigenschaft der Proteinfamilie der RCFPs zu sein, da transgene Mauslinien mit Expression von fluoreszenten Proteinen aus Hydrozoa keine fluoreszenten Aggregate bilden (vorliegende Arbeit und Feng et al., 2000; Mallon et al., 2002; Nolte et al., 2001). Diese Aggregationsfähigkeit ist unabhängig von der Oligomerisation der RCFPs, die normalerweise als Tetramere oder Dimere (Matz et al., 1999) vorliegen, da die Verwendung der monomeren DsRed-Variante mRFP1 (Campbell et al., 2002) ebenfalls zur Ausbildung von fluoreszenten Partikeln führt.

Die Ablagerung von RCFP-Proteinen ist ein zeitabhängiger Prozess. Transient transfizierte Zellen in Kultur (Zelllinien sowie primäre Zellen wie Astrogliazellen) zeigen keine Aggregatbildung. Primäre Zellkulturen aus transgenen Mäusen hingegen weisen eine starke Aggregatbildung auf (Daten nicht gezeigt). Die Proteine werden nach Transfektion nur für eine kurze Zeitdauer (ca. 48 h) exprimiert. Die Expression über einen längeren Zeitraum in transgenen Tieren oder in primären Zellkulturen aus transgenen Tieren wird begleitet von einer ausgedehnten Ablagerung von RCFPs. Zusätzlich wurden in jungen Tieren wesentlich weniger Aggregate als in älteren Tieren gefunden. Daraus kann geschlossen werden, dass eine kontinuierliche Akkumulation der Proteine innerhalb einer Zelle zu einer konzentrations- und zeitabhängigen Präzipitation der RCFPs führt. Präzipitationsprozesse von Proteinen in unlösliche intrazelluläre Komplexe wurden im Zusammenhang von Krankheiten, die mit Ablagerung von Proteinaggregaten im Gehirn einhergehen (Alzheimer'sche Erkrankung, Parkinson'sche Erkrankung, spinocerebrale Ataxien, amyotrophe Lateralsklerose, Prionenerkrankungen), eingehend untersucht (Horwich, 2002). Die Bildung krankheitsbedingter Aggregate sind spezifische Eigenschaften der beteiligten Proteine oder ihrer während der Präzipitation geformten Intermediate (Agorogiannis et al., 2004). Es wird angenommen, dass Proteine aggregieren, indem sie unspezifisch koagulieren, solange die Polypeptidketten noch nicht oder erst teilweise gefaltet sind, denn zu diesem Zeitpunkt exponieren sie hydrophobe Oberflächen, die miteinander interagieren können. Es wurde der

Mechanismus der keimabhängigen Polymerisation von amyloiden Proteinen postuliert (Jarrett und Lansbury, Jr., 1993). In diesem Aggregationmodell ist der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der Aggregation die Bildung eines Kristallisationskeimes in der sogenannten *lag*-Phase der Polymerisation. Die *lag*-Phase ist abhängig von der Konzentration und kann durch Zugabe exogener Kristallisationskeime übersprungen werden. Weitere Monomere können schnell angelagert werden (exponentielle Wachstumsphase), der Prozess endet in einer Sättigungsphase. Bei kurzandauernder Expression von RCFPs, wie bei transienten Transfektionen, können keine fluoreszenten Aggregate gefunden werden. Sehr wahrscheinlich sind diese Experimente (24 - 48 h) im Zeitrahmen der *lag*-Phase.

In Zellen können mehrere Faktoren die Proteinaggregation beeinflussen, wie zum Beispiel die Proteinsynthese, molekulare Chaperone, Proteasen und posttranslationale Modifikationen wie Glykolisierungen von Proteinen (Minton, 2001). Aber auch die Proteinkonzentration spielt eine entscheidende Rolle bei der Zeitdauer der *lag*-Phase. Die RCFPs werden in den in der vorliegenden Arbeit untersuchten Mäusen unter der Kontrolle von starken Promotoren exprimiert. Die Proteinkonzentration in der Zelle sollte daher hoch sein, was eine Aggregation begünstigen würde. Allerdings ist die Ausbildung von fluoreszenten Proteinaggregaten verschieden in unterschiedlichen Zellpopulationen. So kann in cerebellären Purkinje-Neuronen in TgN(Thy1.2-HcRed)-Mäusen eine starke Aggregatbildung beobachtet werden, während Neurone im Cortex weniger betroffen sind. Die Ursache für diese Unterschiede kann ein unterschiedlicher Expressionsgrad von Zellpopulation zu Zellpopulation, sowie unterschiedliche Ausstattung mit Chaperonen oder Proteasen sein.

