.

INAUGURAL-DISSERTATION

zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Naturwissenschaftlichen-Mathematischen Gesamtfakultät
der
Ruprecht-Karls-Universität
Heidelberg

vorgelegt von:

Diplom-Biologin Simone Freese

aus Mannheim

Tag der mündlichen Prüfung:

Doxycyclin-kontrollierte Genexpression im ROSA26-Lokus der Maus

Gutachter: Prof. Dr. Peter H. Seeburg
Prof. Dr. Christine E. Clayton

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Dissertation selbst verfaßt und mich dabei keiner anderen, als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen und Hilfen bedient habe. Des Weiteren erkläre ich, dass ich an keiner anderen Stelle ein Prüfungsverfahren beantragt oder die Dissertation in dieser oder einer anderen Form bereits anderweitig als Prüfungsarbeit verwendet oder einer anderen Fakultät als Dissertation vorgelegt habe.

Heidelberg, 22. Dezember 2004

_____

Simone Freese

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen danken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Prof. P. H. Seeburg für die freundliche Unterstützung und Betreuung meiner Arbeit sowie die ausgezeichneten Arbeitsbedingungen.

Dr. Rolf Sprengel danke ich für die wissenschaftliche Betreuung dieser Arbeit, seine wertvollen Ideen und Anregungen.

Thorsten Bus, Boris Hambsch, Stefan Meyer, Liliana Layer, Wolfram Schleich, Uli Krüth, Wanan Tang, Peixin Zuh für die freundliche Zusammenarbeit und Unterstützung.

Volker Mack, Verena Bosch, Concetta Miucci für ihre Freundschaft, Hilfsbereitschaft und moralische Unterstützung über die Bench hinaus.

Derya Shimshek danke ich für seine große Hilfe am Computer und Mikroskop.

Anette Herold, Martina Lang, Juliana Kling, Yaya Zhu für ihre Hilfe in verschiedenen Abschnitten dieser Arbeit.

Sabiene Grünewald danke ich besonders für das Asyl in 109 während des Zusammenschreibens.

Frank Zimmermann und Sascha Dlugosz für ihren hervorragenden Service bei der Transgentechnologie

Rita Pfeffer, Concetta Miucci, Andrea Genthner danke ich für ihre Hilfe bei der Aufzucht der Mäuse.

Prof. Christine E. Clayton für Ihr Interresse an meiner Arbeit und ihre Bereitwilligkeit diese zu begutachten.

Frank Single danke ich für alles.

„to boldly go where no one has gone before“ *James T. Kirk.*

Nicht zuletzt möchte ich mich bei meinen Eltern und meiner Familie für ihr Vertrauen und die in jeder Hinsicht immerwährende Unterstützung meines Studiums und meiner Promotion bedanken.

Zusammenfassung

In transgenen Mausmodellen häufig beobachtet und unerwünscht sind unvorhersehbare Einflüsse regulatorischer Elemente des Insertionsortes auf das Expressionsverhalten der ins Genom eingebrachten Gene. In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob diese Einflüsse durch Integration in einen definierten Genlokus kontrolliert bzw. minimiert werden können. Hierfür wurde der ROSA26-Lokus ausgewählt, für den gezeigt war, daß er in der Maus ubiquitär exprimiert und für Gen-Targeting leicht zugänglich ist. Zudem führt die Inaktivierung der ROSA26-Transkripte zu keinem offensichtlich veränderten Phänotyp.

Die Induzierbarkeit von Fremdgenen im ROSA26-Lokus wurde durch das Einbringen von zwei unterschiedlichen, Tet-induzierbaren Modulen zur Expression von GFP, getestet. Nach homologer Rekombination werden der Tetracyclin-abhängige Transaktivator (itTA) bzw. der reverse Tetracyclin-abhängige Transaktivator (iM2) konstitutiv unter Kontrolle des endogenen ROSA26-Promotors exprimiert. In ES-Zellen konnte für das iM2-System eine Doxycyclin-abhängige Induktion von GFP und für das itTA-System eine Repression der GFP-Expression gezeigt werden. In heterozygoten iM2-Mäusen konnte, nach Deletion der Selektionskassette, in allen analysierten peripheren Geweben eine Induktion der GFP-Expression erreicht werden, wobei die GFP-Expressionsniveaus gewebsspezifisch variierten. Induktionszeitpunkt und Dauer zeigten keinen Einfluss auf die GFP-Expression. In homozygoten iM2-Mäusen wurde eine gewebsabhängige Steigerung der GFP-Expression beobachtet. Im Gehirn heterozygoter iM2-Mäusen konnte keine, und in homozygoten iM2-Mäusen nur eine auf definierte neuronale Populationen beschränkte Induktion der GFP-Expression erreicht werden. Transaktivierungsexperimente, sowie inhomogene GFP-Expression im Gehirn heterozygoter itTA-Mäuse indizieren ein Silencing des ROSA26-Lokus in Neuronen, was sich in einer schwachen Aktivität des ROSA26-Promotors sowie einer schlechten Induzierbarkeit des CMV_m auswirken kann.

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass die verwendeten Expressionsmodule zur Charakterisierung von Genloci und deren endogenen Einflüsse auf Fremdgene geeignet sind. Hierbei wurde deutlich, daß der ROSA26-Lokus aufgrund seiner gewebsspezifischen Expressionsniveaus nur bedingt für die Verwendung über Gen-Targeting integrierter induzierbarer Module verwendbar ist.

Summary

A major drawback of traditional transgenic technologies is that positioning effects due to the integration-site can result in ectopic expression of the transgene. In this study I have analyzed to what extent these positioning effects can be controlled or minimized by integration of genes into a defined locus. For this the ROSA26-locus was chosen, which was well known for easy accessibility for gene targeting and its ubiquitous expression. Furthermore, inactivation of its gene transcripts produce no obviously altered phenotype.

Inducibility of transgenes targeted into the ROSA26-locus was investigated by integration of two different tetracycline-dependent GFP expression systems. Upon homologous recombination either the tetracycline-dependent transactivator (itTA) or the reverse tetracycline-dependent transactivator (iM2) were constitutively expressed under control of the endogenous ROSA26-promoter. Functionality of the systems was shown in ES cells by doxycyclin-dependent induction and repression of GFP-expression for iM2 and itTA, respectively. Upon deletion of the selection cassette, heterozygous iM2-mice show GFP-expression in all peripheral tissues analyzed, with a tissue dependent variation in expression levels. Time point and duration of induction were found to have no influence on GFP-expression. In homozygous iM2-mice, a tissue dependent increase of GFP-expression was observed. However, induction of GFP-expression in the brains of heterozygous iM2-mice failed and was restricted to defined neuronal populations only in homozygous mice. Transactivation experiments as well as poor GFP-expression in neurons of heterozygous itTA-mice indicate a silencing of the ROSA26-promoter in neurons, which might lead to reduced promoter strength or poor activation of the inducible CMV_m.

In this work we could demonstrate that the employed expression-systems are useful tools to characterize gene loci and influences of their endogenous regulatory elements on transgene expression. It became obvious that the ROSA26-locus due to its tissue dependent variation of expression levels harbours limited suitability for inducible systems targeted into this locus.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung 1

1.1 Konditionale Genexpression 1

1.1.1 Sequenzspezifische Rekombination 1

1.1.2 Induzierbare eukaryotische Systeme 4

(1) Hitzeschock *4*

(2) Schwermetallionen *4*

(3) Interferon *4*

(4) Hormone *5*

(5) Ecdyson *5*

1.1.3 Induzierbare prokaryotische Systeme 7

(1) Das Lac Operon *7*

(2) Das Tet-System *9*

1.2 Transgen versus Knock-In 11

1.3 Der ROSA26-Lokus 13

1.4 Zielsetzung der Arbeit 14

2. Ergebnisse 16

2.1 Gen-Targeting des ROSA26-Lokus 16

2.1.1 Aufbau des Gen Targeting-Konstruktes 16

2.1.2 Homologe Rekombination in ES-Zellen 16

2.1.3 Induktion des iM2:GFP-Operons durch Doxycyclin in ES-Zellen 18

2.1.4 Etablierung und Genotypisierung der mutanten Mauslinien 20

2.2 Expressionsanalyse heterozygoter $R26^{tl}$- und $R26^{tl\Delta}$-Mäuse 21

2.2.1 Analyse der iM2-Transkripte in heterozygoten $R26^{tl\Delta}$-Mäusen 21

2.2.2 Induzierbare GFP-Expression in heterozygoten $R26^{tl}$- und $R26^{tl\Delta}$-Mäusen 23

2.2.2.1 Periphere Gewebe *23*

2.2.2.2 Gehirn *25*

2.2.3 Induzierbare GFP-Expression in homozygoten $R26^{tl\Delta/tl\Delta}$-Mäusen 26

2.2.3.1 Periphere Gewebe *26*

2.2.3.2 Gehirn *27*

2.2.4 Auswirkung des Induktionsszeitpunktes auf die GFP-Expression 28

2.2.5 Analyse des inhomogenen Expressionsprofils der peripheren Gewebe 30

2.3 Expressionsanalyse von ROSA26-CMV_m:iM2 im Gehirn 32

2.3.1 Transaktivierung 32
2.3.1.1 Transaktivierung eines zweiten Responders durch Rosa26:iM2 32
2.3.1.2 Transaktivierung des Rosa26:CMV$_m$ durch tg-tTA 34
2.3.2 Verfügbarkeit von Doxycyclin im Gehirn 35
2.3.2.1 Induktion von iM2 vor Ausbildung der Bluthirnschranke 35
2.3.2.2 Injektion von Doxycyclin in den lateralen Ventrikel 36
2.4 Generierung und Analyse der R26^{t4}-Mauslinie 38
2.4.1 Aufbau des Gen Targeting Konstruktes 38
2.4.2 Generierung der R26^{t4}-Mauslinie 40
2.4.3 Expressionsanalyse von ROSA26-CMV$_m$:itTA in ES-Zellen und der Maus 41
2.4.3.1 Expression in ES-Zellen 41
2.4.3.2 Analyse des itTA-Transkripts in heterozygoten R26^{t4}-Mäusen 43
2.4.3.3 GFP-Expression im Gehirn heterozygoter R26^{t4}-Mäuse 44
3. Diskussion 46
3.1 Funktionalität der Doxycyclin-kontrollierten Expressionsmodule 46
3.2 GFP-Expression in R26^{t1}- und R26$^{t1\Delta}$-Mäusen 47
3. Problematik der Induktion im Gehirn 48
3.4 ROSA26-Lokus 51
4. Material und Methoden 54
4.1 Kultur, Transformation und Selektion von ES-Zellen der Maus 54
4.2 Herstellung und Haltung transgener Mäuse 55
4.3 Genotypisierung der mutanten Mauslinien 55
4.4 Verabreichung von Doxycyclin 56
4.5 Isolierung hochmolekularer genomischer DNS aus Mausgeweben 56
4.6 Southern Blot-Analyse 56
4.6 Radioaktive Markierung von Sonden und Hybridisierung 57
4.7 DNS-Sequenzierung 57
4.8 Oligonucleotidsynthese 58
4.9 Isolierung von gesamt-RNS aus Mausgeweben 58
4.10 RACE (Rapid amplification of cDNA ends) 58
4.11 Isolierung von Proteinen aus Mausgeweben 59
4.13 Westernblot-Analyse 59
4.14 Vibratom-Gewebsschnitte von Mäusegehirnen 59

4.15 Immunohistochemische Untersuchungen von Vibratomgewebsschnitten..... 60
4.16 Eukaryotische Zellen..... 61
4.17 Mauslinien 61
4.18 Sequenzen verwendeter Oligonukleotide..... 61
4.19 Verwendete Antikörper 62
5. Anhang 63
5.1 Abkürzungen 63
6. Literatur..... 65

1. Einleitung

Die Maus ist seit langem als wertvoller Modellorganismus in der biologischen und medizinischen Forschung etabliert. Die gezielte Veränderung von Genen ermöglicht es, phänotypische Ausprägungen auf ein definiertes endogenes Gen zurückzuführen. Die Möglichkeiten hierbei reichen von der Überexpression von Fremdgenen durch Generierung transgener Mäuse über die Deletion endogener Gene bis hin zur Einführung von Punktmutationen im Genom.

1.1 Konditionale Genexpression

Aufgrund ihrer Komplexität können biologischen Prozesse nur selten allein durch Geninaktivierung oder die Expression von Fremdgenen analysiert werden. Gene besitzen meist unterschiedliche Funktionen während der Entwicklung und später im adulten Tier. Dies erschwert, primäre und sekundäre Veränderungen eines komplexen Phänotypes zu differenzieren. So kann sich zum Beispiel das Entfernen bestimmter Gene während der Embryonalentwicklung letal auswirken, was jedoch lediglich die früheste, nicht-redundante Rolle dieser Gene reflektiert und eine Analyse der Genfunktion im adulten Tier unmöglich macht. Ähnlich drastische Auswirkungen können ebenfalls durch Überexpression von Fremdgenen hervorgerufen werden, wodurch diese Mausmodelle für eine Analyse der Genfunktion zu späteren Zeitpunkten der Entwicklung nicht verwendet werden können. Phänotypische Ausprägungen, die aufgrund solcher genetischer Modifikationen auftreten, sind oftmals auf systemische Effekte, welche den gesamten Organismus betreffen zurückzuführen. Dies zeigt die Notwendigkeit einer flexiblen, sowohl räumlichen als auch zeitlichen Kontrolle der Genexpression.

1.1.1 Sequenzspezifische Rekombination

Einer der ersten erfolgreichen Ansätze genetischer Modulation des Säugetiergenoms gelang unter Verwendung der sequenzspezifischen Cre-Rekombinase aus dem Bakteriophagen P1 (Hoess et al., 1982 und 1986). Dieses Enzym katalysiert ein Rekombinationsereignis zwischen zwei spezifischen Erkennungsstellen (34 bp) (Abb.01 A). Diese sogenannten *loxP*-Elemente (locus of crossover) bestehen aus einer asymmetrisch gerichteten Kernregion (8 bp) und zwei flankierenden palindromen Wiederholungen (13 bp) (Abb.01 B) (Lasko et al., 1992). Abhängig von der

Orientierung zweier *loxP*-Elemente zueinander, führt das Rekombinationsereignis zur Deletion oder Inversion des *loxP*-flankierten DNS-Segmentes. Alternativ zur Cre-vermittelten Rekombination kann eine sequenzspezifische Rekombination durch die Flp-Rekombinase mit sogenannten FRT-Erkennungssequenzen (Flp recognition target) aus *Saccharomyces cerevisiae* (Hartley und Donelson, 1980) erreicht werden, deren Erkennungssequenz analog zu den bereits beschriebenen *loxP*-sequenzen aufgebaut ist (Jayaram et al., 1985; Senecoff and Cox, 1986). Aufgrund ihrer ähnlichen Reaktionsmechanismen werden beide Rekombinasen der Familie der Lambda-Integrasen zugeordnet (Tribble et al., 2000; Übersicht Van Duyne, 2001). In Mausmodellen wurde bislang bevorzugt das Cre/*loxP*-System verwendet, da eine Etablierung des Flp/FRT-Systems aufgrund der verschiedenen physiologischen Temperaturen von Hefe und Säuger zunächst erschwert war. Erst durch Mutagenese des Flp-Enzyms konnte eine Optimierung der Rekombinaseaktivität bei 37°C erreicht werden (Buchholz et al., 1996) was die Anwendung in der Maus ermöglichte (Dymecki et al., 1996).

Eine nützliche Variante des Cre/*loxP*- bzw. des Flp/FRT-Systems entstand durch Fusion der Rekombinasen mit den Ligandenbindungsdomänen (LBD) von Östrogen- (Metzger et al., 1995) bzw. Progesteron-Rezeptoren (Kellendonk et al., 1996), wodurch eine Induzierbarkeit der Cre-Aktivität erreicht werden konnte (Abb.01 C). Die Fusionsproteine liegen in Abwesenheit ihrer spezifischen Liganden (Tamoxifen bzw. RU486) in Form von inaktiven Proteinkomplexen vor, die unter Beteiligung von Hitzeschockproteinen im Cytosol verbleiben. Durch Zugabe und Bindung der Liganden dissoziieren die Komplexe, und der Transport der Fusionsproteine in den Kern kann erfolgen. Dort katalysiert das aktive Enzym die Rekombination (Abb.01 C). Die Fusionsproteine sind nicht durch endogene Steroide wie z.B. β-Estradion aktivierbar und pleiotrope Nebeneffekte durch Interaktion mit zelleigenen Signaltransduktionskaskaden sind minimal. Jedoch sind Auswirkungen auf die Entwicklung von Geschlechtsreife und der Brustdrüse beobachtet worden (Kellendonk et al., 1996 und 1999; Brocard et al., 1997 und 1998; Danielian et al., 1998).

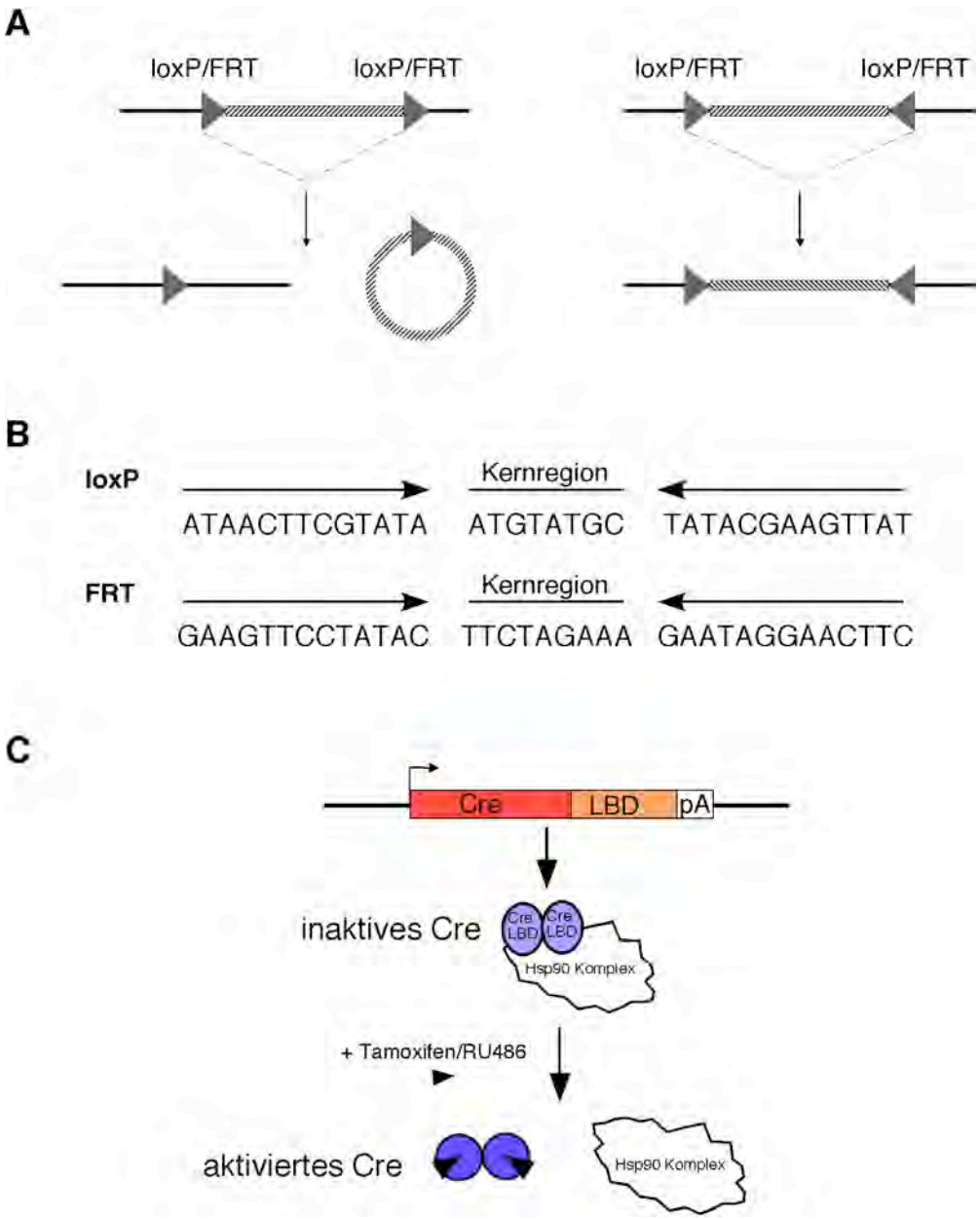

Abb.01: Schematische Darstellung Cre-/Flp-vermittelter Rekombination, sowie der Regulation von Cre-/Flp-Aktivität. (A) Cre/Flp vermittelte Rekombination eines mit *loxP*/FRT-Elementen flankierten Sequenzbereiches; abhängig von der Orientierung der Erkennungsstellen zueinander kommt es zur Deletion oder Inversion. (B) Nukleotidsequenzen der *loxP*/FRT-Elemente mit der asymmetrischen Kernregion und den flankierenden palindromen Wiedrholungen. (C) Durch Fusion der Rekombinase mit der Ligandenbindungsdomäne (LBD) eines Steroidrezeptors kann eine Induzierbarkeit der Cre-Aktivität erreicht werden. In Abwesenheit des Liganden, Tamoxifen bzw. RU486, liegt die Rekombinase inaktiv, in einem Komplex mit Hsp90 Hitzeschockproteinen vor. In Anwesenheit des Liganden dissoziiert der Komplex und die Rekombinase ist aktiviert.

