

Ulrich Wolfgang Krüth
Dr. med.

Transgene Mäuse zur Identifikation von Gonadotropin-Releasing-Hormon produzierenden Neuronen im lebenden Hirngewebe und induzierte Regulation von Genen

Geboren am 13.12.1971 in Summit, NJ, USA
Reifeprüfung am 08.06.1991 in Königstein
Studiengang der Fachrichtung Medizin vom SS 1992 bis SS 2000
Physikum am 23.03.1994 an der Universität Heidelberg
Klinisches Studium in Heidelberg
Praktisches Jahr in Heidelberg und Bern
Staatsexamen am 25.05.2000 an der Universität Heidelberg

Promotionsfach: Biochemie
Doktorvater: Prof. Dr. med. H. Schirmer

Die ungefähr 1000 GnRH produzierenden Neurone des Hypothalamus bilden untereinander ein Netzwerk und kontrollieren über eine pulsatile GnRH-Ausschüttung in das hypothalamisch-hypophysäre Portalvenensystem die Steuerung der Sexualorgane durch die hypophysären Gonadotropine. Zu Beginn der pulsatilen GnRH-Ausschüttung während der Pubertät konnte ein Anstieg der Expression von NMDA-Rezeptoren, die zur Familie der Glutamatrezeptoren gehören, im Hypothalamus von Mäusen beobachtet werden. Zur Erforschung der Rolle von Glutamatrezeptoren bei der Entstehung der pulsatilen GnRH-Ausschüttung ist die Frage von Bedeutung, ob NMDA-Rezeptoren auf GnRH-Neuronen selbst oder nur auf benachbarten Interneuronen exprimiert werden. Mit Hilfe elektrophysiologischer Ableitungen an lebenden Neuronen unter Applikation von Rezeptoragonisten kann diese Frage beantwortet werden. Dazu bedarf es einer Markierung, um GnRH-Neurone von morphologisch gleichen Nachbarneuronen unterscheiden zu können. Immunhistochemische Färbungen kommen hierfür nicht in Frage, da sie die Fixierung des Gewebes voraussetzen. Zur Markierung von lebenden GnRH-Neuronen wurden transgene Mäuse mit den Reporter genen β -Galaktosidase, β -Lactamase bzw. GFP jeweils unter Kontrolle von 3,47 kb der GnRH-Promotorregion geschaffen. Die β -Galaktosidase-Aktivität kann in lebenden Zellen durch das fluoreszierende Substrat ImagenRed und im fixierten Gewebe mittels Farbumschlag des Substrates X-Gal nachgewiesen werden. Die β -Lactamase-Aktivität in lebenden Zellen verändert die emittierte Wellenlänge des Fluoreszenzfarbstoffes CCF2.

Zum Test des Fluoreszenzmarkers GFP als Reporterprotein von Neuronen wurde natives GFP in transgenen Mäusen zunächst unter Kontrolle des neuronenspezifischen Enhancers für das Thy1-Gen exprimiert. In diesen Mäusen konnte die GFP-Expression mittels In-situ-Hybridisierung und RT-PCR nachgewiesen werden, nicht jedoch durch Fluoreszenz von Neuronen im Gehirnschnitt unter dem Mikroskop. Die Kombination aus schwacher Expression durch den Thy1-Promotor und aus der Verwendung des nativen GFP mit relativ schlechten optischen Eigenschaften und Basentriplets, die für die Translationsmaschinerie der Säuger ungeeignet sind, könnte dafür verantwortlich sein. Als Konsequenz dieser Resultate wurde zur Detektion von GnRH-Neuronen hGFP verwendet, das verbesserte optische Eigenschaften aufweist und dessen Basentriplets an den Translationsapparat der Säugetiere angepaßt wurde.

Die Fluoreszenzsubstrate ImagenRed und CCF2 konnten in Zellkulturexperimenten Reporter gen exprimierende HEK293-Zellen selektiv markieren. In Hirnschnitten aus lebendem Gewebe von GnRHnlacZ bzw. GnRHnBla Mäusen gelang die Detektion von GnRH-Neuronen mit Hilfe dieser beiden Substrate jedoch nicht. Ursächlich hierfür könnten Schwierigkeiten beim Eindringen der Substrate in die in vielen Schichten angeordneten Zellen der Gehirnschnitte sein, sowie das Diffundieren von gespaltenem Substrat in die Umgebung positiver Zellen.