RCFPs wurden bisher hauptsächlich dazu verwendet, transgene Pflanzen (Jach et al., 2001; Wenck et al., 2003), Invertebraten (Verkhusha et al., 2001) oder niedrige Vertebraten (Finley et al., 2001; Zhu und Zon, 2004) zu generieren. Einige Studien beschreiben die erfolgreiche Generierung von transgenen Tieren mit Expression von RCFPs, zum Beispiel Ratten mit DsRed2-Expression in der Leber (Sato et al., 2003) oder Mäuse mit DsRed1-Expression in verschiedenen Geweben, die aus glatter Muskulatur bestehen (Magness et al., 2004). Vor kurzem wurden transgene Mauslinien mit ubiquitärer Expression von mRFP1 beschrieben (Long et al., 2005; Zhu et al., 2005). Leider zeigen die Autoren dieser Studien keine hochauflösenden Bilder, die eine detaillierte Beurteilung auf

der zellulären und subzellulären Ebene ermöglichen. Somit kann nicht beurteilt werden, ob auch in diesen Tieren eine Bildung von fluoreszenten Aggregaten vorkommt. Die transgene Expression von RCFPs im Nervensystem wurde bisher nur in zwei Studien gezeigt: DsRed1 wurde unter dem Thy1.2-Promotor in verschiedenen Typen von Neuronen exprimiert (Feng et al., 2000) und DsRed2 in katecholaminergen Neuronen der Retina und der Substantia nigra unter dem Tyrosinhydroxylase-Promotor (Zhang et al., 2004a). Auch von den Abbildungen dieser Studien kann nicht beurteilt werden, ob sich in den Zellen Aggregate der RCFPs bilden. Andere Autoren berichten von schwerwiegenden Problemen bei der Herstellung von transgenen Mauslinien mit DsRed1 (Hadjantonakis et al., 2002). Die Autoren spekulieren darüber, dass die Tetramerisierung und eine nachfolgende zellschädigende intrazelluläre Bildung von Proteinaggregaten die Ursache sei. Bei Verwendung des Cre/LoxP-Systems kann die problematische Expression während der Embryonalentwicklung umgangen werden (Vintersten et al., 2004). Der humane GFAP-Promotor ist ab dem Embryonaltag 11 in radialen Gliazellen aktiv, die eine vitale neurale Vorläuferzellpopulation während der Embryonalentwicklung repräsentieren (Malatesta et al., 2003). In den hier vorgestellten Mauslinien konnte trotz dieser frühen Aktivierung keine Beeinträchtigung der Hirndifferenzierung oder der Entwicklung nachgewiesen werden.

Die Ausbildung von Proteinaggregaten gilt bei vielen neurodegenerativen Erkrankungen als die Hauptursache (Ross und Poirier, 2004; Shastry, 2003; Taylor et al., 2002). Ob die Bildung von Aggregaten die Ursache oder eine Folge der Neurodegeneration ist, wird noch immer kontrovers diskutiert. Die RCFP-Aggregate scheinen die normale Lebensdauer der transgenen Mäuse weder zu verkürzen, noch zeigen diese Tiere ein geändertes Zuchtverhalten (mit Ausnahme des Stamtieres TgN(hGFAP-AsRed2)-GREL, bei dem eine unvorteilhafte Integrationsstelle des Transgens oder andere Ursachen wie Tumore nicht ausgeschlossen werden können). Bei Untersuchung der anderen Tiere konnten keine auffälligen Verhaltensweisen beobachtet werden. Daher scheinen die fluoreszenten Proteinaggregate nicht toxisch zu sein. Am Beispiel des Huntingtins, das bei Chorea Huntington mutiert ist und intrazellulär abgelagert wird, konnte gezeigt werden, dass nicht die Aggregation, sondern die nukleäre Lokalisation zum Zelltod von Neuronen in Zellkultur führt (Saudou et al., 1998). Die Bildung von Proteinaggregaten könnte daher auch als ein Mechanismus zum Schutz der Zelle zu sehen sein, der

die Anhäufung eines toxischen Proteins als aktives Monomer verhindert, wenn die Proteinabbaumechanismen nicht mehr effektiv genug arbeiten können. Auch in diesem Fall scheinen also intrazytosolische Proteinaggregate nicht *per se* toxisch zu sein (Saudou et al., 1998).