1.1.2 Induzierbare eukaryotische Systeme

Cre/*loxP* bzw. Flp/FRT vermittelte Deletionssprozesse sind irreversibel, was bei der Bearbeitung vieler Fragestellung einen Nachteil darstellt. Als Basis reversibler induzierbarer Systeme dienten Variationen endogener eukaryotischer Induktionssysteme. Einige Beispiele, die in Mausmodellen anwendung fanden, sind im Folgenden kurz erläutert. Den meisten auf eukaryotischen Elementen basierenden induzierbaren Systemen ist, bedingt durch pleiotrope Effekte, eine hohe basale Aktivität gemein.

(1) Hitzeschock

Die Promotoren einiger Gene für Hitzeschockproteine, wie z.B. hsp70 von *D. melanogaster* und hsp68 von *C. elegans*, deren Aktivität durch endogene, bei Hitzeschock induzierter Transkriptionsfaktoren reguliert wird, wurden sowohl in Zellkultur (Schweinfest et al., 1988) als auch in transgenen Mausmodellen (Kothary et al., 1989) getestet. Bei einer Temperatur von 37°C findet keine Expression durch diese Promotoren statt. Ein Temperaturanstieg auf 42°C führt jedoch zu einer schnellen Induktion der Expression. Dabei liegt die Induktionskinetik im Bereich von Minuten und ist somit außerordentlich schnell. Nachteile des Systems sind die relativ geringen Induktionsniveaus (ca. 10X), sowie eine Reihe durch den induktionsbedingten Hitzeschock hervorgerufene pleiotrope Effekte.

(2) Schwermetallionen

Induzierbare Systeme, die auf Promotoren beruen, welche durch Schwermetallionen (hauptsächlich Cd^{+} und Zn^{2+}) reguliert werden zeigen einen hohen Grad an basaler, nicht induzierter Hintergrundsaktivität. Des weiteren wurden mit diesen Systemen lediglich geringe Induktionsniveaus erreicht und die Verabreichung von Schwermetallionen wirkt sich zudem toxisch auf Zellen aus (Filmus et al., 1992).

(3) Interferon

Interferone (IFNs) bilden eine Klasse von Proteinen, die bei Säugetieren im Falle einer viralen Infektion von Zellen sekretiert werden, und bei Zielzellen durch

Induktion einer Reihe von Interferon-induzierbaren Gene (*interferon responsive elements*, IRF) einen antiviralen Zustand auslösen. Die Regulation induzierbarer Systeme die auf IRFs, wie z.B. dem Mx1-Promotor beruhen, erfolgt in transgenen Mäusen durch Injektion doppelsträngiger RNS oder Interferon (Arnheiter et al., 1990; Kuhn et al., 1995). Dabei variieren Induktionsniveaus und Hintergrundaktivität sowohl abhängig vom jeweiligen Gewebe als auch von Maus zu Maus. Die Ursachen hierfür liegen in gewebsbedingten Unterschieden der Verfügbarkeit von Interferon, sowie in der starken Variabilität der endogenen Interferonexpression während viraler Infekte oder sonstigen Krankheiten. Hinzu kommen verschiedene biologische Nebenwirkungen, die durch Behandlungen mit Interferon α/β bzw. dsRNS entstehen.

(4) Hormone

Ein weiterer Ansatz zur Regulation der Genexpression in Mäusen lag in der Verwendung induzierbarer Promotoren von Steroidhormonen wie z.B. Glucocorticoid, Estrogen und Progesteron. Hier wird die Genexpression durch Gabe des entsprechenden Hormons bzw. eines Analogons reguliert (Friedmann et al., 1989, Braselmann et al., 1993; Wang et al., 1994). Durch die Verwendung von Hormonen als Induktor kommt es häufig zu unvorhersehbaren Nebeneffekten, da neben dem Fremdgen auch die Expression endogener, durch die Hormone aktivierbarer Gene induziert werden kann.

(5) Ecdyson

Ecdyson gehört zu den Steroidhormonen und leitet in *D. melanogaster* die Metamorphose ein. Die Regulation erfolgt durch Bindung von Ecdyson an den Ecdysonrezeptor (EcR), welcher Heterodimere mit dem Ultraspiracel Protein (USP) bildet. Dieses Heterodimer bindet auf der DNS spezifisch an das „ecdyson-response-element“ (ERE) und bewirkt somit die Transkription von Genen, deren Produkte an der Metamorphose beteiligt sind. Das durch Ecdyson induzierbare System wurde durch mehrere Veränderungen an die Expression in Säugetierzellen angepasst (Yao et al., 1993). Der natürliche Dimerisierungspartner (USP) wurde durch dessen Analogon in Säugetieren, dem RetinoidX-Rezeptor (RXR), ersetzt. Dies resultierte in einer verbesserten ligandenabhängigen Dimerisierung und führte folglich zu verbesserter

Geninduktion. Beim Ecdyson-Rezeptor wurde an eine N-terminal verkürzte Form die virale VP16 Aktivatordomäne fusioniert und C-terminal die endogene DNS-Bindedomäne (BD) durch die des Glucocorticoid-Rezeptors (GR) ersetzt (No et al., 1996). Der Ecdyson-abhängige Promotor wurde durch Fusion mehrerer ERE mit dem Minimalpromotor des Hitzeschockgens hsp70 erhalten (Corces and Pellicer, 1984; No et al., 1996). Für eine Aktivierung des veränderten Systems können neben Ecdyson auch die synthetischen Analoge MuristonA (murA) und PonasteronA verwendet werden, die bei einem Screening natürlicher Pflanzenstoffe eine verbesserte Induktionseigenschaft, sowie eine sehr niedrige basale Aktivität hervorriefen (Albanese et al., 2000; Yu et al., 2000).

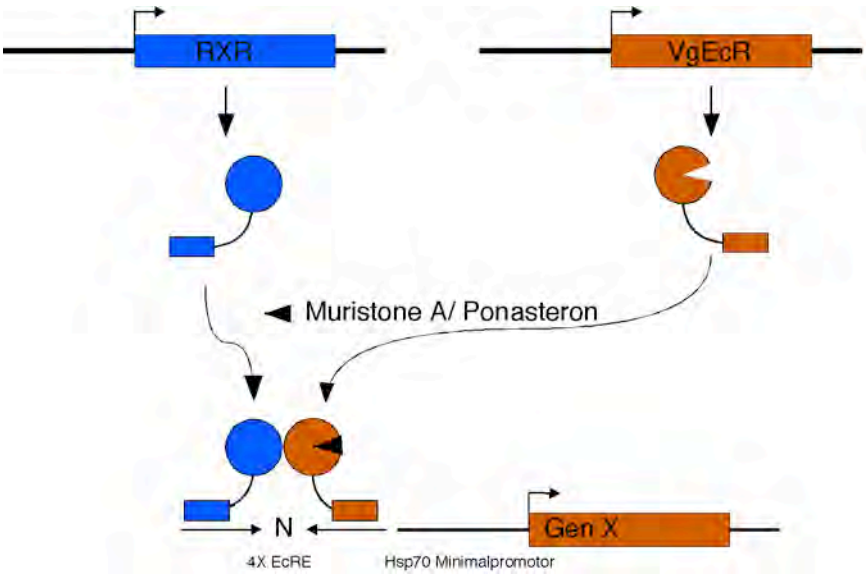

Abb.02: Schematische Darstellung der Ecdyson-vermittelten Genexpression. Der RetinoidX-Rezeptor (RXR) und der modifizierte Ecdysonrezeptor (VgEcR) bilden in Anwesenheit des Induktors MuristoneA Heterodimere. Diese binden an die E/GRE-Sequenzen 5' des Hsp70-Minimalpromotors, was die Expression von 3' gelegenen Genen ermöglicht.

Das so entstandene System (Abb.02), bestehend aus dem VP16-EcR-GR-Hybrid (VgEcR), dem Dimerisierungspartner RXR und dem synthetischen „response element" (E/GRE), zeigt im Vergleich zum ursprünglichen System eine um den Faktor 34 erhöhte Induzierbarkeit. Systeme, die auf Ecdyson-regulierter Genexpression basieren, wurden bereits erfolgreich in transgenen Mausmodellen angewendet (Yao et al., 1993). Nachteile dieser Systeme sind, dass bei Aktivierung

mit murA große Mengen an RXR in der Zelle vorliegen müssen, die sich zelltoxisch auswirken können (Thomas et al., 1993; Yao et al., 1992 und 1993). Weitere Nachteile sind, dass die Induktoren den transgenen Tieren nicht oral, sondern durch Injektion verabreicht werden müssen und um ein funktionelles System zu erhalten, drei Transgene benötigt werden.

1.1.3 Induzierbare prokaryotische Systeme

Bei induzierbaren Systemen, die auf prokaryotischen Elementen basieren, sogenannten heterologen Expressionssystemen, ist die Wahrscheinlichkeit pleiotroper Effekte verringert. Dies wirkt sich positiv auf Regulierbarkeit und Spezifität aus.

(1) Das Lac Operon

Das auf dem lac-Operon von *E. Coli* basierende Genregulationssystem besteht aus drei Komponenten, dem *lac*-Repressor (*lacR*), einer als *lac*-Operator (*lacO*) bezeichneten DNS-Sequenz, an die der *lacR* bindet, sowie dem synthetischen Induktor Isopropyl-*β*-D-thiogalactopyranosid (IPTG). Im ursprünglichen, bakteriellen System dient das *lac*-Operon der Transkriptionskontrolle der Gene *lacZ* (*β*-Galactosidase), *lacY* (Permease) und *lacA* (Transacetylase), deren Proteinprodukte Aufnahme und Abbau von Lactose vermitteln. In Abwesenheit von Lactose bindet *lacR* an die Operatorsequenz und verhindert so die Formation des Initiationskomplexes der RNA-Polymerase an der Promotorsequenz. Bei Anwesenheit von Lactose, bindet diese an *lac*R. Dies führt zu einer Konformationsänderung, so dass der *lacR* von der Operatorsequenz dissoziiert. Folglich kommt es zur Transkription der im *lac*-Operon enthaltenen Gene (*lacZ*, *lacY* und *lacA*) (Abb.03A).
Das *lac*-Operon war Grundlage für das erste, in Säugerzellen funktionelle heterologe Genregulationssystem (Hu und Davidson, 1987). Durch Insertion des *lacO* nahe der TATA-Box des viralen P_{MSV}-Promotors konnte durch Expression des *lacR* in L-Zellen der Maus erfolgreich die Expression eines Reportergens reprimiert werden. Optimierung des Transportes des *lacR* in den Nukleus durch Einfügen des Kernlokalisierungssignals (NLS) des T-Antigenproteins aus dem Simian Virus 40 (SV40) führte zu einer reduzierten basalen Aktivität sowie erhöhten Affinität des Repressors zu IPTG (Fiek et al., 1992).

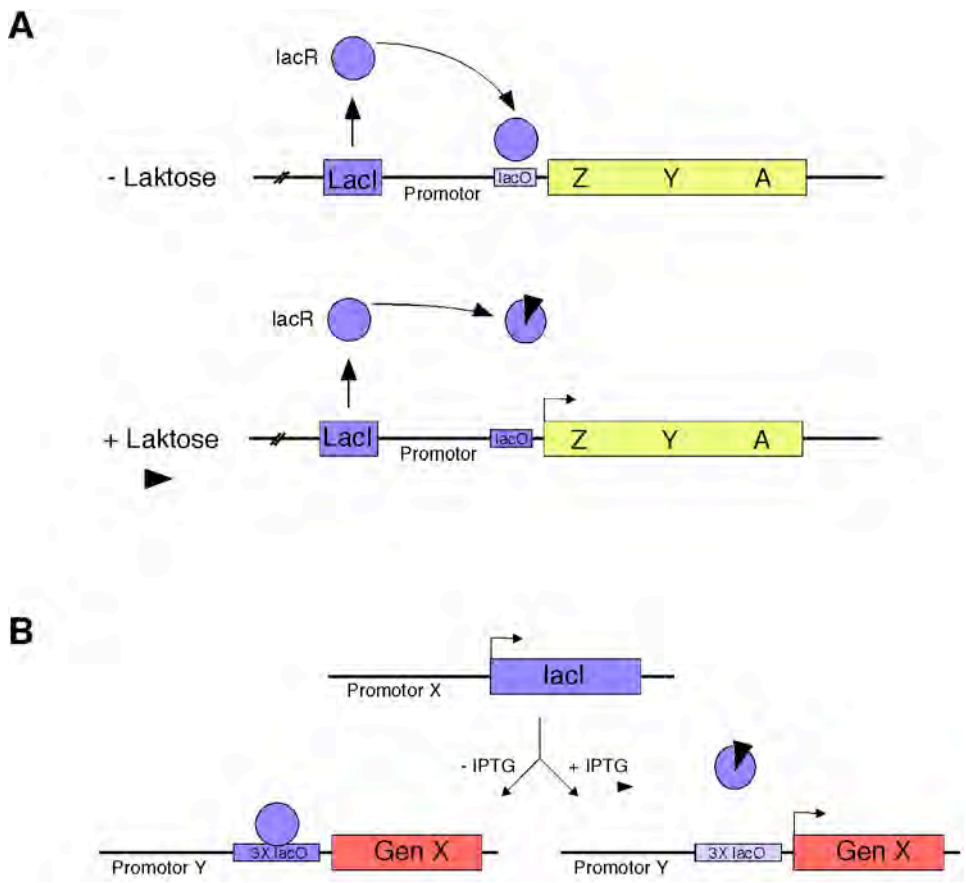

Abb.03: Schematische Darstellung des auf dem *lac*-Operon basierenden induzierbaren Genexpressionssystems. (A) Das *lac*-Operon aus *E. coli* basiert auf einem Repressionsmechanismus. In Abwesenheit von Lactose (oben) bindet der *lac*-Repressor (*lacR*) an den *lac*-Operator (*lacO*), was die Expression der Gene *lacZ*, *lacY* und *lacA* reprimiert. In Anwesenheit von Laktose (unten) bindet diese an den *lacR*, was zu einer Konformationsänderung führt und der *lacR* vom *lacO* dissoziiert. Dies ermöglicht die Expression der Gene des *lac*-Operons. (B) Das auf dem bakteriellen *lac*-Operon basierende System wurde für die Anwendung in transgenen Mäusen modifiziert. In Abwesenheit des synthetischen Induktors IPTG bindet der *lacR* an die *lacO*-Sequenzen, was zur Repression der Expression führt. Die Anwesenheit von IPTG führt zur Konformatinsänderung des *lacR*, so dass dieser von der *lacO*-Sequenzen dissoziirt, was die Genexpression ermöglicht.

Für die Generierung transgener Mausmodelle wurde der *lac*-Repressor durch mehrere Veränderungen an die Expression in Säugetierzellen angepasst, indem die Nukleotidsequenz bezüglich des Codon-gebrauchs, potentielle CpG-Methylierungsstellen und kryptischer Spleiss-Stellen optimiert wurde. Derart optimiert, konnte die Funktionalität des *lacR*-Expressionssystem bei der Regulation eines Reportergenes (Tyrosinase) in der Maus gezeigt werden (Cronin et al., 2001).

(2) Das Tet-System

Die regulatorischen Elemente des vom Transposon 10 (Tn10) stammenden Tetracyclin (Tc)-Resistenz Operons aus *E. coli* wurden erfolgreich für die Generierung Tetracyclin-abhängiger Expressionssysteme adaptiert. Im ursprünglichen, bakteriellen System verhindert die Bindung des dimeren Tet-Repressors (*TetR*) an die spezifische Operatorsequenz (*tetO*) des Tc-Promotors die Transkription des Tetracyclin-Resistensgens *tetA*. Die Bindung von Tetracyclin an *tetR* bewirkt eine allosterische Konformationsänderung des *tetR*, was zu dessen Dissoziation von der Operatorsequenz führt und die Transkription des *tetA*-Gens ermöglicht (Hillen und Berens, 1994).

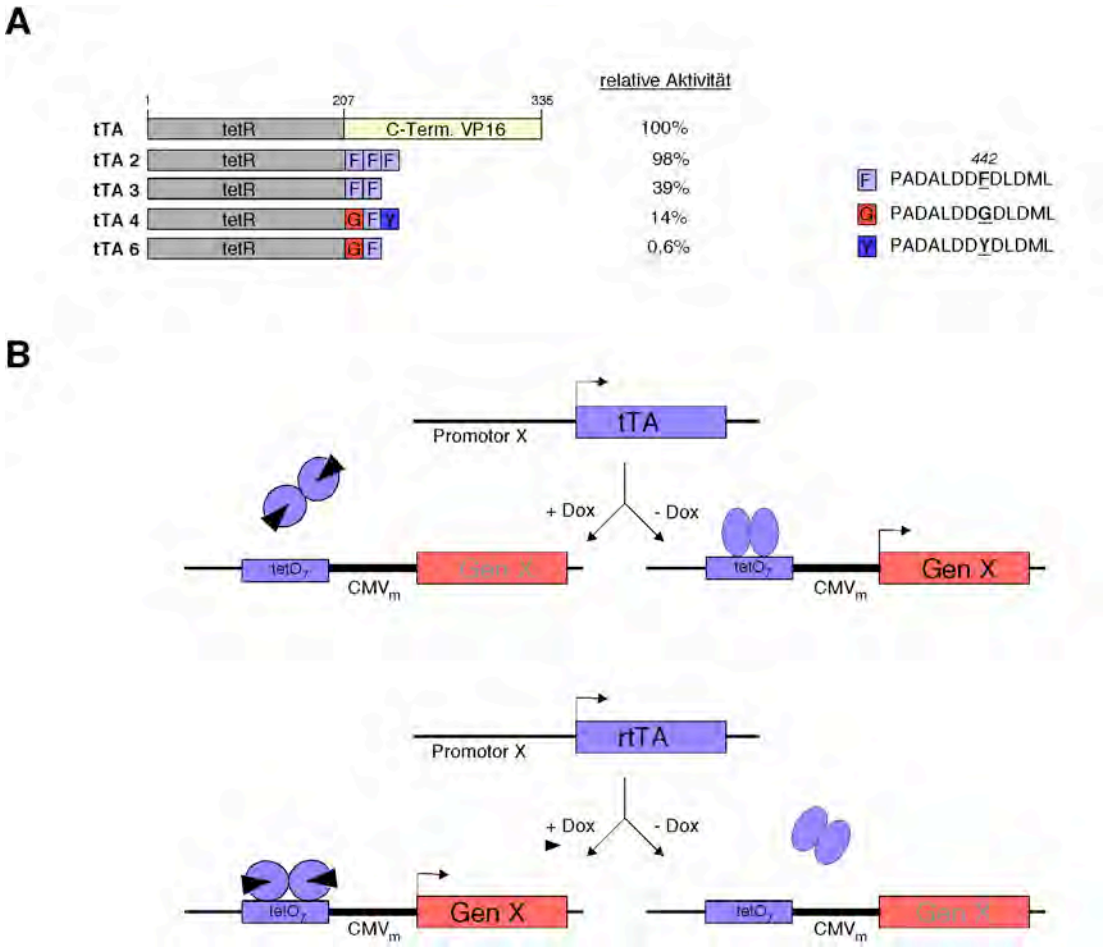

Abb.04: Schematische Darstellung des Tetracyclin-abhängigen Transaktivators (tTA) sowie des auf tTA/rtTA-basierenden induzierbaren Systems zur Regulierung von Genexpression. (A) tTA ist eine Fusion des Tet-Repressors (*tetR*) mit der C-terminalen VP16-Transaktivatordomäne des *H. simplex* Virus. Da sich das ursprüngliche Fusionsprotein toxisch auf Säugerzellen auswirkte, wurde VP16 durch Minimalsequenzen ersetzt. Hierbei wies tTA2 bei reduzierter Toxizität die höchste Aktivität auf. (B)

Während bei Anwesenheit des Induktors Doxycyclin (Dox) im tTA-System (oben) die Genexpression reprimiert wird, wird sie durch Dox im rtTA-System aktiviert. Ohne Dox kann tTA an die Operatorsequenzen ($tetO_7$) binden und ermöglicht so eine Aktivierung der Genexpression, während rtTA nicht mehr an die Operatorsequenzen binden kann.