In GnRHnlacZ-Mäusen konnten GnRH-Neurone im fixierten Hirngewebe mittels X-Gal angefärbt werden. Nach Gegenfärbung mit Hilfe von GnRH-Antikörpern zeigte sich, daß neben dopplet positiven GnRH-Neuronen eine weitaus größere Neuronengruppe β -Galaktosidase exprimiert ohne

GnRH zu synthetisieren. Die doppelt positiven GnRH-Neuronen konzentrierten sich in der Area praeoptica und dem Diagonalen Brocaschen Band des Hypothalamus. Sie werden in diesen Regionen von den einfach β -Galaktosidase positiven Neuronen an Zahl allerdings übertroffen. Der weitaus größte Teil der einfach positiven Neurone ist jedoch in den Nuclei septales laterales des Hypothalamus lokalisiert, wo im adulten Tier kein GnRH-Peptid synthetisiert wird. In transgenen Mäusen einer anderen Arbeit, die β -Galaktosidase unter einem ähnlichen GnRH-Promotorfragment exprimieren, konnte in dieser Hirnregion während der Embryonalentwicklung jedoch GnRH-Peptid nachgewiesen werden. Folglich wird die GnRH-Synthese in einfach β -Galaktosidase positiven Neuronen adulter Mäuse möglicherweise posttranskriptionell unterdrückt, sodaß trotz aktivem GnRH-Promotor kein Peptid gebildet werden kann. Weiterhin besteht die Möglichkeit, daß ein restriktives Element des GnRH-Promotors im Transgen fehlt. Dadurch würde β -Galaktosidase fälschlicherweise in solchen Neuronen der GnRHlacZ-Mäusen exprimiert, deren GnRH-Gen im adulten Wildtypier normalerweise abgeschaltet ist.

In Hirnschnitten von GnRHhGFP-Mäusen konnten GnRH-Neuronen sowohl im lebenden als auch im fixierten Gewebe durch Fluoreszenz von hGFP identifiziert werden. Mittels elektrophysiologischer Ableitungen konnten NMDA-Rezeptoren auf der Oberfläche von GnRH-Neuronen nachgewiesen werden. Die Klärung ihrer Funktion beim Entstehen der rhythmischen GnRH-Ausschüttung bleibt zukünftigen Experimenten überlassen. In den GnRHhGFP-Mäusen konnte keine Neuronenpopulation nachgewiesen werden, die nur das Reporterprotein exprimiert, ohne GnRH zu synthetisieren. Umgekehrt wurde in vielen GnRH-Antikörper positiven Neuronen kein hGFP beobachtet. Diese Befunde stehen im Gegensatz zur Situation in den GnRHlacZ-Mäusen und könnten mit einer geringeren Detektionsempfindlichkeit von GFP gegenüber dem β -Galaktosidase-Nachweis durch X-Gal erklärt werden.

Zur kontrollierten Expression von Genen in GnRH-Neuronen wurden im zweiten Teil dieser Arbeit die beiden gängigen Systeme zur induzierten Genregulation, nämlich die Cre-Rekombinase mit Hormonbindungsdomäne für den Progesteronagonisten RU486 und das tTA-System aus reverssem Tetrazyklintransaktivator (rtTA) und dem Transaktivator abhängigen CMV-Minimalpromotor, miteinander kombiniert. Das Ziel hierbei war die Reduktion der Hintergrundaktivität bei Abwesenheit der Induktionsdrogen. Das Cre-Gen wird unter Kontrolle des rTA abhängigen Minimalpromotors gestellt, dessen Aktivität wiederum von der rTA-Expressionseinheit gesteuert wird. Bei Gabe von Doxycyclin und RU486 soll Cre aktiviert werden und am mit Cre spezifischen Erkennungssequenzen markierten Zielgen wirken. Durch Anordnung von rtTA, Minimalpromotor und Cre auf einem einzigen Stück DNS wurde eine Kassette zur Geninduktion geschaffen, die prinzipiell hinter jeden Promotor im Zellgenom gesetzt werden kann und damit in allen Zelltypen einsatzbereit sein soll. Zum Test wurde diese Kassette mittels Gen-Targeting hinter den Promotor des RNS-Editing-Enzymes ADAR2 im Genom der X3P-Zelllinie gesetzt. Diese Linie embryonaler Mausstammzellen enthält ein Transgen zum Nachweis von Cre-Rekombinase-Aktivität durch β -Galaktosidase-Expression. Der ADAR2-Promotor wurde gewählt, da er bereits in embryonalen Stammzellen aktiv ist. Die korrekte Insertion der rtTA-Cre-Kassette hinter den ADAR2-Promotor konnte durch Southern Blot-Analyse bewiesen werden. Mittels RT-PCR konnte der Nachweis von rtTA-Expression durch den ADAR2-Promotor erbracht werden. Trotzdem war keine ausreichende Cre-Aktivität nach Zugabe der beiden induzierenden Substanzen zu erreichen und der Hintergrund an Cre-Aktivität ohne Induktoren war vergleichsweise hoch. Die Ursache für die fehlende Funktion der rtTA-Cre-Kassette könnte in schwacher rtTA-Expression durch den ADAR2-Promotor zu suchen sein. Zudem liefern Experimente in den X3P-Zellen Hinweise auf schlechte Interaktion zwischen Transaktivator und dem Minimalpromotor der Kassette. Möglicherweise wird diese Interaktion durch den TK-Promotor des Neomycinresistenzgenes, das zur Insertion der Kassette ins Genom einer Zelle benötigt wird, negativ beeinflusst. Für den Erfolg zukünftiger Experimente sollte der Bauplan der rtTA-Cre-Kassette radikal verändert werden und es erhebt sich die Frage, ob Transaktivator und Minimalpromotor nicht besser auf getrennten DNS-Abschnitten in das Genom transgener Zellen eingebracht werden sollen.