Rot fluoreszente Proteine wurden bisher nur aus Anthozoa gewonnen. Auch die durch gerichtete Mutagenese hergestellte monomere DsRed-Variante mRFP1 (Campbell et al., 2002) bildet in transgenen Tieren Aggregate und ist daher zur Analyse von morphologischen Interaktionen ungeeignet. Das von Evrogen vertriebene JellyRed (Evrogen, Moskau, Russland) ist das erste rot fluoreszente Protein, das aus Hydromedusen stammt. Es wurde durch gerichtete Mutagenese aus einem fluoreszenten Protein generiert, das ursprünglich aus einer nicht vollständig identifizierten Anthomeduse, Klasse Hydroida, isoliert wurde (Shagin et al., 2004). Es liegt wie alle GFP-ähnlichen Proteine aus Hydromedusen als Monomer vor. Um den Spektralbereich von nichtaggregierenden FPs um rot zu erweitern, könnte dieses neue FP (Ext. 584 nm, Em. 610 nm) eingesetzt werden. Die Klonierung des Transgenkonstruktes und erste Pronukleusinjektionen mit diesem FP wurden bereits durchgeführt.

6.2. Transgene Mauslinien mit CreERT2-Expression in Astrozyten

Gene werden häufig zelltypspezifisch mit Hilfe des Cre/LoxP-Systems ausgeschaltet. Allerdings ist der hier verwendete GFAP-Promotor (Brenner et al., 1994) auch in neuralen Vorläuferzellen, den radialen Gliazellen ab dem Embryonaltag 13,5 aktiv (Zhuo et al., 2001), sodass bei konstitutiver Expression der Cre-Rekombinase auch Neurone und Oligodendrozyten rekombinieren (Casper und McCarthy, 2006; Garcia et al., 2004; Malatesta et al., 2003). Daher wurde eine bereits erfolgreich eingesetzte (Leone et al., 2003) induzierbare Variante der Cre-Rekombinase (CreERT2, (Feil et al., 1997)) verwendet, um diese transgen in Astrozyten unter der Kontrolle des hGFAP-Promotors zu exprimieren. Es wurden zwei funktionell ausschliesslich in Astrozyten exprimierende Linien TgN(hGFAP-CreERT2) erhalten, von denen eine (GCTF) umfangreich charakterisiert wurde.

In doppeltransgenen Mäusen GCTF x R26-EYFP oder -LacZ konnte eine schnelle Induktion der Genrekombination festgestellt werden. Intraperitoneale Injektionen von Tamoxifen über fünf Tage reichen aus, um eine maximale Expression der Reportergene zu erreichen. Dies

stimmt mit den Daten, die für induzierbare oligodendrogliale Mauslinien publiziert wurden, überein (Doerflinger et al., 2003; Leone et al., 2003). Der Umfang der astroglialen Genrekombination war in verschiedenen Hirnregionen nicht identisch. In fast allen cerebellaren Bergmann-Gliazellen konnte die Expression des Reportergens nachgewiesen werden. Strukturen im Mittel- und Hinterhirn zeigten eine Rekombinationsrate von durchschnittlich etwa 50 %, während Vorderhirnstrukturen wie Cortex und Striatum eine Rekombinationsrate von nur etwa 20 – 30% aufwiesen. Dieses Expressionsmuster spiegelt prinzipiell den Grad der transgenen Expression des humanen GFAP-Promotors wider, der am aktivsten in Bergmann-Gliazellen ist und deutlich weniger aktiv im frontalen Neocortex (Nolte et al., 2001). Auch bei den in dieser Arbeit generierten Mauslinien mit astrozytärer Expression von FPs wie die TgN(hGFAP-AmCyan1) und TgN(hGFAP-ECFP) kann man dieses Expressionsmuster sehen (siehe Abschnitt 5.1. und (Hirrlinger et al., 2005; Nolte et al., 2001). Vergleicht man das Expressionsmuster des induzierten Reporters mit dem Expressionsmuster des endogenen GFAP im adulten Maushirn (Abb. 34 A), zeigen sich deutliche Ähnlichkeiten. Auch hier ist die Expression in Strukturen des Hinter- und Mittelhirns deutlich ausgeprägter als in frontalen Bereichen. Die beobachtete regionale Variabilität zeigt weiterhin die Heterogenität von Astrozyten in verschiedenen Hirnbereichen, die höchstwahrscheinlich ebenfalls eine funktionelle Diversität reflektiert (Grass et al., 2004; Matthias et al., 2003). Ausserdem unterstreicht dies ebenfalls den Bedarf an regulatorischen DNA-Elementen, die simultan die zelltyp- wie die regionspezifische Genexpression kontrollieren.