Durch Fusion mit der C-terminalen VP16-Transaktivatordomäne des *H. simplex* Virus wurde der ursprüngliche Tet-Repressor in den Tetracyclin-abhängigen Transaktivator (tTA) umgewandelt (Gossen und Bujard, 1992). Hierbei blieben die DNS-Bindeeigenschaften des Repressorbestandteiles erhalten. Der tTA-abhängige Promotor (P_{tet}) besteht aus einer Fusion der Minimalsequenz des humanen CMV (Cytomegalovirus) „immediate early promotor“ (Boshart et al., 1985) und einer für die tTA-abhängige Aktivierung am 5’-Ende eingefügten Serie von sieben tet-Operatorsequenzen ($tetO_7$) (Baron et al., 1992). In Gegenwart des Effektors Tetracyclin (oder seines Analogons Doxycyclin, Dox) kann tTA nicht an die Operatorsequenz des P_{tet} binden (Abb.04 B oben). In Abwesenheit von Tetracyclin hingegen führt die Bindung von tTA an den P_{tet} zur Expression von Genen, die unter Kontrolle des tTA-aktivierbaren Promotors stehen.

Um die Transkription einzuleiten, rekrutiert die VP16 Transaktivatordomäne sehr effizient Transkriptionsfaktoren wie TFIIB (Lin et al., 1991), TBP (TATA binding protein; Ingles et al., 1991) oder $TAFII_{40}$ (TBP-associated factor; Goodrich et al., 1993). Diese effiziente Einleitung der Transkription erwies sich als ein Problem bei der Überexpression des P_{tet}, da es zu einer Reduktion freier Transkriptionsfaktoren in der Zelle führte. Dieser, als Squelching bezeichnete Prozess, der sich toxisch auf Zellen auswirken kann, wurde erstmals bei der Überexpression von Gal4 in Hefe beobachtet (Gil und Ptashne, 1988). Aus diesem Grund wurde die VP16-Transaktivatordomäne durch Minimalsequenzen, welche für eine Aktivierung ausreichen ersetzt (Abb.04 A). In Induktionsexperimenten erwies sich die sogenannte FFF-Version, der Bindungsstellen für Oct1, TAFII40 und ADA2 fehlen, als optimal für eine Expression in Säugerzellen (Baron et al., 1997, 1999, 2000).

Um die Expression des tTA in Säugerzellen weiter zu optimieren, wurde die DNS-Sequenz, bezüglich des Codon-gebrauchs, potentiellen CpG-Methylierungsstellen sowie kryptischen Spleiss-Stellen an die Situation in Säugerzellen angepasst (*improved* tTA, itTA; J. Kim).

Durch Punktmutationen in der Repressor-Domäne TetR des Transaktivators tTA entstand eine im Phänotyp des Aktivators invertierte Variante, der sogenannte revers Tetracyclin-abhängige Transaktivator (rtTA). In Abwesenheit von Tetracyclin nimmt rtTA eine Konformation ein, die eine Interaktion mit den Operatorsequenzen des P_{tet} verhindert. Erst nach Bindung von Tetracyclin an die TetR-Domäne kann rtTA an den Operator binden und dadurch die Transkription induzieren (Abb.04 B). Durch Einführen weiterer Punktmutationen konnte die Bindungseffizienz des ursprünglichen rtTA zu Tetracyclin weiter verbessert werden (M2; Baron et al.,2000). Analog zu itTA wurde die Sequenz des M2 an die Expression in Säugerzellen angepasst (iM2, J. Kim).

1.2 Transgen versus Knock-In

Transgene Mausmodelle ermöglichen es die Überexpression von Proteinen *in vivo* zu studieren. Hierfür wird die DNS in den Pronucleus einer befruchteten Eizelle injiziert und über Rekombination stabil ins Genom integriert. Jedoch ist diese Methode mit einigen Nachteilen verbunden. Die Injektion der DNS in den Pronucleus führt häufig zur Konkatemerbildung und somit zu multiplen Integraten. Zudem kann die Integration des Transgens hierbei in einen für den Organismus wichtigen Genlokus geschehen und somit zur Unterbrechung endogener Gene führen. Darüber hinaus kann der Integrationsort großen Einfluss auf die transgene Expression ausüben. Dabei können endogene Faktoren mit der Promotorsequenz interagieren und somit zu einer Änderung der Promotorstärke führen. Insbesondere regulierbare Systeme, wie die bereits beschriebenen, sind anfällig für die Einflüsse endogener regulatorischer Elemente des Integrationsortes. Ebensowenig wie der Integrationsort kann die Anzahl der Integrate kontrolliert werden. Da bei jeder einzelnen Pronukleusinjektion die Integration des Transgens unterschiedlich verläuft, kann jedes vom Gründertier abstammende Mauslinie ein anderes Expressionsmuster aufweisen (Abb.05) (Krestel et al., 2001). Somit müssen mehrere transgene Mauslinien auf ihre Expression hin analysiert werden, um eine entsprechende Linie mit den gewünschten Expressionseigenschaften auswählen zu können.

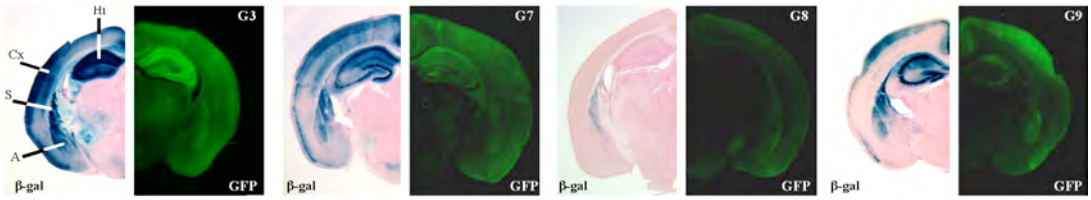

Abb.05: Gezeigt sind die unterschiedlichen Expressionsprofile von vier transgenen Linien (G3, G7, G8 und G9), die durch Pronukleusinjektion des gleichen Konstruktes (GFPtetO7lacZ) erzeugt wurden. Links ist jeweils die ß-Gal-Expression gezeigt, rechts die GFP-Fluoreszen. Hi, Hippokampus; Cx, Cortex; S, Striatum; A, Amygdala.

Alternativ zur Herstellung von transgenen Mäusen besteht die Möglichkeit, das Genom gezielt über homologe Rekombination in embryonalen Stammzellen (ES-Zellen) zu manipulieren. Hierbei wird die Expressionskassette 5' sowie 3' mit Sequenzen flankiert, die zur endogenen Zielsequenz im Genom homolog sind. Nach Transformation der ES-Zellen mit dem Gen-Targeting-Konstrukt durch Elektroporation erfolgt die spezifische Integration des Konstruktes über die homologen Bereiche. Durch Injektion der ES-Zellen in Blastozysten werden chimäre Mäuse generiert. Alle Nachkommen dieser Chimären, die das modifizierte Allel tragen, sind genetisch identisch und unterscheiden sich somit nicht in ihrer Expression. Dies bedeutet, dass keine aufwendigen Analysen mehrerer Founder notwendig sind.

Durch diese zielgerichtete Methode zur Manipulation des Mausgenoms können vielfältige und komplexe Fragestellungen bearbeitet werden. Durch Deletion von gefloxten DNS-Sequenzen können Knockout Mäuse generiert und somit die Rolle der entsprechenden Proteine in der Zelle analysiert werden. Das Einfügen von Punktmutationen in endogene Gene ermöglicht subtile Veränderungen einzelner Proteindomänen, wodurch deren Funktion sowie eventuelle Interaktionspartner untersucht werden können (Single et al., 2000). Durch das Einfügen eines induzierbaren Systems über Gen Targeting konnte im Fall von SK3, einer Untereinheit eines Kalium-Kanals, die Transkription des endogenen Gens tTA-abhängig induzierbar gemacht werden (Bond et al., 2000).

1.3 Der ROSA26-Lokus

Der ROSA26-Lokus wurde 1991 von P. Sorriano und seinen Mitarbeitern über einen Genetrap identifiziert (Friedrich et al., 1991). ROSA steht hierbei für den Aufbau des verwendeten Genetrap Vektors (reverse orientation splice acceptor ß-gal). Ausgehend vom ROSA26-Promotor werden 2 Transkripte erzeugt (Abb.06), die sich durch alternatives Spleissen unterscheiden.

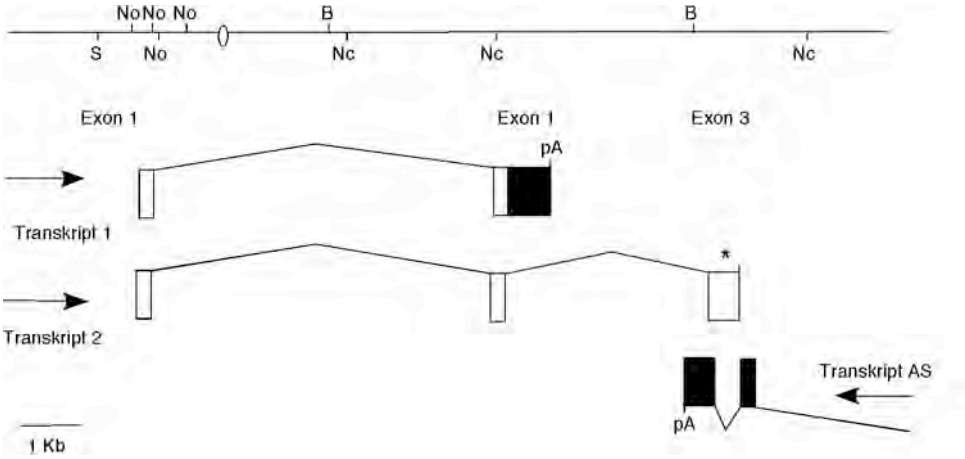

Abb.06: Schematische Darstellung des ROSA26-Lokus. Exons sind als Kästen dargestellt, die Orientierung der Transkripte durch Pfeile. Die Insertionsstelle des ursprüngliche Genetrap-Konstruktes ist durch eine Ellipse dargestellt. Das 3'-Ende von Exon 3 des Transkriptes2 ist nicht bekannt, das Exon ist durch ein Sternchen (*) gekennzeichnet. Restriktionsenzymseiten: B, *Bg*II; Nc, *Nco*I; No, *Not*I; S, *Sal*I; pA, poly(A)

Transkript 1 besteht aus zwei Exons, Transkript 2 aus drei Exons. Beide Transkripte enthalten Exon1 (130 bp) und den 5'-Bereich von Exon 2. Das 3'-Ende von Exon 3 des Transkript 2 ist nicht bekannt. Zusätzlich zu den beiden Sense-Transkripten wird ein Antisense-Transkript generiert. Das Antisense-Transkript (AS) überlappt nicht mit Transkript 1, jedoch über einen Bereich von 381 bp mit Transkript 2. Dieser überlappende Bereich liegt in der kodierenden Sequenz von Transkript AS. Währen die Transkripte 1 und 2 nicht kodieren, konnte für Transkript AS ein Kodierungspotential von 506 Aminosäuren ermittelt werden. Für keines der drei Transkripte ist eine bekannte Funktion bekannt. Ein Knockout der Transkripte 1 und 2 in der Maus zeigt keinen erkennbaren Phänotyp; für Transkript 3 liegen keine Knockout-Daten vor.

Der ROSA26-Lokus ist für Gen-Targeting sehr gut zugänglich, wie in vielen Beispielen gezeigt werden konnte (Soriano, P., 1999; Xiaohong, M., 1999; Srinivas, S., 2001; Possemato et al., 2002). Das erste Gen-Targeting in den ROSA26-Lokus wurde 1999 im Labor von P. Soriano durchgeführt. Für die Generation der Cre-Reporterlinie (R26R) wurde ein Konstrukt, bestehend aus einer gefloxten „Stop-Kassette“ (PGK:neo, 4xpA) und dem *ß*-Galactosidasegen, über homologe Rekombination unter Kontrolle des endogenen ROSA26-Promotors gebracht. Nach Deletion der „Stop-Kassette“ durch Verpaaren mit *Cre*-exprimierenden Mäusen wird vom endogenen ROSA26-Promotor aus startend ubiquitär *LacZ* exprimiert (Abb.07).

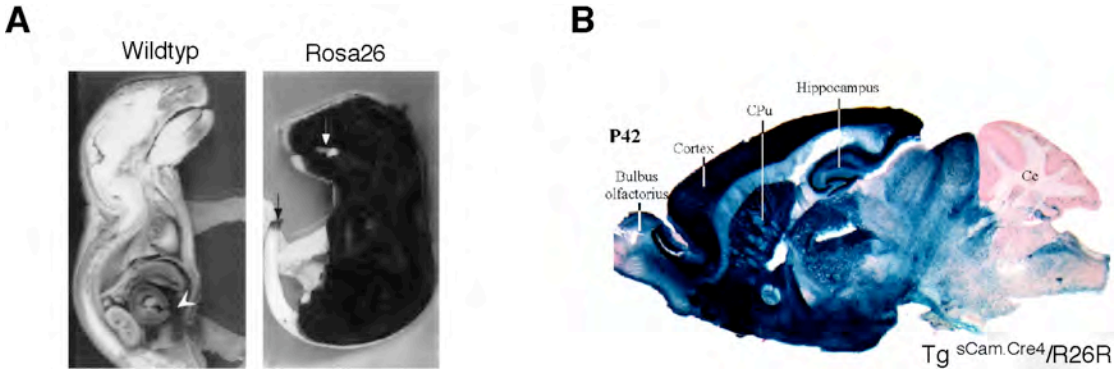

Abb.07: (A) ubiquitäre Expression von lacZ in neugeborenen Rosa26-Mäusen (Zambrowicz et al., 1997) Der weiße Pfeil im Wildtyp zeigt unspezifische Hintergrundfärbung. In der ROSA26-Maus zeigt der schwarze Pfeil wie weit X-Gal ins Gewebe penetriert. Der weiße Pfeil indiziert die Zunge, bei der X-Gal nicht ins Gewebe eindringen kann. (B) lacZ-Expression der R26R-lacZ-Reportermauslinie nach Vorderhirnspezifischer Deletion der Stop-Kassette.

1.4 Zielsetzung der Arbeit

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Expressionseigenschaften von induzierbaren Systemen zu charakterisieren, die in den ROSA26-Lokus integriert wurden, sowie iM2 und itTA exprimierende Aktivatorlinien zu etablieren. Hierfür sollten zwei Mauslinien generiert werden, bei denen durch Gen-Targeting Tet-induzierbare GFP-Expressionskassetten in den endogenen ROSA26-Lokus integriert wurden. Die Expressionsmodule beinhalten sowohl den Aktivator (iM2 bzw itTA) als auch den Responder GFP (grün fluoreszierendes Protein), der unter Kontrolle eines induzierbaren $tetO_5$:CMV-Minimalpromotors (im Folgenden CMV_m) exprimiert wird. Durch Charakterisierung von Induzierbarkeit und Expression des Aktivators bzw.

Responders, soll zum einen die Effizienz des ROSA26-Promotors analysiert werden, und zum anderen der Einfluss regulatorischer Elemente auf den CMV_m. somit soll festgestellt werden in wieweit sich dieser Lokus für die Integration von regulierbaren Fremdgenen eignet.

2. Ergebnisse

2.1 Gen-Targeting des ROSA26-Lokus

2.1.1 Aufbau des Gen Targeting-Konstruktes

Um die Induzierbarkeit von Fremdgenen im ROSA26-Genlokus zu testen, wurde über homologe Rekombination in ES-Zellen eine durch iM2 induzierbare GFP-Expressionskassette unter Kontrolle des endogenen ROSA26 Promotor gebracht. Zur Selektion der rekombinierten ES-Zellen enthält das Gen Targeting-Konstrukt (Abb.08) eine mit *loxP*-Sequenzen flankierte *neo*/*ura*-Selektionskassette. Zur Negativselektion nicht homologer Integrationsereignisse enthielt der Gen Targeting-Vektor das Diphteria Toxin-A (DT-A). Die Expressionskassette ist 5' von einem 1 kb kurzen sowie 3' von einem 4.3 kb langen, zur endogenen Zielsequenz, homologen Sequenzarm flankiert. Das verwendete Tetracyclin abhängige Expressionssystem ist wie folgt zusammengesetzt. Die regulatorischen Elemente bestehen aus dem Transkriptionsaktivator, einer humanisierten Version des M2 (iM2; J. Kim), sowie dem Responder, einer humanisierten Version des GFP-Gens (hGFP), welches unter Kontrolle des induzierbaren CMV Minimalpromotors (CMV_m) steht. Zur effizienteren Maturierung der mRNA wurde der für iM2 kodierenden Sequenz eine künstliche Exon/Intron-Struktur vorgeschaltet, die aus dem Tripartite leader (Logan, 1984) besteht. Nach homologer Rekombination wird iM2 ubiquitär konstitutiv unter Kontrolle des endogenen ROSA26 Promotors exprimiert. In Anwesenheit von Doxycyclin bindet iM2 an die Operatorsequenzen, die dem CMV_m vorgeschaltet sind und aktiviert die Expression des GFP-Reportergens.

2.1.2 Homologe Rekombination in ES-Zellen

Das Gen Targeting-Konstrukt (pROSA-iM2, B. Lacaye) wurde mit dem Restriktionsenzym *Kpn*I linearisiert und durch Elektroporation in R1 ES-Zellen (Nagy et al., 1993) transfiziert. Nach Selektion mit Geniticin (G418) wurden resistente ES-Zellkolonien isoliert und deren genomische DNS durch zwei aufeinanderfolgende PCR-Reaktionen auf das homologe Rekombinationsereignis hin untersucht. Bei

erfolgreicher homologer Rekombination wurde in einer versetzten PCR mit den Oligonukleotiden ROSA26-OUT und SA-OUT ein 1367 bp DNS-Fragment und nachfolgend mit den Oligonukleotiden ROSA26-IN und SA-IN ein 1243 bp DNS-Fragment amplifiziert.

