



Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg
Medizinische Fakultät Mannheim
Dissertations-Kurzfassung

Induzierbare, gewebsspezifische Gen-Deletion in serotonergen Neuronen von transgenen TPH2-CreER^{T2} Mäusen

Autor: Gerald Matthias Böhm
Institut / Klinik: Zentralinstitut für Seelische Gesundheit Mannheim (ZI)
Doktorvater: Prof. Dr. D. Bartsch

Die Analyse einzelner Gene in komplexen neuronalen Funktionseinheiten wie dem serotonergen System, welches mit einer Vielzahl neuropsychiatrischer Erkrankungen in Verbindung gebracht wird, macht konditionale Gendelektionen sowohl während unterschiedlicher Entwicklungsstadien als auch in ausgewachsenen Tieren wünschenswert. Dadurch können kompensatorische Effekte anderer Gene während der Embryogenese, durch den Knockout bedingte Entwicklungsstörungen oder embryonale Letalität ausgeschlossen werden und entscheidende Zeitfenster, in denen Kandidatengene während der Entwicklung zur Pathogenese von Krankheiten beitragen, identifiziert werden.

In dieser Arbeit wurden sechs Linien transgener Foundermäuse analysiert, die eine mittels Tamoxifen induzierbare Variante der Cre-Rekombinase (CreER^{T2}) unter der regulatorischen Kontrolle einer murinen Tph2-Gensequenz exprimieren. Um das Ausmaß der Cre-Expression sowie die ER^{T2}-vermittelte Kontrolle der Cre-Aktivität zu ermitteln, aber auch um die Gewebsspezifität und die Effizienz der Rekombination und deren Background-Aktivität zu bewerten, wurden die Founderlinien mit R26R-Cre-Reporterstämmen verpaart (R26R^{TPH2CreERT2}). Durch X-Gal-Färbung und Immunhistochemie konnte bei Tamoxifen-induzierten R26R^{TPH2CreERT2}-Mäusen aller sechs Founder-Linien Rekombination in den serotonergen Raphekernen des Hirnstamms und des Mittelhirns beobachtet werden, während in extraserotonergen Bereichen keine Rekombination detektiert werden konnte. Somit konnte die serotonerge Gewebsspezifität der sechs TPH2-CreER^{T2}-Linien bewiesen werden. Die Stärke der Cre-Expression der verschiedenen Linien stellte sich variabel dar, was wahrscheinlich auf eine unterschiedliche Kopienzahl des Transgens bei den sechs Foundern und ein gewisses Ausmaß an Positioneffekt-Variation (PEV) zurückzuführen ist. Dabei wurden fünf Linien mit Rekombinationseffizienzen von über 60% identifiziert, wobei die Linien 164-1.21, und -1.38 mit jeweils ca. 90% die höchsten Rekombinationsraten aufwiesen. In einem biologischen System ist prinzipiell davon auszugehen, dass eine Rekombinationseffizienz von 100% nicht erreicht werden kann, weshalb das TPH2-Konstrukt, welches die Gewebsexpression von CreER^{T2} sowohl quantitativ wie auch räumlich kontrolliert, gut für den konditionellen Knockout eines Zielgens geeignet zu sein scheint. R26R^{TPH2CreERT2}-Mäuse, die nicht mit Tamoxifen behandelt wurden, zeigten über alle Linien hinweg nur sehr geringe Hintergrund-Rekombinationsraten von weniger als 3%. Möglicherweise ist diese nicht-induzierte Cre-medierte Rekombination darauf zurückzuführen, dass ein gewisses Ausmaß an Proteolyse des Cre-ER^{T2}-Fusionsproteins mit anschließender konstitutioneller nukleärer Cre-Translokation in einigen wenigen Zellen stattgefunden hat.

Somit konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass mit der transgenen TPH2-CreER^{T2}-Linie eine Tamoxifen-induzierbare Cre-Line zur Verfügung steht, die eine gewebsspezifische, effiziente, serotonerge Rekombination von loxP-flankierten Genen mit sehr geringer Background-Rekombination ermöglicht.