Auch in Jungtieren kann eine Genrekombination induziert werden. Früh postnatale Administration von Tamoxifen durch die Muttermilch verursacht eine deutliche Induktion der Reportergenexpression. In den Jungtieren wurde allerdings eine deutlich geringere Rekombinationsrate detektiert als in adulten Tieren, die direkt mit Tamoxifen injiziert wurden. Bei Injektion des laktierenden Muttertiers muss der Induktor den Metabolismus der Mutter überwinden, in die Muttermilch verteilt werden, aus dem Magen-Darm-Trakt der Jungtiere aufgenommen werden und dann durch die Blut-Hirn-Schranke in das Gehirn gelangen. Daher war die Konzentration an Tamoxifen, die letztendlich im Gehirn der Jungtiere vorhanden war, wahrscheinlich zu gering für eine vollständige Rekombination. Neben rekombinierten Astrozyten wurden auch einige rekombinierte Neurone im Gyrus dentatus nachgewiesen. Diese haben sich wahrscheinlich aus

einigen postnatal verbleibenden neurogenen radialen Gliazellen entwickelt (Seri et al., 2004).

Die nicht-homogene Verteilung der Rekombination in Astrozyten im gesamten Gehirn aufgrund der Verwendung des hGFAP-Promotors kann je nach Fragestellung sowohl Vorteile als auch Nachteile haben. So kann der geringe Grad an induzierbarer Rekombination im frontalen Cortex auch vorteilig sein, wenn spezifische Funktionen der Bergmann-Gliazellen des Kleinhirns untersucht werden sollen. Unspezifische Effekte durch Rekombination im Grosshirn werden so vermutlich weniger Auswirkungen auf den beobachteten Phänotyp haben. Ausserdem sind transgene Mäuse, bei denen der humane GFAP-Promotor verwendet wurde, hochsensibel gegen akute Läsionen im Gehirn (Nolte et al., 2001). So konnte eine deutliche tamoxifenabhängige Hochregulation der Reporter-genexpression nach einer corticalen Stichverletzung beobachtet werden. In corticalen Arealen, die abseits der eigentlichen Läsion lagen, wurde eine geringere Rekombination beobachtet. Die neue Mauslinie TgN(hGFAP-CreERT2) kann daher verwendet werden, um den funktionellen Beitrag von astroglialen Genen für Regenerationsprozesse im Gehirn zu untersuchen.

Die TgN(hGFAP-CreERT2)-Mauslinie ist hingegen jedoch weniger geeignet, Untersuchungen durchzuführen, in denen in möglichst allen Astrozyten eine Rekombination benötigt wird. Um eine Mauslinie zu generieren, die Astrozyten im gesamten Gehirn markiert, sollte laut der Immunhistochemiedaten, die das Expressionsmuster der endogenen Proteine in Wildtypmäusen zeigen, eher regulatorische DNA-Elemente des glialen Glutamattransporters GLUT1 verwendet werden. Dieses Gen ist in adulten Mäusen eher homogen in Astrozyten im Gehirn exprimiert (Gong et al., 2003). Um Integrationsartefakte möglichst gering zu halten, sollte dies in Kombination mit der in den letzten Jahren stark verfeinerten Methode der Pronukleusinjektion von Konstrukten mit auf dem F-Faktor basierenden *Bacterial artificial chromosomes* (BACs) (Antoch et al., 1997; Shizuya et al., 1992) durchgeführt werden, da diese eine positions-unabhängige und von der Kopienzahl unabhängige Expression versprechen. Mit dieser Methode können grosse, mehrere hundert Kilobasen lange genomische Fragmente, die alle notwendigen regulatorischen Elemente enthalten, kloniert werden (Heintz, 2001). Die schwierige, restriktionsbasierte Modifikation wurde durch Rekombinationstechniken in Bakterienzellen umgangen, wobei nur 50 bp lange Homo-