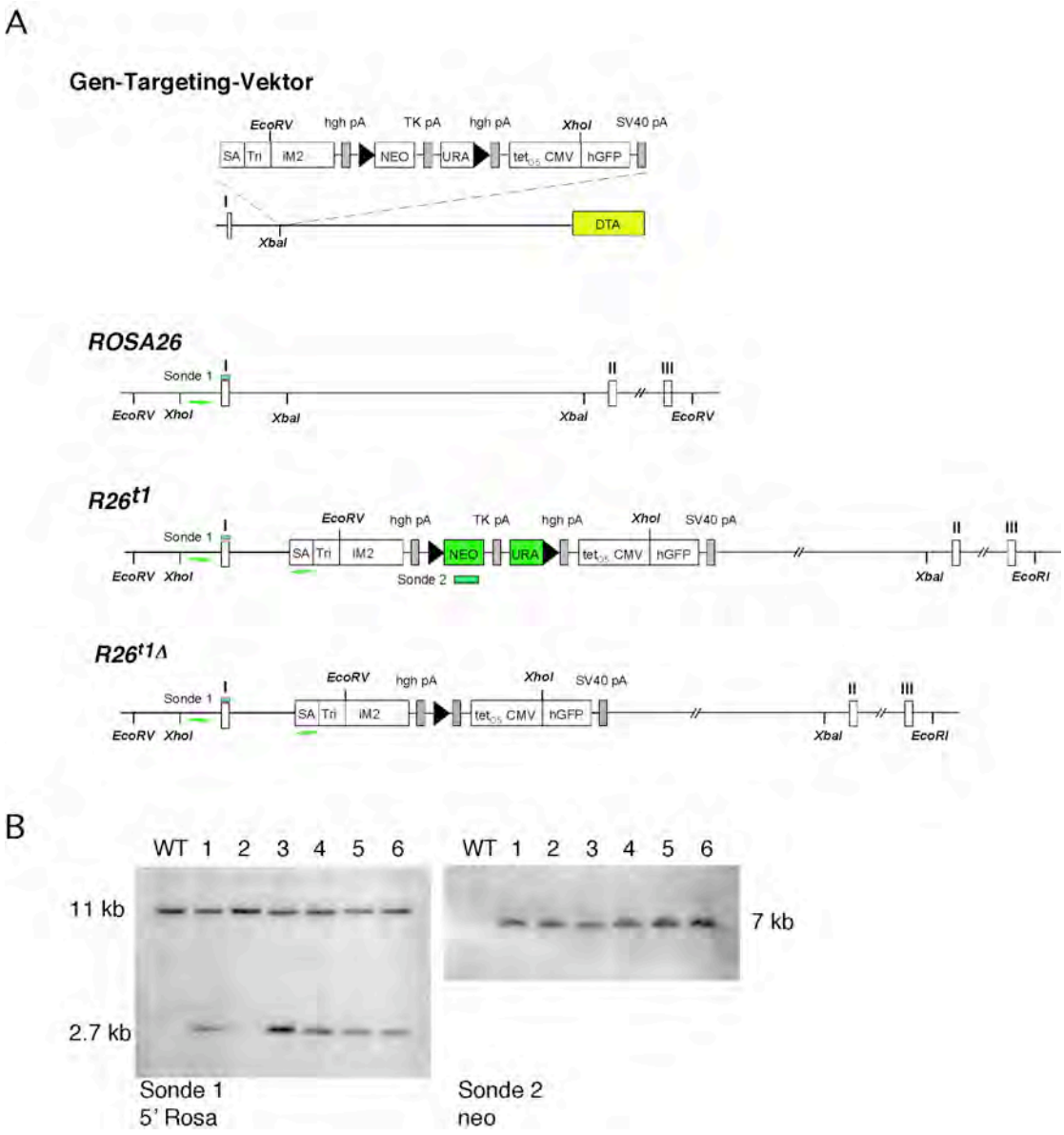

Abb. 08: Schematische Darstellung (A) des Targeting Vektors mit 3' des Exon 1 iM2, der loxP flankierten Selektionskasette sowie dem hGFP unter Kontrolle des induzierbaren CMV_m Minimalpromotors. (B) Wilttyp-Allel des ROSA26-Lokus (ROSA26) sowie des ROSA26 Allel nach erfolgter homologer Rekombination ($Rosa^{t1}$) und nach der Cre bedingten Deletion des $Rosa^{t1}$ zum $Rosa^{t1\Delta}$. Exons sind als Kästchen gezeichnet, die *loxP*-Elemente sind durch schwarze Dreiecke dargestellt. Primer werden durch grüne Pfeile, Sonden Für Southern Blot werden durch grüne Kästchen

gekennzeichnet. (C) Southern Blot von *EcoRV* verdauter genomischer DNS von 6 PCR-positiven ES-Zellklonen im Vergleich mit wildtyp ES-Zellen.

Von 200 analysierten ES-Zellklonen wurden sechs als homolog rekombiniert identifiziert, und für weitere Analysen expandiert. Zur Bestätigung der PCR-Ergebnisse wurde eine Southernblot-Analyse der genomischen DNS durchgeführt. Hierfür wurde die genomische DNS mit den Restriktionsenzymen *EcoRV* verdaut. Zur Detektion der entsprechenden DNS-Fragmente wurden ein 625 bp DNS Fragment aus dem Bereich des *neo*-gens (neo-Sonde), sowie ein 80 bp DNS Fragment aus dem 5'-Bereich des ersten Exons des ROSA26-Gens (ROSA 5'-Sonde) radioaktiv markiert.
Nach homologer Rekombination konnte mit der ROSA 5'-Sonde die WT-Bande (~11 kb) und eine 2,7 kb Bande für das mutante Allel nachgewiesen werden. Mit der neo-Sonde wurde in Wildtyp-DNS keine und für das $R26^{t1\Delta}$-Allel eine 7 kb Bande detektiert (Abb.08).

2.1.3 Induktion des iM2:GFP-Operons durch Doxycyclin in ES-Zellen

Um das induzierbare Expressionssystem nach homologer Rekombination auf seine Funktionalität hin zu testen wurden Induktionsexperimente in ES-Zellen durchgeführt. In HeLa Zellen wird eine volle Induktion von M2 bei einer Doxycyclin-Konzentration von 100ng/ml Medium erreicht (Baron et al., 2000). Dieser Wert wurde als Anhaltspunkt für die zur Induktion verwendeten Doxycyclin-Konzentrationen verwendet. Subconfluente ES-Zell Kulturen wurden für 48 Stunden mit Doxycyclin in den Konzentrationen 1, 10, 50, 100 und 200 ng/ml Medium inkubiert. Anschließend wurden die ES-Zellen am Fluoreszenzmikroskop bezüglich der Expression von GFP untersucht.

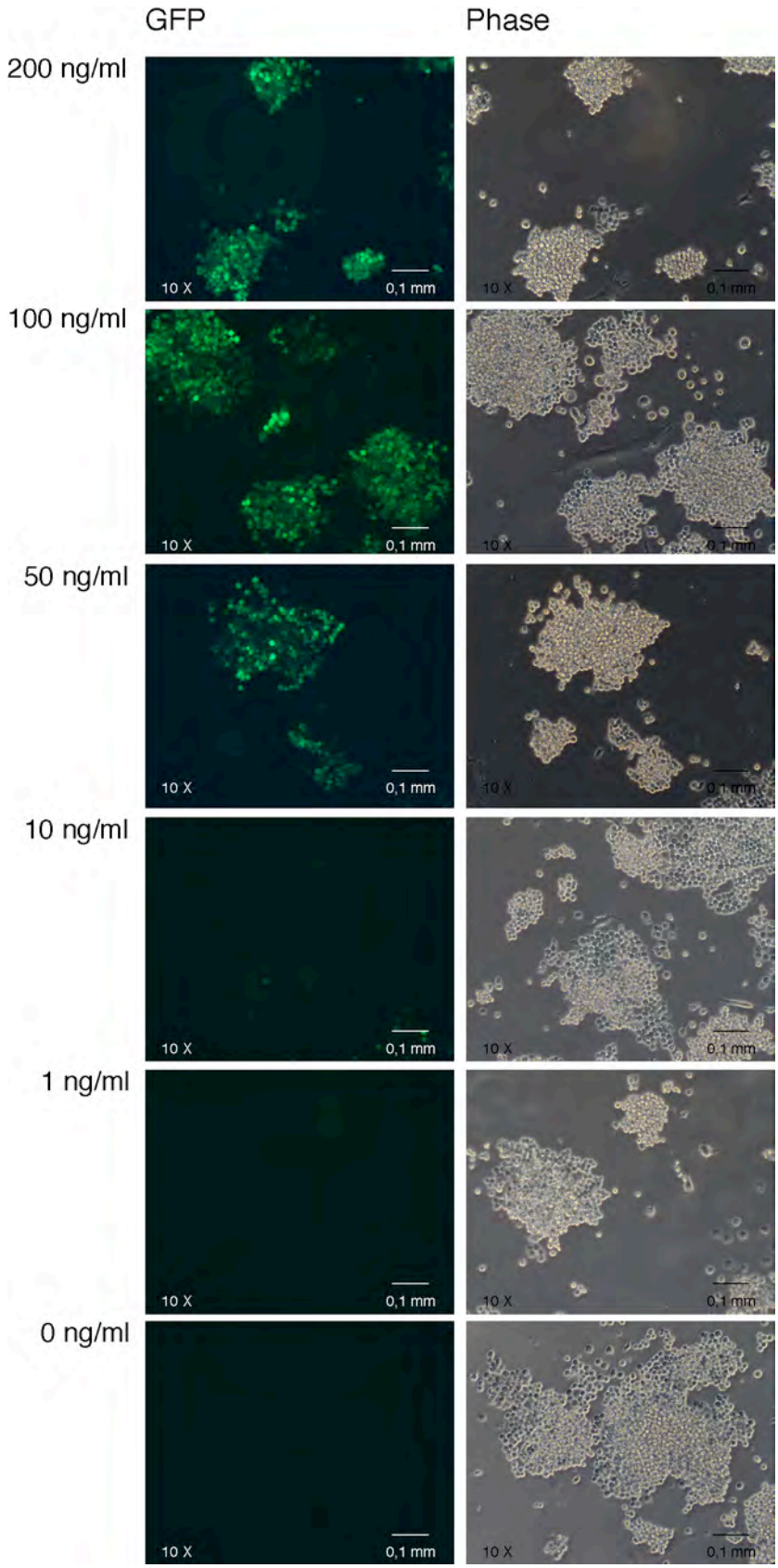

Abb.09: Subconfluente Embryonale Stammzellkulturen des Klones #64 wurden zur Aktivierung des ROSA26-Promotor kontrollierten iM2, für 48 Stunden mit Doxycyclin in den Konzentrationen 0, 1, 10,

50, 100 und 200 ng/ml inkubiert. Die Aufnahmen wurden für alle Konzentrationen bei gleicher Belichtungszeit durchgeführt und zeigen die Aktivierung der iM2-abhängigen GFP-Expression bei einer Konzentration von 50 ng/ml.

Wie in Abb.09 dargestellt, wurde ab einer Doxycyclin-Konzentration von 50 ng/ml die Induktion der GFP-Expression in ES-Zellen erreicht. Eine Konzentration von mehr als 100 ng/ml führt zu keiner weiteren Steigerung der GFP-Fluoreszenz. Diese Beobachtung entspricht den Ergebnissen einer Studie in Hela-Zellen (Baron et al., 2000), die eine maximale Induktion von M2 bei einer Doxycyclinkonzentration von 100 ng/ml zeigt. Ohne Zugabe von Doxycyclin, bzw. bei Konzentrationen unter 10 ng/ml, konnte keine GFP-Fluoreszenz detektiert werden. Dies weist darauf hin, dass keine basale Aktivität vorliegt und das Expressionssystem durch Doxycyclin aktivierbar ist.
Auffällig war eine Schwankung der GFP-Fluoreszenzintensitäten einzelner Zellen innerhalb einer Kolonie. Während einzelne Zellen eine starke GFP-Fluoreszenz aufwiesen, war bei anderen Zellen kaum Fluoreszenz zu erkennen. Da diese Inhomogenität der GFP-Expression auch in Subklonen vereinzelter Zellen zu beobachten war, kann man davon ausgehen, dass es sich nicht um eine Kontamination mit nicht rekombinierten Zellen handelt. Die beobachtete Varianz in der Fluoreszenz ist daher wohl auf eine uneinheitliche Expression der iM2:GFP-Kassette im ROSA26-Lokus zurückzuführen.

2.1.4 Etablierung und Genotypisierung der mutanten Mauslinien

Einer der korrekt rekombinierten ES-Zellklone (#64) wurde für die Injektion in C57Bl/6-Mausblastozysten eingesetzt. Daraus resultierende männliche Chimären wurden in den C57Bl/6-Hintergrund zurückgekreuzt. Keimbahntransmission konnte durch Weitergabe der Mutation in die nächste Generation festgestellt werden. Die mit dem ES-Zellklon #64 erzeugte Mauslinie wurde mit $R26^{t1}$ bezeichnet. Durch Kreuzung von heterozygoten $R26^{t1}$-Mäusen mit Cre-Deleter Mäusen (Schwenk et al., 1995) wurden Nachkommen erzeugt, in denen die *neo*/*ura*-Selektionskassette durch Cre-vermittelte Rekombination im frühembryonalen Stadium entfernt wurde. Die so entstandene Mauslinie wurde als $R26^{t1\Delta}$ bezeichnet.

Die Genotypisierung der Mäuse erfolgte durch PCR mit genomischer DNS aus kupierten Schwanzspitzen. Mit den Oligonukleotiden ROSA01, ROSA02 und ROSA07 konnten die R26(iM2-hGFP)- bzw. R26(iM2-hGFPΔneo)-Allele durch 916 bp PCR-Produkte vom 565 bp PCR-Produkt des Wildtyp-Allels unterschieden werden. Das *cre*-Allel der Cre-Deleter Mäuse wurde mit den *cre*-spezifischen Oligonucleotiden rspcre1 und rspcre2 durch ein 216 bp PCR-Produkt nachgewiesen (Abb10).

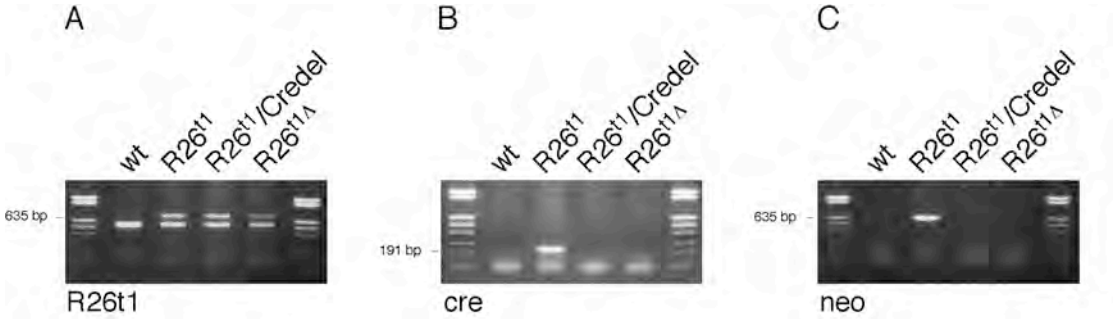

Abb.10: Genotypisierung der $R26^{t1}$- und $R26^{t1\Delta}$-Mauslinien. In A wurde mit den Primern ROSA01 und ROSA07 ein 565 bp Fragment des ROSA26-Lokus sowie mit den Primern ROSA01 und ROSA02 ein 916 bp Fragment des rekombinierten ROSA26-Allels. Für die PCR wurden die drei Primer in einen Reaktionsansatz gegeben. In (B) wurden die gleichen Genotypen mit den Primern rspcre1 und rspcre2 analysiert. Das 216 bp Fragment bei $R26^{t1}$/Credel stammt spezifisch vom Cre-Transgen der Cre-Deleter Mäuse. In (C) zeigt das mit den Primern rspneo4 und rspneo5 amplifizierte 600 bp Fragment die Anwesenheit der neo/ura-Selektionskassette in $R26^{t1}$-Mäusen.

2.2 Expressionsanalyse heterozygoter $R26^{t1}$- und $R26^{t1\Delta}$-Mäuse

2.2.1 Analyse der iM2-Transkripte in heterozygoten $R26^{t1\Delta}$-Mäusen

Durch Southernblot Analyse genomischer DNS wurde bereits die Integration der iM2:GFP-Expressionskassette in den ROSA26-Genlokus gezeigt. Durch Analyse des vom ROSA26-Promotor startenden Transkriptes in $R26^{t1\Delta}$-Mäusen soll nun der korrekte Spleissvorgang vom endogenen ROSA26-Promotor auf das erste Exon geprüft werden. Mit diesem Experiment soll ein durch die Integration des Expressionsmoduls möglicherweise verursachtes, fehlerhafes Spleissen der RNS sichtbar gemacht werden. Hierfür wurde Gesamt-RNS von $R26^{t1\Delta}$-Mäusen isoliert und mittels eines 5' RACE-Protokolles die 5'-Sequenz der iM2-mRNS amplifiziert. Das

so erhaltene Fragment wurde über TOPO-Klonierung kloniert und anschließend sequenziert

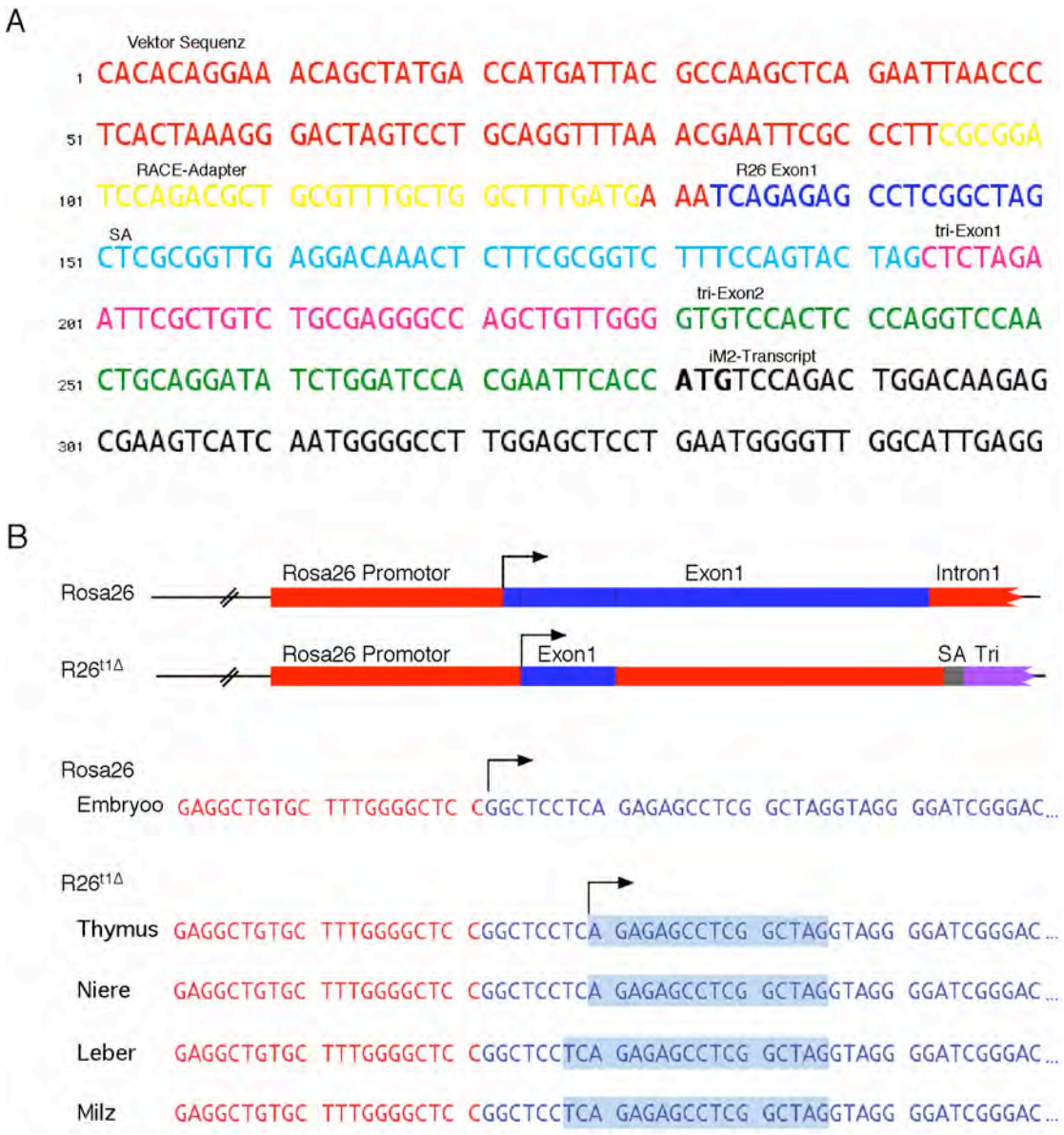

Abb.11: (A) zeigt die Sequenzen der subklonierten RACE-Fragmente. Die Vektorsequenzen sind in rot, der RACE-Adapter in gelb, Exon1 der ROSA26-Transkripte 1 und 2 in dunkelblau, SA in Hellblau, 5' und 3' Exon des Tripartiteleaders in hellrot bzw. grün, das iM2-Transkript in schwarz dargestellt. Translationsstartes (ATG) des iM2-Transkriptes ist in fett gedruckt. In (B) sind schematisch (oben) und als Sequenz die unterschiedlichen Exon/Intronstruktur in der Rosa26-Mauslinie (P. Soriano) und in R26$^{t1\Delta}$-Mäusen dargestellt. Rot sind die ROSA26-Promotorsequenzen und Intronsequenzen, Exon1 ist blau dargestellt. Die verkürzte Exonsequenz der R26$^{t1\Delta}$-Mäuse ist hellblau unterlegt. Der Spleissakzeptor (SA) ist grau und der Tripartite-leader violet.