logiearme notwendig sind. Der Nachteil wiederum ist, dass der Umgang mit diesen sehr grossen, leicht zu scherenden Molekülen einen sehr vorsichtigen Umgang erfordert (Heintz, 2001). Ein BAC mit dem genomischen Locus von GLT1 ist verfügbar, somit könnten BAC-Transgene oder aber ein *Knock-in* in den GLT1-Locus hergestellt werden. GLT1-Protein ist allerdings in verschiedenen Populationen von Neuronen während der Hirnentwicklung im pränatalen Stadium exprimiert (Danbolt, 2001). Auch bei der Verwendung der regulatorischen Sequenzen von GLT1 sollte daher eine induzierbare Variante der Cre-Rekombinase verwendet werden, um eine neuronale Rekombination zu vermeiden.

Die Mauslinie TgN(hGFAP-CreERT2) wurde verwendet, um die GluRA oder GluRD-Untereinheit des AMPA-Rezeptors spezifisch in Astrozyten zu deletieren. Es konnte immunhistochemisch gezeigt werden, dass 14 Tage nach der letzten Tamoxifen-Injektion eine deutlich verringerte Expression dieser Proteine in Bergmann-Gliazellen vorliegt. In weiteren Experimenten wird es nun möglich sein, diesen astrozytenspezifischen *Knock-out* phänotypisch zu analysieren. Fortsätze von Astrozyten umhüllen Synapsen und leisten einen wichtigen Beitrag zur Signalverarbeitung an der *Tripartite*-Synapse (Araque et al., 1999). Daher können diese astrozytenspezifischen AMPA-Rezeptor *Knock-outs* verwendet werden, um den astroglialen Anteil der Signalprozessierung elektrophysiologisch, biochemisch und in Verhaltensexperimenten zu charakterisieren. Dafür bieten sich vor allem Lernparadigmen des Kleinhirns wie der konditionale Augenzwinkerreflex (De Zeeuw und Yeo, 2005) an, da die Penetranz der CreERT2-vermittelten DNA-Rekombination in Kleinhirn am grössten ist.

6.2.1. Die Problematik von Reporterlinien

Reporterlinien sind ein Werkzeug zur Überprüfung der Spezifität von transgenen Mauslinien, die die Cre-Rekombinase oder eine Variante dieser exprimieren, da sie verwendet werden können, um Cre-medierte Rekombinationsereignisse zu detektieren. In Reporterlinien für die Rekombination durch Cre-Rekombinase wird von einem konstitutiv aktiven Promotor ein Transgen exprimiert, das für ein Markerprotein (z.B. LacZ, EYFP) kodiert. Die Translation dieses Reporterproteins wird durch eine mit LoxP-Sequenzen flankierte DNA-Sequenz (die sogenannte STOP-Kassette, die auch für ein weiteres Reportergen kodieren kann) vor dem Markerprotein verhindert. Nach Rekombination durch die Cre-Rekombinase fehlt die STOP-Kassette, das Markerprotein wird exprimiert. Die ersten generierten Cre-Reporterlinien dieser Art basierten auf der