Die Sequenzanalysen der vom ROSA26-Promotor startenden, klonierten Transkripte aus Leber, Niere, Thymus und Milz hemizygoter $R26^{t1\Delta}$-Mäuse zeigten, dass in allen analysierten Geweben korrekte iM2-Transkripte vorliegen (Abb.11 A). Zu sehen sind, ausgehend vom 5'-RACE-Adapter, das Exon1 des ursprünglichen ROSA26 Transkriptes, Spleiss-Donor und Spleiss-Akzeptor-Sequenzen, die ein korrektes Spleissen des ersten ROSA26-Introns sowie des künstlichen Tripartite leaders zeigen, sowie die 5'-Sequenz des iM2-Transkriptes. Beim Vergleich der in der PubMed-Datenbank publizierten Sequenz des ROSA26-Transkriptes mit den hier analysierten RACE-Sequenzen, fallen Unterschiede beim Spleissen des ersten Exons auf. Die von uns als Exon1 ermittelte Sequenz (Abb.11) deckt 14-16 bp im 5'-Bereich der in der Datenbank als Exon1 bezeichneten Sequenz (130 bp) ab. Es ist nicht davon auszugehen dass dies einen Einfluss auf die Expression des iM2 ausübt, da in allen vier analysierten Geweben das korrekte Spleissen des iM2-Transkriptes gezeigt werden konnte.

2.2.2 Induzierbare GFP-Expression in heterozygoten $R26^{t1}$- und $R26^{t1\Delta}$-Mäusen

Um iM2-abhängige GFP-Expression zu induzieren wurde 14 Tage alten (P14) hemizygoten $R26^{t1}$- bzw. $R26^{t1\Delta}$-Mäusen für einen Zeitraum von 3 Wochen Doxycyclin (2 g/l) im Trinkwasser verabreicht. Anschließend wurde die GFP-Expression in verschiedenen Geweben durch Westernblot-Analyse mit spezifischen Antikörpern analysiert.

2.2.2.1 Periphere Gewebe

Für Muskel, Thymus und Leber wurden Proteinextrakte induzierter hemizygoter $R26^{t1\Delta}$- bzw. $R26^{t1}$-Tiere analysiert, um sicherzustellen, dass die GFP-Expression nicht auf eine basale Aktivität der iM2-GFP-Kassette zurückzuführen ist (Abb.12 A). Zusätzlich wurden Extrakte von nichtinduzierten Mäusen analysiert. In diesen Proben ist keine GFP-Expression zu erwarten, da iM2 in Abwesenheit von Doxycyclin nicht an die Operatorsequenz binden kann. Allerdings ist eine Aktivierung des CMV_m nach Integration in den ROSA26-Lokus durch endogene regulatorische Elemente nicht auszuschließen. Als Negativkontrolle wurden Gewebsextrakte von wildtyp-Mäusen verwendet.

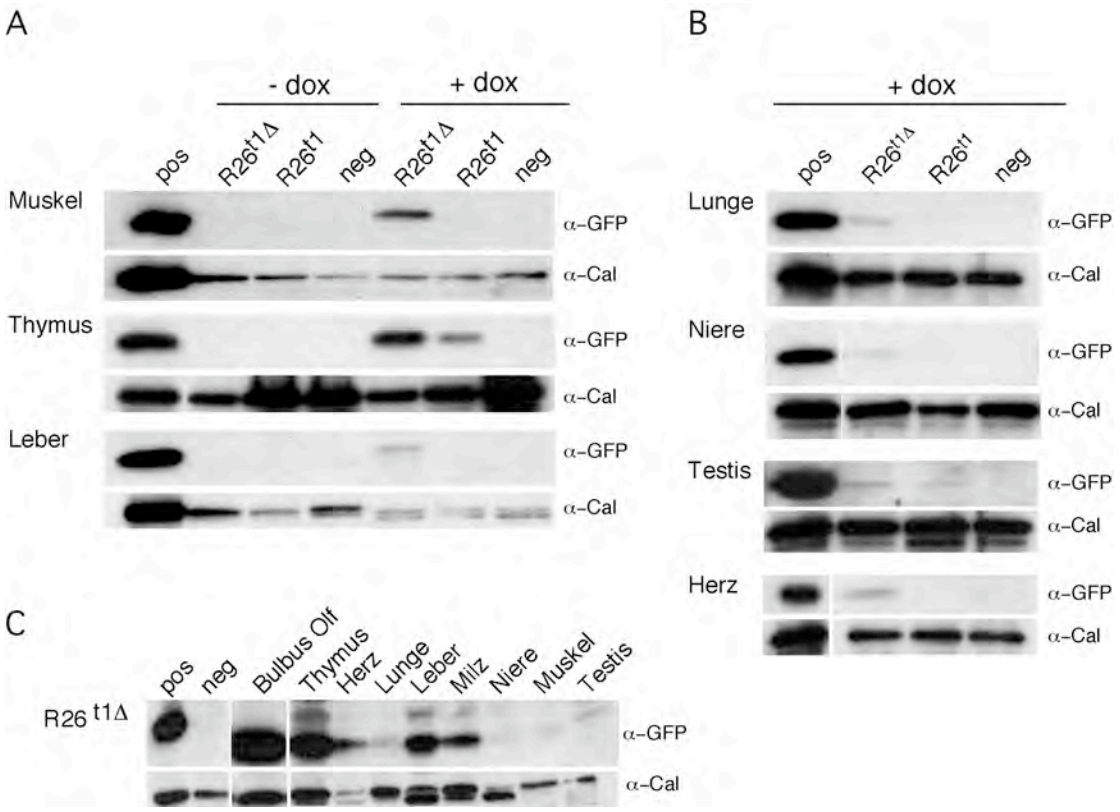

Abb.12: Wesern Blot-Analyse der GFP-Expression von Geweben der R26$^{t1\Delta}$- und R26^{t1}-Mäuse. In (A) sind Proteinextrakte von Muskel, Thymus und Leber R26^{t1-} und R26^{t1}-Mäusen, die unter Dox gehalten wurden miteinander, bzw. mit Mäusen die kein Dox erhielten, verglichen. Als Negativkontrolle wurden Extrakte von Wildtypmäusen verwendet. (B) zeigt Western Blot-Analysen von Lunge, Niere, Testis und Herz. Extrakte nicht-induzierter R26$^{t1\Delta}$-Mäuse wurden als Negativkontrolle aufgetragen. In (B) wurden zum Vergleich gewebsspezifischer Variationen der Expressionsstärke Proteinextrakte verschiedener Gewebe einer heterozygoten R26$^{t1\Delta}$-Maus aufgetragen.

In nicht induzierten R26$^{t1\Delta}$-Mäusen konnte keine GFP-Expression nachgewiesen werden. Dies zeigt, dass keine basale Aktivität des Systems vorliegt und die Insertion der Expressionskassette in den ROSA26-Lokus nicht zur Aktivierung des CMV$_m$ führt. Bei der Westernblot-Analyse von Lunge, Milz, Testis und Skelettuskel (Abb.12 B) wurden als Negativkontrolle Extrakte von nicht induzierten hemizygoten R26$^{t1\Delta}$-Mäusen verwendet.

Nach Induktion durch Doxycyclin konnte bei der R26^{t1}-Linie GFP nur in Thymusextrakten detektiert werden, wohingegen bei R26$^{t1\Delta}$-Mäusen in allen analysierten peripheren Geweben GFP-Expression nachgewiesen werden konnte. Da sich beide Mauslinien genetisch nur durch die *neo*/*ura*-Selektionskassette

unterscheiden, ist die fehlende Expression von GFP in den R26^{t1}-Geweben auf einen durch den Selektionsmarker (*neo/ura*) hervorgerufenen Silencing-Effekt zurückzuführen. Die Auswirkung dieses Effekts ist abgängig von dem untersuchten Gewebe. In Abb.12 (C) sind eindeutige Unterschiede in den Expressionsniveaus unterschiedlicher Gewebe von R26$^{t2\Delta}$-Mäusen zu erkennen. Diese Heterogenität scheint auf gewebsspezifische Unterschiede in der Stärke des ROSA26-Promotors hinzuweisen.

2.2.2.2 Gehirn

Die Analyse unterschiedlicher Gehirnregionen zeigte bei R26$^{t1\Delta}$-Mäusen nach Induktion keine GFP-Expression (Abb.13). Dies steht im Gegensatz zu den Beobachtungen in den anderen untersuchten Gewebe. Das starke GFP-Signal in Extrakten des Bulbus Olfactorius lässt auf eine sehr hohe GFP-Expression schließen (Abb.13 C).

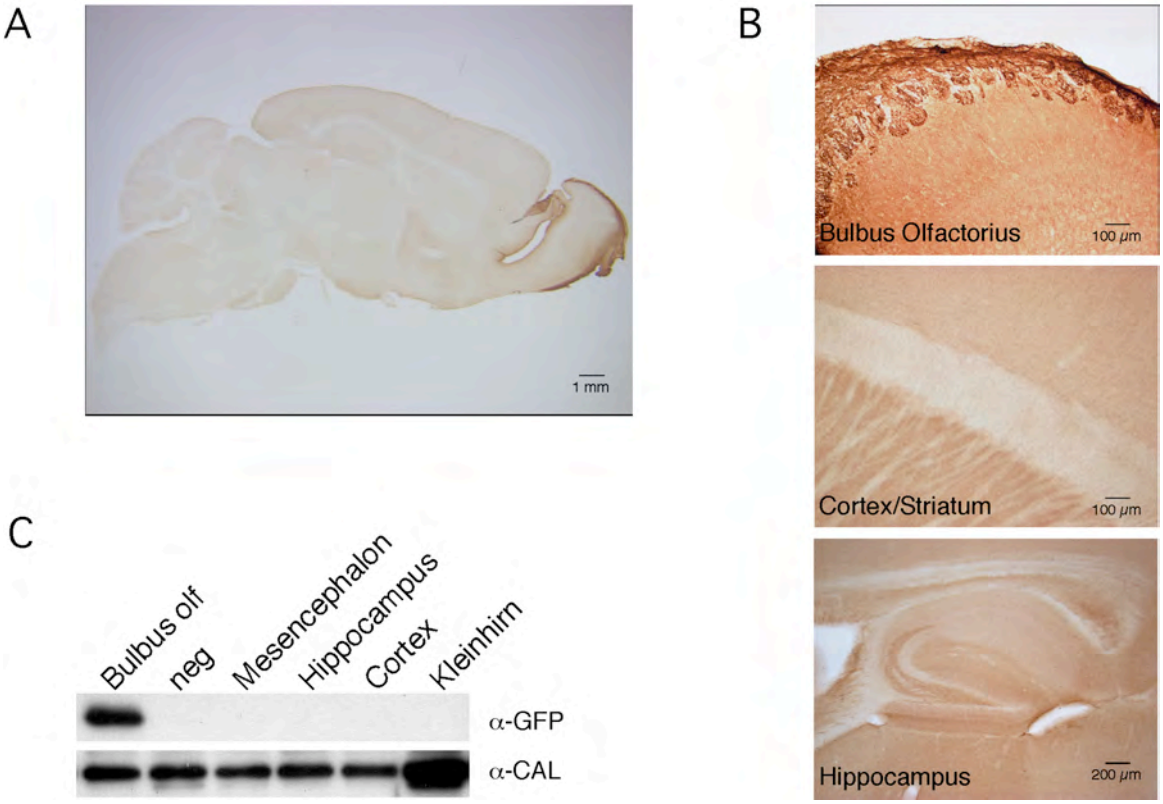

Abb.13: Analyse der GFP-Expression im Gehirn. In (A) ist die Übersichtsaufnahme eines Sagitalschnittes von heterozygoten R26$^{t1\Delta}$-Mäusen nach immunohistologischer Analyse mit einem für GFP spezifischen Antikörpers gezeigt. Ausschnittsvergrößerungen (B) zeigen die GFP-positiven

Glomeruli sowie Cortex/Striatum und Hippokampus. (C) zeigt eine Westernblotanalyse unterschiedlicher Gehirnregionen. Als Negativkontrolle wurden Proteinextrakte uninduzierter heterozygoter R26t$^{1\Delta}$-Mäuse verwendet.

Immunohistologische Färbungen in Sagittalschnitten (Abb.13 B) zeigen jedoch, dass das Signal der Westernblot-Analyse nicht von den Zellen des Bulbus Olfactorius selbst, sondern von den Glomeruli stammt. Dort findet die synaptische Verschaltung der Axone der olfaktorisch-sensorischen Neurone mit den Dendriten der Mitralzellen statt. Da keine GFP-positiven Zellkörper der Mitralzellen im Bulbus olfactorius detektiert werden konnten, ist das starke GFP-Signal in den Glomeruli auf die Axone der olfaktorisch-sensorischen Neuronen zurückzuführen. Der Frage warum im Gehirn hemizygoter R26^{t1}-Mäuse eine Induktion des iM2:GFP-Operons durch Doxycyclin nicht möglich war, wird an anderer Stelle dieser Arbeit in einem separaten Kapitel nachgegangen.

2.2.3 Induzierbare GFP-Expression in homozygoten R26$^{t1\Delta/t1\Delta}$-Mäusen

Zur Untersuchung der GFP-Expression in homozygoten R26$^{t1\Delta/t1\Delta}$-Mäusen wurden Proteinextrakte einiger Gewebe mit denen von hemizygoten Mäusen in Westernblots und immunohistologischen Analysen verglichen.

2.2.3.1 Periphere Gewebe

Wie in Abb.14 zu sehen ist, führt die Verdopplung des iM2-exprimierenden Allels zu einer Erhöhung der GFP-Expression in peripheren Geweben. Die Expressionszunahme war gewebsspezifisch unterschiedlich stark ausgeprägt. Besonders deutlich ist die Erhöhung der GFP-Expression im Skelettmuskel zu erkennen, ähnlich deutlich wird dies in der Testis. Bei Thymus und Milz ist nahezu kein Unterschied zwischen hemizygoten und homozygoten Mäusen festzustellen.

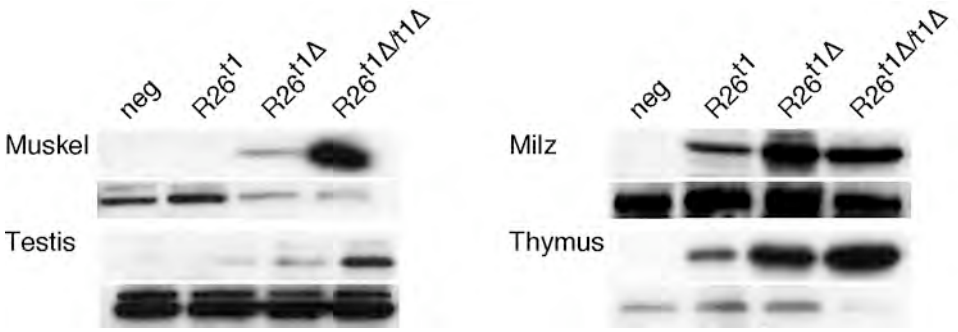

Abb.14: vergleichende Westernblot-Analyse hetero- und homozygoter $R26^{t1\Delta}$-Mäuse. Die GFP-Expression in Muskel, Testis, Milz und Leber hetero- und homozygoter $R26^{t1\Delta}$- und $R26^{t1}$-Mäuse wurden durch Westernblotanalyse mit einem α-GFP-Antikörpers bestimmt. Als Kontrolle wurden Extrakte von heterozygoten $R26^{t1\Delta}$-Mäusen verwendet. Calnexin (α-Cal) wurde als Marker für die aufgetragene Proteinmenge detektiert.

Bei Testis und Skelettmuskel handelt es sich in hemizygoten Mäusen um relativ schwach expremierende Gewebe, während Thymus und Milz in hemizygoten Tieren gute Expressionsniveaus aufweisen. Dies deutet darauf hin, dass in Thymus und Milz bereits in hemizygoten Mäusen ein Maximum der iM2 Induktion erreicht wurde, das auch durch Erhöhung der Gendosis nicht zu steigern ist.

2.2.3.2 Gehirn

Wie in Abb.15 anhand schwacher Signale in Vorderhirn- und Hippokampusextrakten homozygoter $R26^{t1\Delta}$-Mäuse zu erkennen ist, kann durch Erhöhung der iM2-Gendosis die Induktion in Neuronen erreicht werden. Immunohistologische Analysen sagittaler Hirnschnitte (Abb.15 A) homozygoter $R26^{t1\Delta}$-Mäuse zeigen GFP-positive Neuronen. Allerdings ist die Induktion nur in definierten neuronalen Populationen wie Striatum, Hypothalamus und Hirnstamm zu erkennen. In weiten Bereichen des Gehirns ist auch in homozygoten Tieren keine GFP-Expression zu detektieren. In Hirnschnitten hemizygoter Mäuse konnte keine GFP-positiven Neurone detektiert werden (Abb.13).

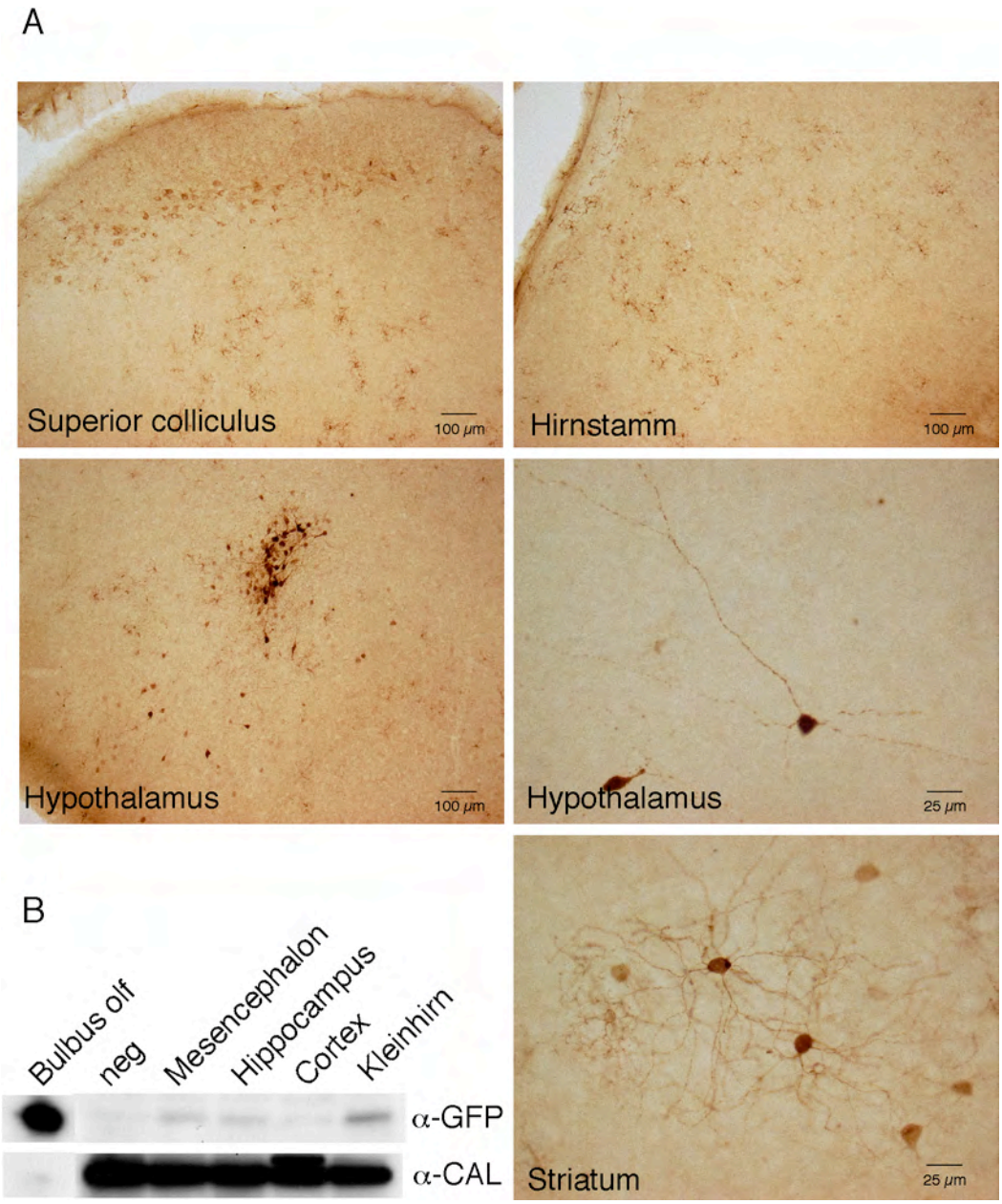

Abb.15: Expression von GFP im Gehirn homozygoter R26$^{t1\Delta}$-Mäuse. In (A) sind in Ausschnitsvergrößerungen immunohistologischer Färbungen GFP-exprimierende Neuronale Zellpopulationen induzierter homozygoter R26t1$^{\Delta/t1\Delta}$-Mäuse gezeigt. (B) Western Blot-Analyse von Proteinextrakten aus Mesencephalon, Hippokampus, Cortex und Kleinhirn.

2.2.4 Auswirkung des Induktionsszeitpunktes auf die GFP-Expression

Bei der Anwendung induzierbarer Systeme ist es von Bedeutung, dass eine Induktion zu jedem gewünschten Zeitpunkt zu vergleichbarer Expressionsstärke führt. Aus diesem Grund wurde hemizygote R26$^{t1\Delta}$-Mäusen zu unterschiedlichen Zeitpunkten Doxycyclin verabreicht. Die Doxycyclingabe wurde bereits zu Beginn der

Verpaarung, also noch vor der Embryonalentwicklung, bei P0 und P21 begonnen. Die Analysen wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten, bei P0, P14, P21 und P42, durchgeführt (Abb.16).

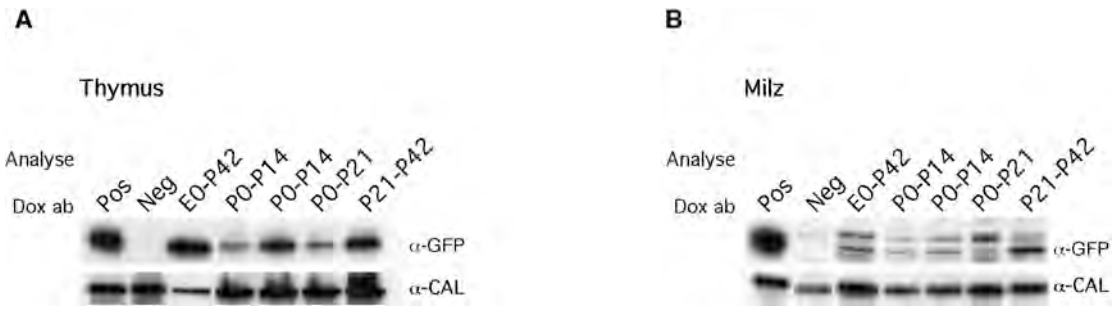

Abb.16: Um Auswirkungen von Dauer und Zeitpunkt der Dox-Zugabe auf die Expressionsstärke zu untersuchen wurden heterozygote R26t$^{1\Delta}$-Mäuse zu unterschiedlichen Zeitpunkten mit Doxycyclin behandelt. Proteinextrakte aus Thymus (A) und Milz (B) wurden durch Westernblotanalyse mittels eines α-GFP-Antikörpers auf GFP-Expression analysiert. Als Ladekontrolle wurde Calnexin mit einem gegen gerichteter Antikörper (α-Cal) detektiert.

Extrakte von Thymus (Abb.16 A) und Milz (Abb.16 B) der induzierten Mäuse wurden in Westernblot-Analysen miteinander verglichen. Hierbei wurde eine deutliche Heterogenität der GFP-Expressionshöhe sichtbar. Allerdings sind die unterschiedlichen Expressionsspiegel nicht, wie zu erwarten wäre, mit dem Zeitpunkt der Induktion korrellierbar. Im Folgenden werden die beobachteten Unterschiede der GFP-Expression bezüglich Induktionszeitpunkt und Induktionsdauer für Thymus und Milz vergleichend angeführt. Im Thymus (Abb.16 A) ist die Expression am stärksten, wenn die Doxycyclingabe bereits während der gesamten Embryonalentwicklung bis hin zum Zeitpunkt der Analyse bei P42 erfolgte. Die Tiere, bei denen Doxycyclin von P0 bis P14 gegeben wurde, sind in ihrer Expression insgesamt schwächer und unterscheiden sich in der Expressionsstärke. Die Expressionsstärke des schwächer exprimierenden Tieres entspricht dem von P0 bis P21 induzierten Tier. Die Expressionsstärke des stärker exprimierenden Tieres ist vergleichbar mit der von P21 bis P42 induzierten Maus. Betrachtet man die GFP-Spiegel der gleichen Tiere in den Milzextrakten, zeigt das Tier, welches von P21 bis P42 induziert wurde, ebenfalls relativ hohe Expression. Bei dem Tier, das über den längsten Zeitraum mit Doxycyclin behandelt wurde, ist das Expressionsniveau im Vergleich dazu leicht reduziert, aber deutlich über der Expression in den drei Tieren die Doxycyclin ab P0

erhalten haben. Im Gegensatz zu den Ergebnissen der Analyse der Thymusextrakte ist in der Milz kein Unterschied zwischen den von P0 bis P14 induzierten Tieren zu erkennen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass sowohl Zeitpunkt wie Dauer der Doxycyclinzugabe keine erkennbaren Auswirkungen auf die Expressionsstärke zu haben scheinen. Allerdings variiert die GFP-Expression abhängig vom Gewebe und von Maus zu Maus.

2.2.5 Analyse des inhomogenen Expressionsprofils der peripheren Gewebe

Die Ergebnisse der vorangegangenen Experimente lassen eine Inhomogenität des GFP-Expressionsniveaus nicht nur zwischen den einzelnen Geweben einer Maus, sondern auch zwischen den gleichen Geweben unterschiedlicher Mäuse erkennen. Im Folgenden wurden, um diese Inhomogenität näher zu betrachten, verschiedene hemizygote R26$^{t1\Delta}$-Mäuse durch Westernblot Analyse untereinander verglichen (Abb.17).

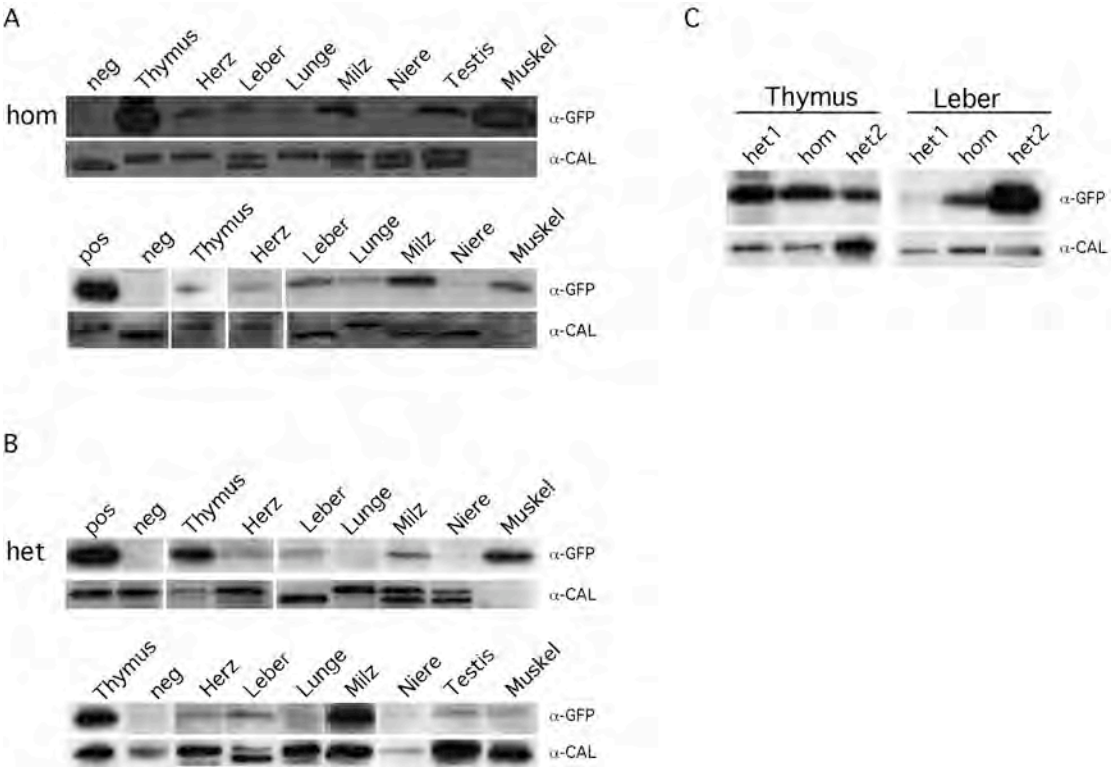

Abb.17: Westernblot Analyse der GFP-Expression in Thymus, Herz, Leber, Lunge, Milz, Niere, Testis und Muskel von heterozygoten (A) und homozygoten (B) R26$^{t1\Delta}$-Mäusen. In (C) ist die GFP-

Expression in Extrakte von Thymus und Leber zweier heterozygoter und einer homozygoter R26$^{t1\Delta}$-Mäusen im Westernblot verglichen. Calnexin wurde als Marker für die aufgetragene Proteinmenge detektiert.

Obwohl keine Beeinflussung der Expression ausgehend von Zeitpunkt und Dauer der Doxycyclinapplikation vorzuliegen scheint, wurden für diese Experimente alle Tiere einheitlich bereits während der gesamten Embryonalentwicklung bis zum Zeitpunkt der Analyse unter Doxycyclin gehalten. Vergleicht man verschiedene Mäuse im Westernblot, so wird ein typisches Expressionsprofil für hemi- bzw. homozygote Mäuse deutlich. Bei heterozygoten Tieren ist immer starke GFP-Expression im Thymus und kaum GFP-Expression in der Niere zu sehen. Milz und Leber hingegen zeigen Schwankungen in der GFP-Expressionsstärke (Abb.17 B). Ähnliches lässt sich auch bei homozygoten Tieren beobachten. Dort ist eine erhöhte Expression in Testis und die bereits erwähnte überproportional erhöhte Expression im Skelettmuskel gegenüber hemizygoten Tieren auffällig. In Einzelfällen kommt es zu mitunter starken Abweichungen dieses generalisierten Expressionsprofils. In Abb.17 C ist exemplarisch eine solche Abweichung gezeigt. Aufgetragen sind Extrakte zweier hemizygoter und einer homozygoter R26$^{t1\Delta}$-Maus (het1, hom und het2). In den Thymusextrakten ist zwischen het(1) und hom kein Unterschied der Expressionsstärke zu sehen, het(2) zeigt erniedrigte Expressionsniveaus. Dies entspricht den bereits erwähnten individuellen Unterschieden bezüglich des Expressionsniveaus. Betrachtet man die Leberextrakte der gleichen Tiere, so sieht man erwartungsgemäß eine erhöhte GFP-Expression in hom verglichen mit het(1). Vergleicht man hom jedoch mit het(2), so exprimiert het(2) deutlich stärker als hom. Diese außerordentlich starke Expression von het(2) beschränkt sich auf die Leber. Im Thymus ist, wie bereits erwähnt, die Expression im Vergleich zu hom aber auch zu het(1) sogar reduziert.

Diese individuellen Unterschiede des Expressionsniveaus sind ebenfalls in R26^{t1}-Mäusen erkennbar. In Abb.12 ist lediglich in Thymusextrakten eine GFP-Expression detektierbar, in Abb.14 hingegen ist GFP ebenfalls in Milz und Testis nachzuweisen, wobei die Expressionsstärke unter der von R26$^{t1\Delta}$-Mäusen bleibt.

Zusammenfassend lässt sich über die Expression des ROSA26-CMVm:iM2 Systems in den peripheren Geweben sagen, dass nach Deletion der *neo*/*ura*-Selektionskassette in allen analysierten peripheren Geweben eine durch Doxycyclin induzierte, iM2-

abhängige GFP-Expression erreicht werden konnte. Gewebsabhängig werden dabei unterschiedliche Expressionsniveaus erreicht, die wahrscheinlich gewebsspezifische ROSA26-Promotorstärken reflektieren. Die beobachteten Abweichungen einzelner Tiere vom allgemeinen Expressionsprofil der $R26^{t1\Delta}$-Linie sind weder mit dem Geschlecht, dem Alter, noch mit Dauer und Zeitpunkt der Induktion korrellierbar. Zur Zeit ist es unklar, wie diese Schwankungen zustande kommen.

2.3 Expressionsanalyse von ROSA26-CMV_m:iM2 im Gehirn

Aus den bisher angeführten Experimenten geht hervor, dass eine Induktion der GFP-Expression durch iM2 im Gehirn bei hemizygoten $R26^{t1\Delta}$-Mäusen nicht und in homozygoten Tieren nur bedingt möglich ist. In den folgenden Experimenten wurden verschiedene Faktoren untersucht, die hierfür verantwortlich sein können.

2.3.1 Transaktivierung

In den bisherigen Experimenten konnte in hemizygoten $R26^{t1\Delta}$-Mäusen keine iM2-abhängige GFP-Expression im Gehirn von $R26^{t1\Delta}$-Mäusen induziert werden. Dies kann bei dem hier beschriebenen Expressionssystem, das sowohl Aktivator (ROSA26:iM2) als auch Responder (CMV_m:GFP) in einer Expressionskassette vereinigt, durch Beeinträchtigung beider oder auch nur eines der Elemente verursacht werden. In allen bisherigen Experimenten wurden Aktivator bzw. Reponder gemeinsam analysiert, was keine Differenzierung ermöglichte. Für die folgenden Experimente wurden $R26^{t1\Delta}$-Mäuse mit transgenen Mauslinien verpaart, welche entweder Responder bzw. Aktivator von anderen Genloci exprimieren, um so die Eigenschaften von R26:iM2 bzw. CMV_m:GFP getrennt voneinander analysieren zu können.

2.3.1.1 Transaktivierung eines zweiten Responders durch Rosa26:iM2

Durch Verpaarung von $R26^{t1\Delta}$-Mäusen mit LC1-Reportermäusen (Schönig et al., 2002) konnte ROSA26:iM2-abhängige Genregulation unabhängig von dem im ROSA26-Lokus integrierten CMV_m analysiert werden. Die LC1-Linie exprimiert bidirektional unter Kontrolle eines induzierbaren CMV_m-Promotors die beiden Gene Luciferase und Cre. In doppeltransgenen Nachkommen wirkt ROSA26:iM2 nach

Induktion durch Doxycyclin sowohl auf CMV_m:GFP im ROSA26-Lokus als auch auf den CMV_m-Promotor im LC1-Lokus, was zur Expression aller drei Gene (*GFP*, *Luc* und *Cre*) führt (Abb.18 A).

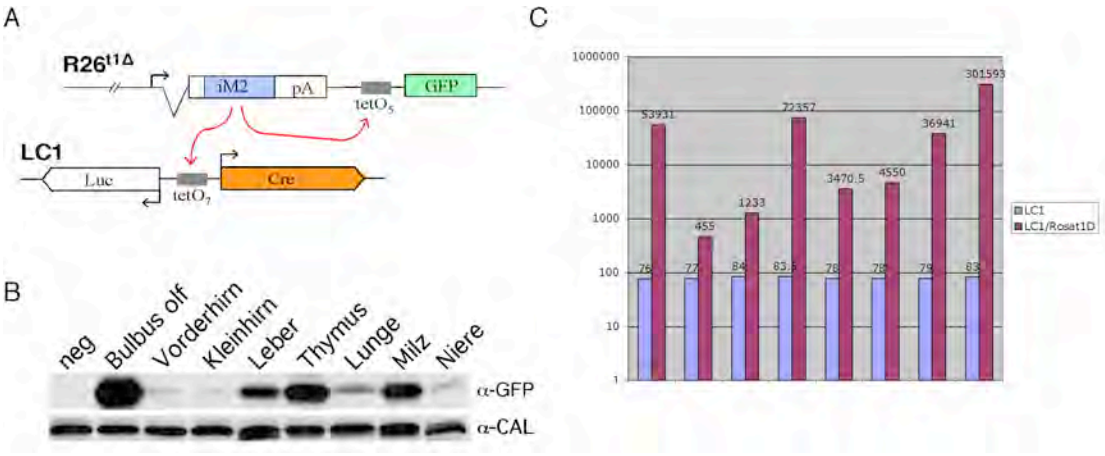

Abb.18: Schematische Darstellung (A) der GFP-Expression im ROSA26-Lokus, sowie Cre- und Luc-Expression im LC1-Lokus. Analyse von Proteinextrakten aus Bulbus olfactorius, Kleinhirn, Leber, Thymus, Lunge, Milz und Niere doppelttransgener Mäuse bezüglich der GFP-Expression durch Westernblot Analyse (B) bzw. Messung der Luciferaseaktivität (C).

Von Nachkommen, welche die Transgene beider Mauslinien tragen, wurde Luciferaseaktivität in Proteinextrakte verschiedenener Gewebe gemessen. Als Negativkontrolle wurden Extrakte von nicht-induzierten Mäusen verwendet. Wie in Abb.18 C zu sehen ist, konnte in allen untersuchten peripheren Geweben Luciferaseaktivität nachgewiesen werden. Eine Ausnahme hierbei sind jedoch Extrakte des Vorder- und Kleinhirns, in denen keine Enzymaktivität zu detektieren war. Wie bereits zuvor bei der Analyse der GFP-Expression in den peripheren Geweben beobachtet wurde, variieren auch hier die Expressionsniveaus zwischen den einzelnen Geweben. Vergleicht man das Expressionsprofil ausgehend von der LC1-Linie mit dem im ROSA26-Lokus integrierten CMV_m:GFP-Responder, so sind einige Unterschiede zu sehen. Während in Westernblot Analysen bei CMV_m:GFP die höchste GFP-Expression im Bulbus Olfactorius zu erkennen ist, wird Luciferase vom LC1-Lokus am stärksten in der Niere exprimiert (Abb.18 B).

2.3.1.2 Transaktivierung des Rosa26:CMV$_m$ durch tg-tTA

Epigenetische Faktoren wie DNS-Methylierung und Histon Deacetylierung können zu einem Silencing des CMV$_m$-Promotors führen und somit ein Grund für die schlechte Induzierbarkeit der R26$^{t1\Delta}$-Mäuse sein. Um die Zugänglichkeit des in den ROSA26-Lokus intergrierten CMV$_m$ zu prüfen, wurden heterozygote ROSA$^{t1\Delta}$ -Mäuse mit Tieren einer transgenen Mauslinie verpaart, die tTA unter Kontrolle des vorderhinspezifischen CaMKII-Promotors exprimiert (KT1, Mayford, M., 1996) (Abb.19 A). Die Abwesenheit von Doxycyclin ermöglichte tg-tTA induzierte GFP-Expression, die nicht von ROSA26:iM2, sondern ausschließlich vom KT1-Transgen aktiviert werden kann.

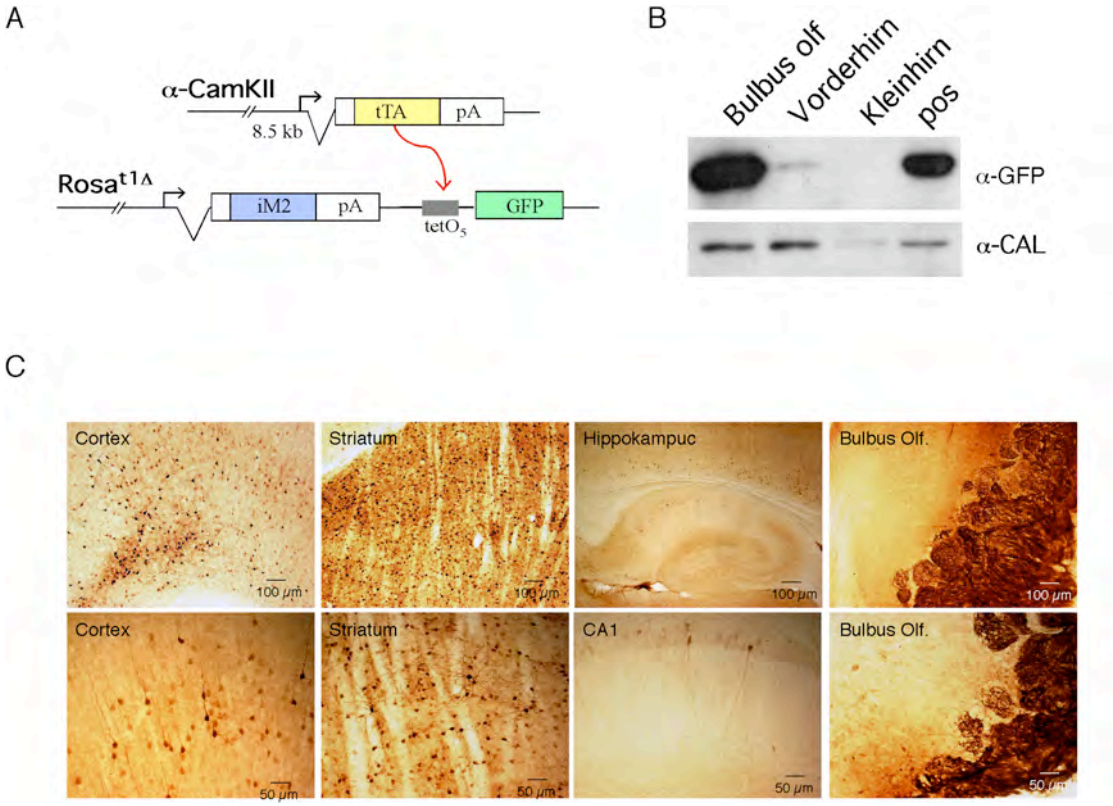

Abb.19: Schematische Darstellung (A) zur Regulation von GFP in R26$^{t1\Delta}$- und αCamKII-doppelttranssgenen Mäusen. Mäuse die kein Doxycyclin bekommen, exprimieren GFP in Abhängigkeit von tTA. Westernblot-Analyse (B) zur Bestimmung der GFP-Expression in Bulbus olfactorius, Vorder- und Kleinhirn doppelttransgener Mäuse. Immunohistologische Färbungen (C) mit einem α-GFP Antikörper in sagittalen Hirnschnitten.