transgenen Expression des LacZ-Reportergens unter der Kontrolle des CMV-Promotors (Araki et al., 1995; St Onge et al., 1996), dem CAG-Promotor (zusammengesetzt aus dem β -Actin-Promotor aus Hühnern und dem CMV-IE *Enhancer*) (Akagi et al., 1997) oder dem Phosphoglyzeratkinase (PGK)-Promotor (Thorey et al., 1998). EGFP und seine Varianten werden ebenfalls häufig als transgene Reportergene verwendet (Kawamoto et al., 2000). Weiterhin sind über homologe Rekombination generierte Reporterlinien verfügbar, bei welchen die konstitutive Expression sowohl während der Embryonalentwicklung wie auch im adulten Tier gesichert sein sollte. Dafür wird häufig der ROSA26-Genlocus verwendet (Mao et al., 2001). Der ROSA26-Locus scheint aufgrund seiner Charakteristika als genomische Lokalisation für die Platzierung einer Reporter-kassette geeignet. Er ist in verschiedenen Stadien der Ontogenese zugänglich für Rekombinasen und sein Genprodukt wird in nahezu allen Geweben exprimiert (Mao et al., 2001; Soriano, 1999). Zudem zeigen homozygote Tiere keinerlei Auffälligkeiten, so dass angenommen wird, dass das Genprodukt im Organismus nur eine untergeordnete Aufgabe hat. Daher wurde dieser Genlocus für eine Reihe von Reporterlinien verwendet, wie die Cre-mediierte Expression von EYFP oder ECFP (Srinivas et al., 2001) oder Luciferase (Safran et al., 2003). Zweifache Reporterlinien wie die LacZ/EGFP- (Z/EG, Novak et al., 2000) oder die LacZ/AP (alkalische Phosphatase)-Mauslinie (Z/AP; Lobe et al., 1999) wurden entwickelt, bei denen ein Reporter vor und der andere nach der Cre-vermittelten Exzision aktiv ist (St Onge et al., 1996; Vintersten et al., 2004).

Die Studie von Srinivas und Kollegen beschreibt die in dieser Arbeit verwendete ROSA26-EYFP-Reportermauslinie (Srinivas et al., 2001). Die Autoren zeigen in dieser Arbeit ausschliesslich die embryonale Expression von EYFP nach Cre-mediiertes Aktivierung. Diese ist mit normaler Epifluoreszenzmikroskopie detektierbar (Srinivas et al., 2001). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit musste jedoch festgestellt werden, dass die Cre-mediierte EYFP-Expression im Gehirn von adulten Tieren so gering ist, dass sie mit Hilfe einer immunhistochemischen Färbung verstärkt werden muss, um überhaupt detektiert werden zu können. Um zu überprüfen, ob die geringe Fluoreszenzintensität eine Eigenschaft der astroglialen Expression ist, wurde die ROSA26-EYFP mit einer *Deleter*-Cre (Ella-Cre, führt zu einer Rekombination in der sehr frühen Embryonalentwicklung, so dass alle Zellen der Maus rekombiniert sein müssten; Lakso et al., 1992) verpaart und auf EYFP-Fluoreszenz im Gehirn untersucht. Es konnte in

nur sehr wenigen Gehirnbereichen EYFP-Fluoreszenz ohne Verstärkung durch Immunhistochemie detektiert werden (Daten nicht gezeigt). Daraus muss geschlossen werden, dass diese Mauslinie nicht den erwarteten Nutzen für die Analyse von Cre-exprimierenden Mauslinien für *in vivo*-Experimente bringt, da eine nichtinvasive Detektion des Reporterproteins nicht möglich ist. Allerdings lassen sich die Struktur und Morphologie der Zellen aufgrund der zytosolischen Expression von EYFP nach immunhistochemischer Färbung sehr exakt untersuchen. Das ist bei der Antikörperdetektion der β -Galaktosidase bei dieser Reporterlinie nicht möglich, da sie als punktförmiges Muster in den Zellen nachgewiesen wird (Funfschilling und Reichardt, 2002).

Reportermause mit konstitutiv aktiven Promotoren ermöglichen eine Analyse der Rekombination in vielen Zelltypen und Geweben. Jedoch sind auch „konstitutiv aktive“ Promotoren Ziel zelltypspezifischer Regulation. Daher muss eine fehlende Expression des Reportergens nicht zwangsläufig eine fehlende Rekombination in der Zielzelle bedeuten. Um dieses Problem zu umgehen, können Reportermause eingesetzt werden, bei denen das Reporter gen von einem zelltypspezifischen Promotor exprimiert wird. Im Falle der hier generierten Mauslinie TgN(hGFAP-CreERT2) könnte dafür zum Beispiel eine Mauslinie mit Expression des LacZ-Gens unter der Kontrolle des Connexin43-Promotors sein (Theis et al., 2001). Connexin43 ist ein astrozytenspezifisches *Gap junction*-Protein, das in (fast) allen Astrozyten exprimiert wird (Dermietzel et al., 1989). Während bei einer Analyse der Rekombination in Astrozyten mit Hilfe dieser Reportermaus eine höhere Rekombinationsrate als mit den hier verwendeten ROSA26-Reportermausen zu erwarten ist, kann jedoch eine ektopische Rekombination in anderen Zelltypen nicht detektiert werden. Eine weitere transgene astrozytenspezifische Reportermaus mit LoxP-flankiertem LacZ und EGFP als Reporter gen für die Rekombination wurde kürzlich von Casper und McCarthy veröffentlicht (Casper und McCarthy, 2006). Diese Gruppe verwendet unter anderem den humanen GFAP-Promotor (Brenner et al., 1994) und konnte zeigen, dass die am häufigsten verwendeten Reporterlinien (Akagi et al., 1997; Lobe et al., 1999; Soriano, 1999) ungeeignet sind, um eine vollständige astrozytenspezifische Rekombination zu detektieren. Es konnte mit diesen Reporterlinien nicht in allen Astrozyten, die Cre-Protein exprimieren, eine Rekombination nachgewiesen werden. Bei Verwendung einer neuen hGFAP-LacZflox-EGFP wurde eine weitaus grössere Rekombinationsrate