In Gehirnschnitten von Mäusen, die heterozygot für KT1 sowie R26$^{t1\Delta}$ sind, konnte durch immunohistochemische Analysen mittels eines GFP spezifischen Antikörpers

in weiten Teilen des Gehirns GFP nachgewiesen werden (Abb.19 C). Allerdings variierte die GFP-Expression in Gehirnregionen. So sind im Hippokampus nur sehr vereinzelt positive Zellen detektierbar, während die Expression im Striatum wesentlich besser ist.

2.3.2 Verfügbarkeit von Doxycyclin im Gehirn

Im allgemeinen verläuft der Substanztransport vom Blut in verschiedene Gewebe eines Organismus entweder durch Endothelzellen (transzellulärer Transport) oder via Spaltöffnungen zwischen den Endothelzellen (interzellulärer Transport). Bei den Endothelzellen der Hirnkapillaren ist sowohl der trans- als auch der interzelluläre Transport erheblich eingeschränkt. Hier sind die Endothelzellen sehr eng miteinander verbunden, so dass interzellulärer Transport nicht mehr möglich ist. Um vom Blut ins Gehirn zu gelangen, müssen Stoffe die Zellmembran der Endothelzellen durchqueren. Kleinere, lipophile Moleküle können so relativ leicht ins Gehirn eindringen. Hochmolekulare oder hydrophile Moleküle wie z.B. Glucose gelangen durch hochselektive, spezifische, aktive Transportsysteme ins Gehirn (Padridge, W. M., 2001 und 2002)

Doxycyclin kann zwar die Bluthirnschranke überwinden, aber nur in relativ geringen Konzentrationen. Somit stellt sich die Frage, ob die Menge an Doxycyclin, die tatsächlich ins Gehirn gelangt und dort von den Neuronen aufgenommen wird, ausreichend ist, um eine Induktion von iM2 zu ermöglichen. In den folgenden Experimenten wurde über verschiede Ansätze die Bluthirnschranke umgangen, um festzustellen, ob eine Erhöhung des Doxycyclinspiegels eine Induktion der GFP-Expression in Neuronen bewirkt.

2.3.2.1 Induktion von iM2 vor Ausbildung der Bluthirnschranke

Die Bluthirnschranke bildet sich erst spät in der Embryonalentwicklung aus. Wenn also bereits vom Zeitpunkt der Befruchtung während der gesamten Embryonalentwicklung den Müttern Doxycyclin verabreicht wird, gelangt dieses durch die Nabelschnur ungehindert vom mütterlichen Blut über die Plazenta in die Embryonen und somit auch, da die Bluthirnschranke noch nicht existiert, in deren Gehirn.

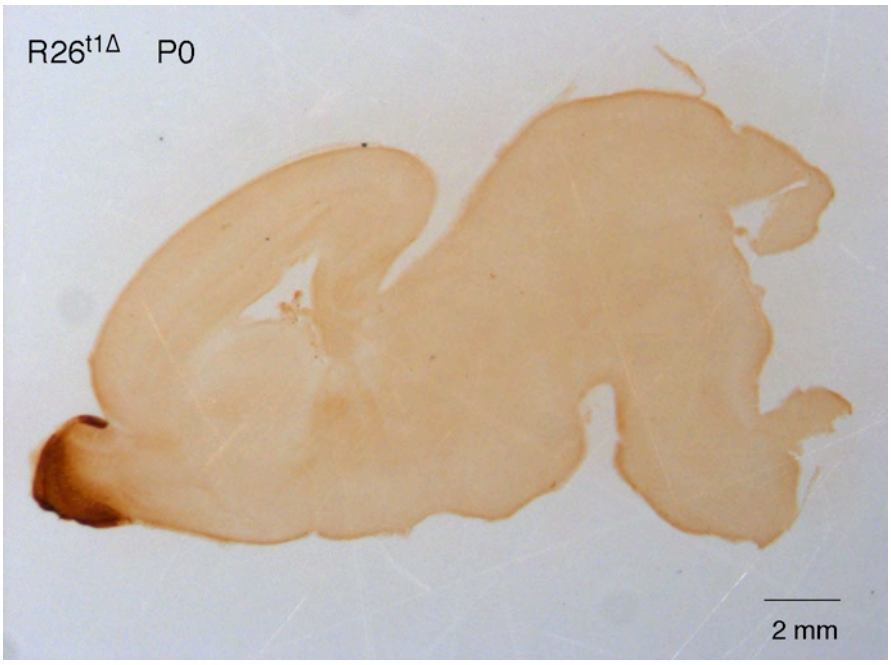

Abb.20: Analyse der GFP-Expression im Gehirn neugeborener heterozygoter R26$^{t1\Delta}$-Mäuse mittels immunohistologischer Färbungen an Sagittäschnitten. Die Doxycyclingabe erfolgte während der kompletten Embryonalentwicklung.

Beim postnatalen Tag P0 wurde hemizygoten R26$^{t1\Delta}$-Mäusen das Gehirn entnommen und immunohistologisch auf GFP-Expression untersucht. Wie in Abb.20 zu erkennen ist, konnte kein GFP detektiert werden. Eine Doxycyclinverabreichung vor Ausbildung der Bluthirnschranke führt demnach nicht zu einer Induktion von GFP in Neuronen.

2.3.2.2 Injektion von Doxycyclin in den lateralen Ventrikel

In einem weiterer Ansatz die Bluthirnschranke zu umgehen, wurde Doxycyclin direkt in den lateralen Ventrikel adulter R26$^{t1\Delta}$-Mäuse injiziert (1μl in der Konzentration 20μg/μl). Es wurden insgesamt 6 Mäuse injiziert, wobei einer der Mäuse anstatt Doxycyclin PBS injiziert wurde, um auszuschließen, dass die Injektion an sich zu einer Induktion von GFP führt. Nach 3, 4, 5, 6 bzw. 7 Tagen wurde jeweils einer Maus das Gehirn entnommen und immunohistologisch mittels eines gegen GFP gerichteten Antikörpers auf GFP-Expression untersucht.

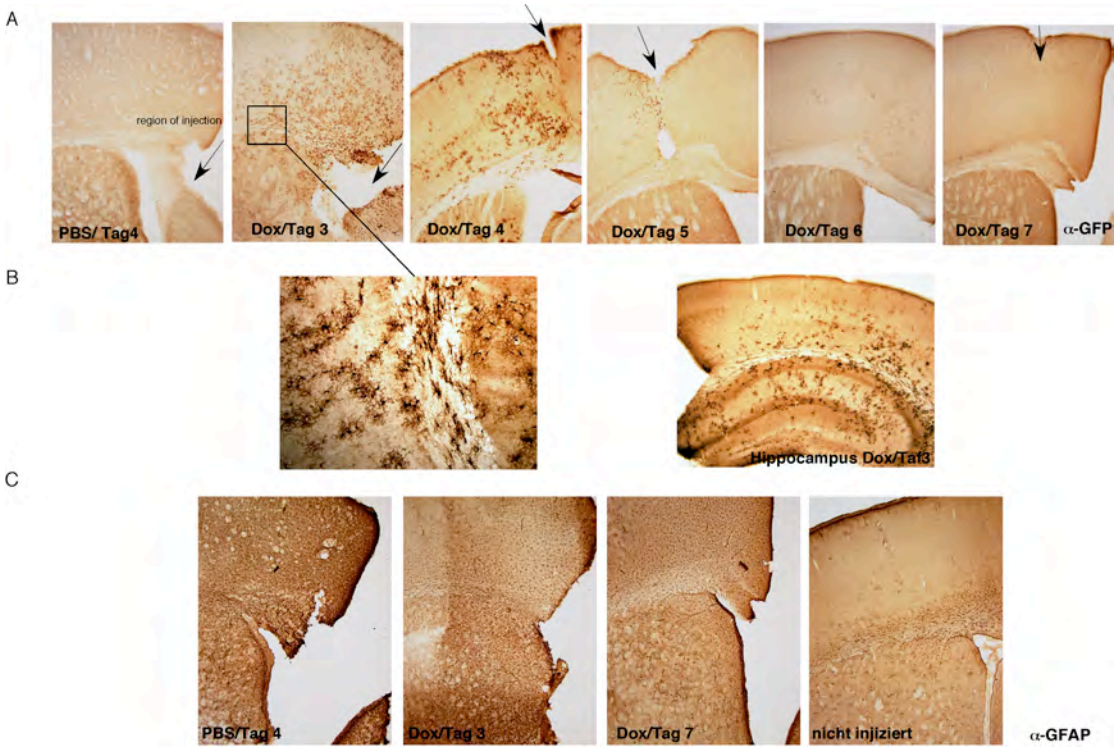

Abb.21: Immunohistologische Analyse von Gehirnschnitten von heterozygoten R26$^{t1\Delta}$-Mäusen nach Injektion von Doxycyclin (1μl; 20μg/μl) in den lateralen Ventrikel. (A) Nachweis der GFP-Expression 3-7 Tage nach der Injektion. (B) Ausschnittsvergrößerungen von Hippokampus und Striatum. (C) Detektion von GFAP-positiven Zellen in injizierten sowie nicht injizierten Mäusen. PBS, anstatt Doxycyclin wurde hier PBS infiziert (1μl).

Die immunohistologische Analyse zeigte, dass selbst die direkte Injektion von Doxycyclin in den lateralen Ventrikel adulter hemizygoter Tiere zu keiner GFP-Expression in Neuronen führt. Jedoch wurde eine große Anzahl an GFP-positiven Gliazellen nahe der Injektionsstelle sichtbar. Untersuchungen mit einem GFAP-spezifischen Antikörper zeigten, dass im Vergleich zu nichtinduzierten Tieren die Gesamtzahl GFAP-positiver Zellen erhöht war. Da dies ebenfalls in der Kontrollmaus festzustellen war, die lediglich mit PBS und nicht mit Doxycyclin injiziert wurde, ist davon auszugehen, dass die vermehrte Anzahl von Glia-Zellen durch eine Injektionsverletzung des Gewebes herrührt und nicht von Doxycyclin.

2.4 Generierung und Analyse der R26^{t4}-Mauslinie

2.4.1 Aufbau des Gen Targeting Konstruktes

Analog zu dem bereits beschriebenen iM2 Konstrukt wurde eine, durch itTA induzierbare GFP-Expressionskassette unter Kontrolle des endogenen ROSA26-Promotor gebracht (Abb.22 A).

Zur Negativselektion nicht homologer Integrationsereignisse enthielt der Gen Targeting-Vektor (B. Lakaye) das Diphteria Toxin-A (DT-A). Die Expressionskassette ist 5' von einem 1 bp kurzen sowie 3' von einem 4,3 bp langen, zur endogenen Zielsequenz, homologen Sequenzarm flankiert. Das verwendete Tetracyclin-abhängige Expressionssystem ist wie folgt zusammengesetzt. Die regulatorischen Elemente bestehen aus dem Transkriptionsktivator, einer humanisierten Version des tTA (itTA; J. Kim), sowie dem Responder, einer humanisierten Version des GFP-Gens (hGFP), welches unter Kontrolle des induzierbaren CMV Minimalpromotors (CMV_m) steht. Zur effizienteren Maturierung der mRNA wurde der für itTA kodierenden Sequenz eine künstliche Exon/Intron-Struktur vorgeschaltet, die aus dem Tripartite leader (Logan, 1984) besteht. Nach homologer Rekombination wird itTA ubiquitär konstitutiv unter Kontrolle des endogenen ROSA26-Promotors exprimiert.

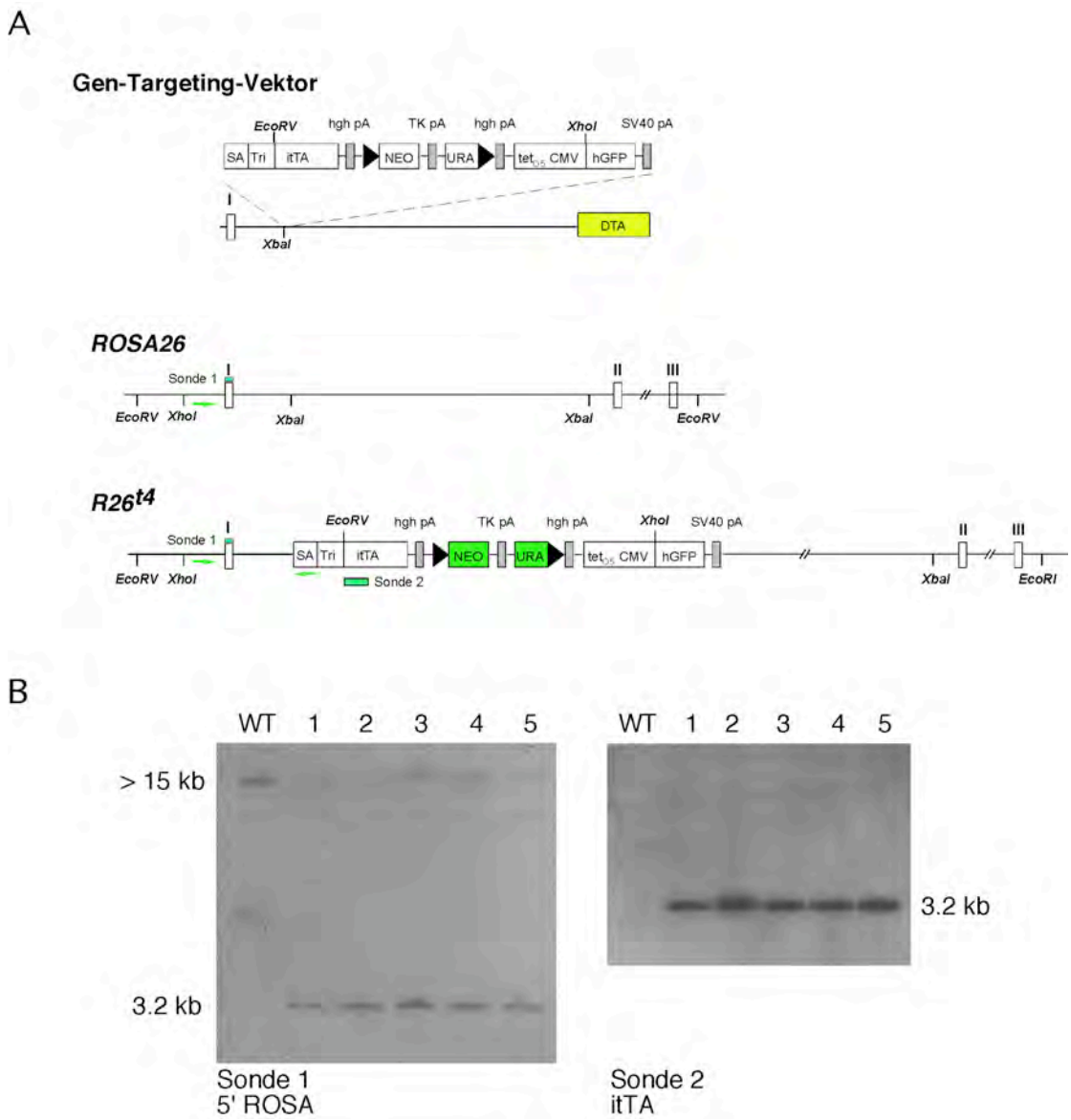

Abb.22 Schematische Darstellung (A oben) des Targeting Vektors mit 3' des Exon 1 itTA, der loxP flankierten Selektionskasette sowie dem hGFP unter Kontrolle des induzierbaren CMV_m Minimalpromotors. (A unten) Wilttyp-Allel des ROSA26-Lokus (ROSA26) sowie des ROSA26 Allel nach erfolgter homologer Rekombination ($Rosa^{t4}$). Exons sind als Kästchen gezeichnet, die *loxP*-Elemente sind durch schwarze Dreiecke dargestellt. Primer werden durch grüne Pfeile, Sonden für Southern Blot werden durch grüne Kästchen gekennzeichnet. (C) Southern Blot von *XhoI* verdauter genomischer DNS von 5 PCR-positiven ES-Zellklonen im Vergleich mit wildtyp ES-Zellen.

Im Gegensatz zum iM2-System bindet itTA in Abwesenheit von Doxycyclin an die Operatorsequenzen des CMV_m und ermöglicht so die Expression von GFP. Die Zugabe von Doxycyclin führt zur Dissoziation des itTA von der DNS und folglich zur Repression des Systems.

2.4.2 Generierung der R26^{t4}-Mauslinie

Das Gen Targeting-Konstrukt (pROSA-itTA, B. Lakaye) wurde mit dem Restriktionsenzym *Kpn*I linearisiert und durch Elektroporation in R1 ES-Zellen (Nagy et al., 1993) transfiziert. Nach Selektion mit Geniticin (G418) wurden resistente ES-Zellkolonien isoliert und deren genomische DNS durch zwei aufeinanderfolgende PCR-Reaktionen auf das homologe Rekombinationsereignis hin untersucht. Bei erfolgreicher homologer Rekombination wurde in einer versetzten PCR mit den Oligonukleotiden ROSA26-OUT und SA-OUT ein 1367 bp DNS-Fragment und nachfolgend mit den Oligonukleotiden ROSA26-IN und SA-IN ein 1243 bp DNS-Fragment amplifiziert.

Von 200 analysierten ES-Zellklonen wurden 11 als homolog rekombiniert identifiziert und 5 für weitere Analysenexpandiert. Zur Bestätigung der PCR-Ergebnisse wurde eine Southernblot-Analyse der genomischen DNS durchgeführt (Abb.22 B). Hierfür wurde das Restriktionsenzym *XhoI* gewählt. Als radioaktive Sonden wurden ein 600 bp DNS Fragment (itTA-Sonde) aus dem itTA-Gen, sowie ein 80 bp DNS Fragment (ROSA 5'-Sonde, aus dem 5'-Bereich des ersten Exons des ROSA26-Gens verwendet.

Nach homologer Rekombination konnte zusätzlich zur Wildtypbande (~15 kb) mit der itTA-Sonde eine 3,2 kb Bande für das mutante Allel nachgewiesen werden. Mit der neo-Sonde wurde in Wildtyp-DNS keine und für das R26^{t4}-Allel eine 3,3 kb Bande Detektiert werden (Abb.22).

Einer der korrekt rekombinierte ES-Zellklone (#19A) wurde für die Injektion in C57Bl/6-Mausblastozysten eingesetzt. Daraus resultierende männliche Chimären wurden in den C57Bl/6-Hintergrund zurückgekreuzt. Keimbahntransmission konnte durch Weitergabe der Mutation in die nächste Generation festgestellt werden. Die mit dem ES-Zellklon #19A erzeugte Mauslinie wurde mit R26^{t4} bezeichnet. Durch Kreuzung von heterozygoten R26^{t4}-Mäusen mit Cre-Deleter Mäusen (Schwenk et al., 1995) wurden Nachkommen erzeugt, in denen die *neo*/*ura*-Selektionskassette duch Cre-vermittelte Rekombination im frühembryonalen Stadium entfernt wurde. Die so entstandene Mauslinie ohne *neo*/*ura*-Selektionskassette wurde als R26$^{t4\Delta}$ bezeichnet.