erreicht. Der ROSA26-Genlocus scheint daher für die Analyse einer astrozytenspezifischen Genrekombination weniger geeignet.

Reportermauslinien sind wichtige Werkzeuge zur Charakterisierung von Cre- oder Cre-Varianten exprimierenden Tieren. Jedoch können Beobachtungen, die in einer Reportermaus gemacht werden, nicht stillschweigend für ein anderes LoxP-flankiertes Gen angenommen werden, da die Chromatinstruktur und damit die Erreichbarkeit der Erkennungssequenzen für die Cre-Rekombinase unterschiedlich sein können. Die Genrekombination spiegelt nicht notwendigerweise den vollen Umfang der möglichen Rekombinationsrate wider (Casanova et al., 2002; Shimshek et al., 2002). Der Grad der Rekombination muss für jedes verwendete, LoxP-flankierte Gen neu ermittelt werden, zum Beispiel mit Hilfe einer immunhistochemischen Anfärbung mit Antikörpern gegen das Zielgen.

6.2.2. Vergleich des CreERT2-Systems mit anderen induzierbaren Systemen

Eine grosse Anzahl von induzierbaren Systemen wurden etabliert, um eine temporal kontrollierbare Expression von Transgenen *in vitro* und *in vivo* zu erreichen.

Eines der ersten Beispiele war ein System, welches die regulatorischen Elemente des Metallothionein-1-Promotors benutzte (Chalifour et al., 1990). Dieser Promotor wurde durch Bindung von Schwermetallen aktiviert. Der Nutzen dieses Systems war limitiert, da die Administration von Schwermetallen schwere Nebeneffekte hatte, vor allem in den hohen Dosen, die für die Aktivierung des Transgens notwendig waren.

Eine weitere Möglichkeit bot das Ektosteroidsystem (Graham, 2002; No et al., 1996). Hier wurde der Ekdysonezeptor N-terminal an die VpEcR fusioniert. Wurde dieser mit dem *Retinoic X* Rezeptor (RXR) koexprimiert, konnte Ekdysone oder das synthetische Analogon Muriston die Heterodimerisierung von VpEcR und RXR induzieren. Dieses Heterodimer konnte nun mit grosser Affinität an *Ecdysone response elements* des Zielpromotors binden und die Transkription der Zielgene stimulieren. Allerdings wurden für dieses System Tripeltransgene benötigt, deren Zucht aufwendig war.

Ein weiterer Ansatz wurde durch den Einsatz des Tetrazyklin-Transaktivators ermöglicht (Gossen und Bujard, 1992), welcher noch

immer *in vitro* und *in vivo* verwendet wird (Bockamp et al., 2002). In diesem System ist der Effektor ein transgenkodiertes Fusionsprotein bestehend aus der VP16-Transaktivierungsdomäne des HERPES SIMPLEX VIRUS (VpEcR) und dem Tetrazyklinrepressor aus *ESCHERICHIA COLI* (tetrazyklinaktivierter Transaktivator, tTA). Dieses Fusionsprotein bindet spezifisch an die 19 bp lange Operatorsequenz (TetO) des tet-Operons im Zieltransgen und induziert damit die Transkription des Zielgens. Das Fusionsprotein wird durch Bindung von Tetrazyklin oder der Variante Doxyzyklin an der Bindung und damit an der Aktivierung der Transkription gehindert („tet-off“). In einer weiteren Variante dieses Systems wird der reverse tetrazyklinaktivierte Transaktivator (rtTA) verwendet. Hier ermöglicht die Bindung des Induktors, also Doxyzyklin, erst die Bindung an TetO und damit die Aktivierung der Transkription des Zielgens („tet-on“). Der prinzipielle Unterschied beider Systeme ist die Kinetik der Induktion von Zielgenen. Beim rtTA-System kann die Gabe von Doxyzyklin in Stunden zu einer Induktion führen, beim tTA-System dauert die Reinduktion teilweise Wochen (Jerecic et al., 1999), da beim tTA-System die Induktion abhängig vom Abbau von Doxyzyklin ist. Bei hirnspezifischen Transgenen muss ebenfalls beachtet werden, dass Doxyzyklin die Blut-Hirn-Schranke nur schlecht passiert und das System daher für die Applikation im Gehirn weniger geeignet ist.

Bei all diesen Systemen ist auch eine Kombination mit dem Cre/LoxP-System möglich, um zusätzlich eine temporale Kontrolle der Rekombinaseaktivität zu erreichen. Dazu wird die Expression der Cre Rekombinase unter die Kontrolle des induzierbaren Promotors gestellt.

Die Fusion der Cre-Rekombinase mit der Ligandenbindungsdomäne von zytosolischen Hormonrezeptoren wurde in mehreren Ansätzen untersucht (Brocard et al., 1998; Metzger et al., 1995; Tsujita et al., 1999). Zur Zeit ist das CreERT2-System dasjenige mit der stringentesten posttranslationalen Kontrolle der nichtinduzierten Cre-Aktivität (Garcia-Otin und Guillou, 2006). Auch in der hier vorgestellten Linie zeigten Kontrolltiere, die Injektionen mit dem Lösungsmittel erhielten, keine histochemisch detektierbare β -Galaktosidaseaktivität. Bei Kontrolltieren mit EYFP als Reporter gen konnten nur sehr wenige, vereinzelte Zellen nachgewiesen werden, die eine nichtinduzierte Expression des Reporters zeigten. In genomischer DNA, die von tamoxifenbehandelten Tieren gewonnen wurde, konnte in allen getesteten Hirngeweben, nicht aber in Leber, eine Rekombination nachgewiesen werden. In Gewebe von mit Lösungsmittel

injizierten Tieren konnte das rekombinierte Allel nicht nachgewiesen werden. Die Effektivität des Systems ist abhängig von der Translokation von CreERT2-Protein vom Zytosol in den Nukleus. Inkubation von astrogliareichen Primärkulturen aus doppeltransgenen Mäusen TgN(hGFAP-CreERT2) x R26-EYFP mit OHT führte zu einer vollständigen Translokation in den Zellkern und einer deutlichen Expression des Reportergens. Nach Inkubation mit dem Lösungsmittel Ethanol konnte das CreERT2-Protein im Zytosol der Zellen detektiert werden. Das Reporterprotein EYFP war allenfalls als Hintergrund zu erkennen. Diese Daten aus der hier generierten TgN(hGFAP-CreERT2)-Maus bestätigen die gute Induzierbarkeit und stringente Kontrolle des CreERT2-Systems (Garcia-Otin und Guillou, 2006).

Die Liste der transgenen Mausmodelle mit tamoxifeninduzierbarer Genexpression im Gehirn ist bisher recht kurz. Es wurden tamoxifen-induzierbare Varianten in Neuronen verschiedener Hirnregionen wie dem Cortex, Hippocampus oder Thalamus exprimiert (Casanova et al., 2002; Kellendonk et al., 1999). Unter Verwendung des gleichen Systems wurden transgene Mauslinien hergestellt, die eine induzierbare Rekombination in myelinbildenden Zellen des ZNS und des PNS, den Oligodendrozyten und Schwannzellen, ermöglichen (Doerflinger et al., 2003; Leone et al., 2003). Diese Studien zeigen deutlich die Zuverlässigkeit und schnelle Kinetik der tamoxifeninduzierten Rekombination, ähnlich der hier generierten TgN(hGFAP-CreERT2)-Linie.