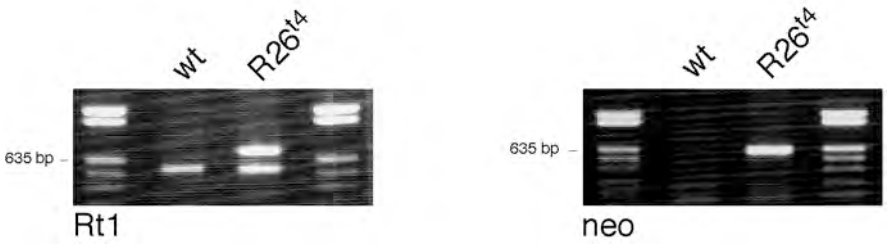

Abb.23 Genotypisierung der R26^{t4}-Mauslinien. In (A) wurde mit den Primern ROSA01 und ROSA07 ein 565 bp Fragment des ROSA26-Lokus sowie mit den Primern ROSA01 und ROSA02 ein 916 bp Fragment des rekombinierten ROSA26-Allels. Für die PCR wurden die drei Primer in einen Reaktionsansatz gegeben. In (B) wurde mit den Primern rspneo3 und rspneo4 ein 600 bp Fragment aus dem Sequenzbereich des *neo*-Gens amplifiziert.

Die Genotypisierung der Mäuse erfolgte durch PCR mit genomischer DNS aus kupierten Schwanzspitzen. Mit den Oligonukleotiden ROSA01, ROSA02 und ROSA07 konnten die R26(itTA-hGFP)-Allele durch 916 bp PCR-Produkte vom 565 bp PCR-Produkt des wildtyp-Allels unterschieden werden Mit den Primern rspneo4 und rspneo5 wird ein 600 bp Fragment aus dem Bereich des *neo*-Gens amplifiziert (Abb.23).

2.4.3 Expressionsanalyse von ROSA26-CMV$_m$:itTA in ES-Zellen und der Maus

2.4.3.1 Expression in ES-Zellen

Um das induzierbare Expressionssystem nach homologer Rekombination auf seine Funktionalität hin zu testen wurden erste Induktionsexperimente in ES-Zellen durchgeführt. In HeLa Zellen wird eine vollständige Repression von itTA bereits bei einer Doxycyclin-Konzentration von 10 ng/ml Medium erreicht (Baron et al., 2000). Parallel zur Induktion des iM2-Systems wurden subkonfluente ES-Zell Kulturen für 48 Stunden mit Doxycyclin in den Konzentrationen 1, 10, 50, 100 ng/ml Medium inkubiert. Anschließend wurden die ES-Zellen am Fluoreszenzmikroskop bezüglich der Expression von GFP untersucht.

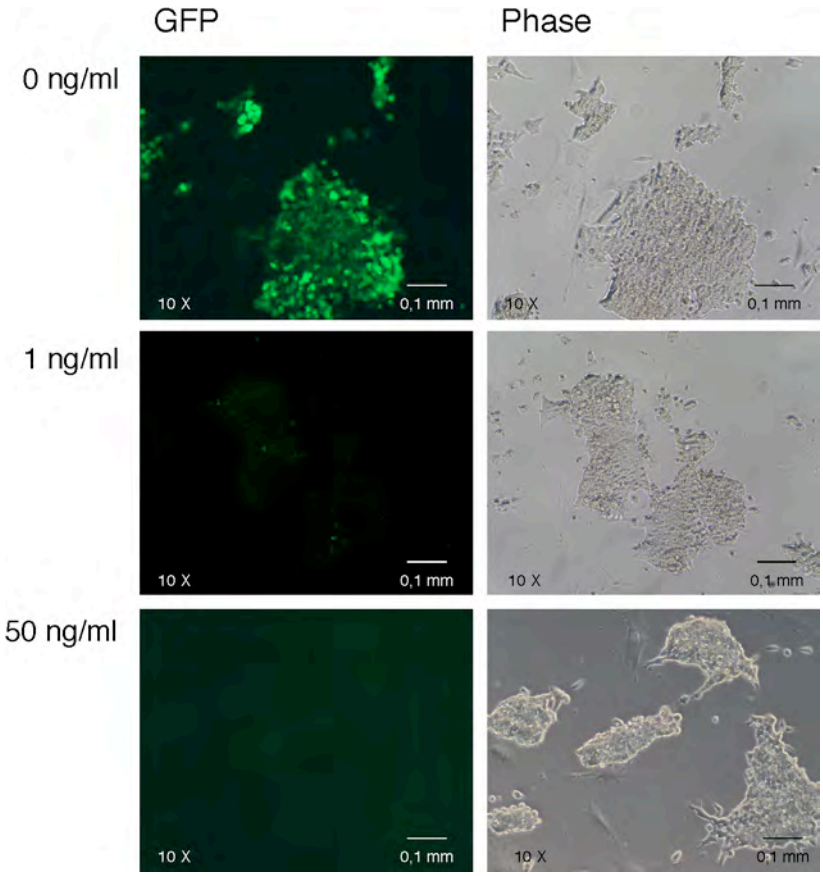

Abb.24: Subkonfluente Embryonale Stammzellkulturen des Klones #19A wurden zur Aktivierung des ROSA26-Promotor kontrollierten itTA, für 48 Stunden mit Doxycyclin in den Konzentrationen 0, 1, 10, 50, 100 und 200 ng/ml inkubiert. Die Aufnahmen wurden für alle Konzentrationen bei gleicher Belichtungszeit durchgeführt und zeigen die Aktivierung der iM2-abhängigen GFP-Expression bei einer Konzentration von 50 ng/ml.

Wie in Abb.24 dargestellt, ist das System bereits bei einer Doxycyclin-Konzentration von 10 ng/ml Medium effizient reprimiert. Bereits bei einer Konzentration von 1 ng/ml Medium ist eine Reduktion in der GFP-Fluoreszenz zu erkennen. Dies zeigt die hohe Effizienz der Regulierung von tTA-regulierten Genexpressionssystemen. Bereits geringe Konzentrationen des Effektor reichen aus, um Genexpression gezielt auszuschalten.

Wie bereits bei Induktion von iM2, ist auch bei itTA eine Inhomogenität der GFP-Fluoreszenz zwischen den Zellen einer Kolonie zu erkennen. Möglicherweise ist diese Inhomogenität auf die *neo*/*ura*-Selektionskassette zurückzuführen, die in R26^{t1}-Mäusen zu einem Silencing der GFP-Expression führt.

2.4.3.2 Analyse des itTA-Transkripts in heterozygoten R26^{t4}-Mäusen

Durch Southernblot Analyse genomischer DNS wurde bereits die Integration der itTA:GFP-Expressionskassette in den ROSA26-Lokus gezeigt. Durch Analyse des vom ROSA26-Promotor startenden Transkriptes in R26^{t4}-Mäusen soll nun der korrekte Spleissvorgang vom endogenen ROSA26-Promotor auf das erste Exon des ROSA26-Transkriptes geprüft werden. Mit diesem Experiment soll ein, durch die Integration des Expressionsmoduls möglicherweise verursachtes, fehlerhafes Spleissen sichtbar gemacht werden. Hierfür wurde Gesamt-RNS aus der Leber von R26^{t4}-Mäusen isoliert und mittels eines 5' RACE-Protokolles die 5'-Sequenz der iM2-mRNS amplifiziert. Das so erhaltene Fragment wurde über TOPO-Klonierung kloniert und anschließend sequenziert.

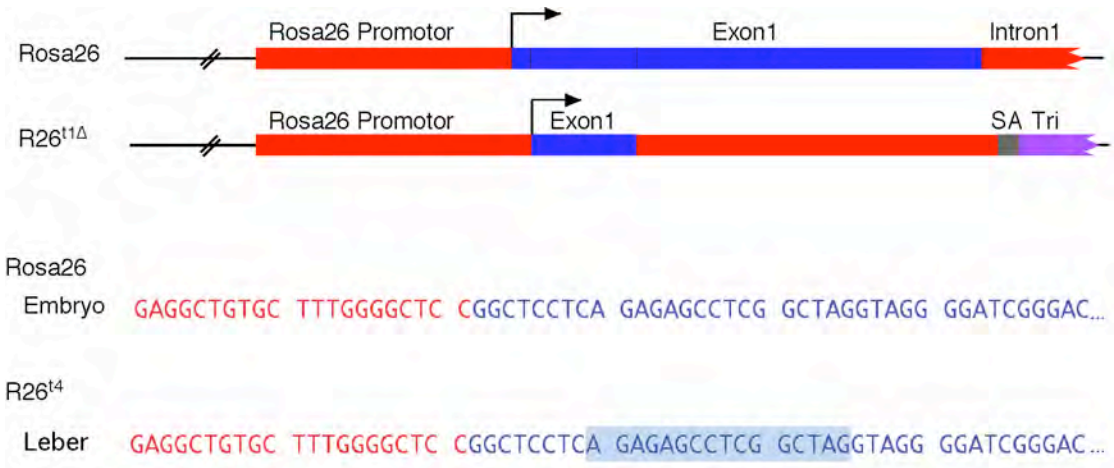

Abb.25: RACE-Analyse heterozygoter R26^{t4}-Mäuse. Dargestellt sind schematisch (oben) und als Sequenz (unten) die unterschiedlichen Exon/Intronstruktur wie sie veöffentlicht sind (Pubmed) und in R26$^{t1\Delta}$-Mäusen. Rot sind die ROSA26-Promotorsequenzen und Intronsequenzen, Exon1 ist blau dargestellt. Die verkürzte Exonsequenz der R26$^{t1\Delta}$-Mäuse ist hellblau unterlegt. Der Spleissakzeptor (SA) ist grau und der "Tripartite-leader" violet.

Die Sequenzanalysen des vom ROSA26-Promotor startenden klonierten Transkriptes in R26$^{t4\Delta}$-Mäuse zeigen, dass ein korrektes itTA-Transkript vorliegt (Abb.25). Zu sehen sind ausgehend vom 5'-RACE-Adapter, das Exon1 des ursprünglichen ROSA26-Transkriptes, Spleiss-Donor und Spleiss-Akzeptor-Sequenzen, die ein korrektes Spleissen des ersten ROSA26-Introns sowie des künstlichen Tripartite leaders zeigen. Außerdem zu sehen ist die 5'-Sequenz des itTA-Transkriptes, beginnend mit dem ATG Startcodon. Bei der Analyse der RACE-Sequenzen ist die

gleiche verkürzte Exon1-Struktur wie bereits bei Analyse der $R26^{t1\Delta}$-Mäusen zu erkennen. Die von uns als Exon1 ermittelte Sequenz (Abb.25) deckt 14-16 bp im 5'-Bereich der in der Datenbank (PubMed) als Exon1 bezeichneten Sequenz (130 bp) ab.

2.4.3.3 GFP-Expression im Gehirn heterozygoter $R26^{t4}$-Mäuse

In den bisherigen Experimenten konnte für das iM2-System keine Expression des ROSA26:Tet-CMV_m:GFP Expressionsmoduls im Gehirn erreicht werden. Während für iM2 bislang nur ein in Neuronen funktionelles Mausmodell beschrieben wurde (Mansuy et al., 1998) konnten zur kontrollierten Genexpression im Gehirn bereits eine Reihe tTA-induzierbarer Systeme etabliert (Mayford et al., 1996; Bondet al., 2000) werden. Aus diesem Grund war es von besonderem Interesse die $R26^{t4}$-Linie auf ihre Expression im Gehirn zu untersuchen. Hierfür wurden immunohistologische Färbungen mit einem für GFP spezifischem Antikörper durchgeführt (Abb.26).
Wie in Abb.26 zu sehen ist, konnten bei Mäusen der $R26^{t4}$-Linie in weiten Teilen des Gehirns iM2-abhängig GFP-Expression nachgewiesen werden. Auffallend ist, dass im Hippokampus nur in vereinzelten Neuronen und im Kleinhirn keine GFP-positiven Zellen detektiert werden konnten. Diese Unterschiede in der GFP-Expression zwischen einzelnen Gehirnarealen kann auf einen Einfluss der *neo/ura*-Selektionskassette zurückzuführen sein, da diese wie bereits für die $R26^{t1}$ Linie gezeigt wurde, einen Silencing Effekt ausüben kann.

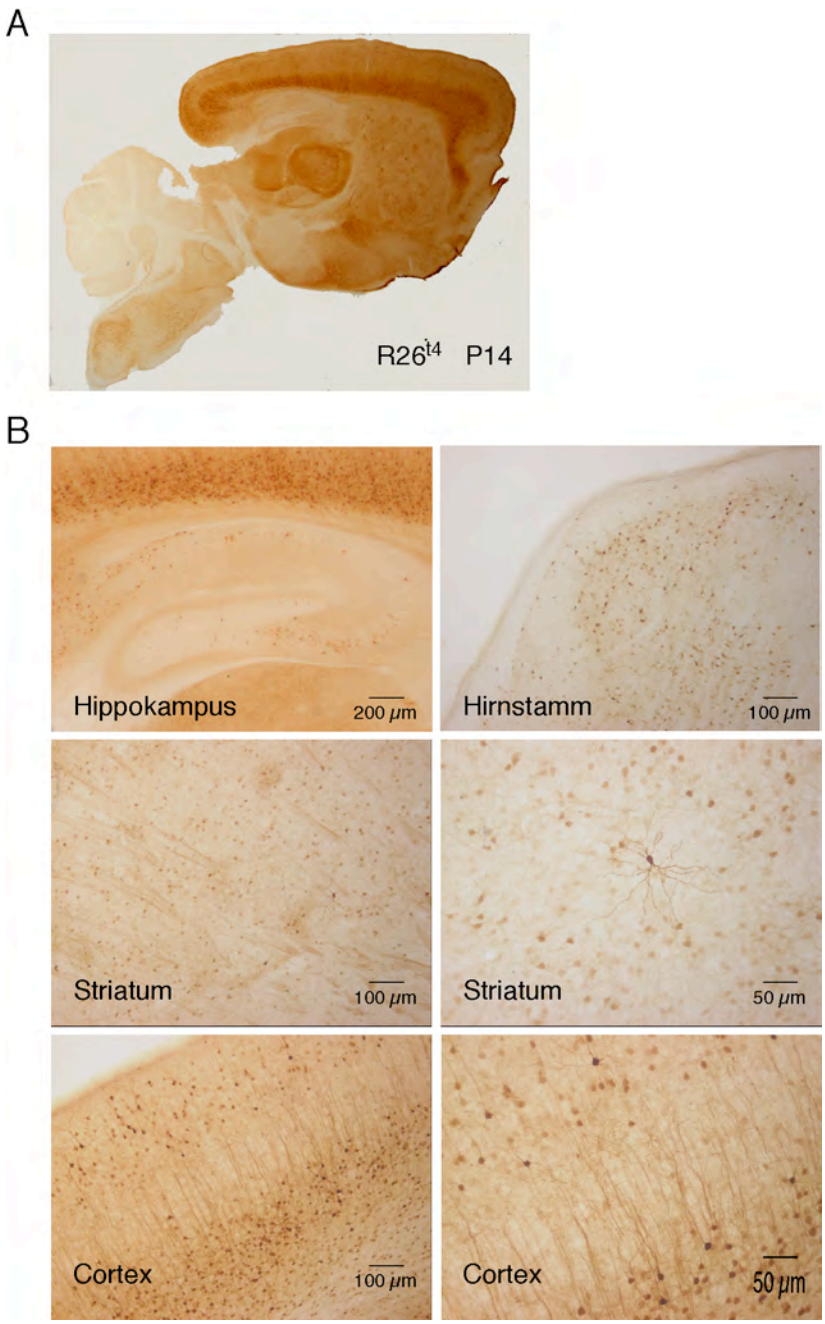

Abb.26: Analyse der GFP-Expression im Gehirn heterozygoter R26^{t4}-Mäuse durch Immunfärbung gegen GFP. In (A) ist die Übersichtsaufnahme eines Sagittalschnittes zu sehen. (B) Ausschnitsvergrößerungen von Hippokampus, Hirnstamm, Striatum und Cortex.

3. Diskussion

3.1 Funktionalität der Doxycyclin-kontrollierten Expressionsmodule

Die für die Erzeugung $R26^{t1}$-, $R26^{t1\Delta}$- und $R26^{t4}$-Mauslinien verwendeten Gen-Targeting Vektoren beinhalten den Transkriptionsaktivator iM2 bzw. itTA und einen Indikator für tTA Aktivität, den Responder CMV_m:GFP. Nach homologer Rekombination im ROSA26-Lokus, wird der Aktivator vom ROSA26-Promotor ausgehend, konstitutiv und ubiquitär exprimiert. Eine ubiquitäre Expression von Fremdgenen im ROSA26-Lokus konnte bereits zuvor gezeigt werden (Zambrowicz et al., 1997; Soriano 1999; Mao et al., 2001). Durch Beobachtung des GFP-Reporterproteins, das unter Kontrolle des induzierbaren CMV_m exprimiert wird, können Regulations und Expressionseigenschaften des CMV_m nach Integration in den ROSA26-Lokus untersucht werden. Am Beispiel der SK3 Untereinheit des Ca^{2+} aktivierten K^+-Kanals, konnte erstmals die Funktionalität des hier beschriebenen Expressionsmoduls gezeigt werden. Die Expression des endogenen SK3-Gens wurde unter Kontrolle des induzierbaren CMV_m gestellt, welcher wiederum von der vom endogenen SK3-Promotor getriebenen tTA-Expression aktiviert wird. Somit wurde die Expression des endogenen SK3-Gens tTA-abhängig induzierbar gemacht (Bond et al., 2000).

Nach Generierung der Mauslinien konnte durch RACE-Analyse ein korrektes Prozessieren der itTA/iM2-Transkripte in verschiedenen Organen gezeigt werden. Interessanter weise unterschied sich das von uns ermittelte erste Exon des ROSA26-Transkriptes 1 von der veröffentlichten Sequenz (Zambrowicz et al., 1997). In den Mauslinien $R26^{t1\Delta}$ und $R26^{t4}$ umfasst das Exon 1 lediglich einen Bereich von 14-16 bp der 130 bp des publizierten Exon 1. Möglicherweise wurden diese Unterschiede beim Spleissen von Exon 1 durch die Integration des Gen-Targeting-Konstruktes hervorgerufen. Die Integration der Gen-Targeting-Konstrukte ist nicht identisch mit der des ursprünglichen Genetrap-Konstruktes. Die von P. Soriano publizierten Sequenzen wurden durch Analyse der ursprünglichen Gene-Trap-Mäuse ermittelt. Somit sind Einflüsse der Integration auf den Spleissvorgang nicht auszuschliessen. Ebenfalls möglich ist dass das unterschiedliche Spleissen auf Unterschiede zwischen den jeweils verwendeten Mausstämmen zurückzuführen sind. Die hier analysierten Mäuse wurden in den Inzuchtstamm C57Bl/6 zurückgekreuzt, während P. Soriano

seine Analysen mit der 129Sv-Linie durchführte (Friedrich et al., 1991). Ein weiterer Unterschied besteht im Alter der analysierten Tiere. Während P. Soriano für seine RACE-Analyse cDNS aus Maus-Embryonen verwendete, wurde in der vorliegenden Arbeit die RNS aus Geweben adulter Mäuse analysiert. Entwicklungsbedingte Variationen im Spleissen der Transkripte sind somit ebenfalls nicht auszuschließen.
Die Funktionalität der beiden Expressionssysteme *in vivo* konnte durch Induktion (iM2) bzw. Repression (itTA) der GFP-Fluoreszenz in embryonalen Stammzellen gezeigt werden. Auffällig war hierbei eine Inhomogenität der GFP-Expression innerhalb der Kolonien. Mischklone mit nicht rekombinierten Zellen konnten ausgeschlossen werden, da ebenfalls Subklone aus Einzelzellen dieses inhomoge Expressionsmuster aufwiesen. Möglicherweise ist diese Inhomogenität der GFP-Expression auf die unterschiedlichen Stufen des Zellzyklus zurückzuführen.

3.2 GFP-Expression in R26^{t1}- und R26$^{t1\Delta}$-Mäusen

Nachdem die Funktionalität des iM2-Sytems in embryonalen Stammzellen gezeigt werden konnte, wurden R26^{t1}- und R26$^{t1\Delta}$-Mäuse zu unterschiedlichen Zeitpunkten mit Dox behandelt und die iM2-abhängige GFP-Expression durch untersucht. Hierbei wurde ersichtlich, dass die Selektionskassette einen Silencing-Effekt ausübt, da mit Ausnahme von Thymus und Milz in heterozygoten R26^{t1}-Mäusen keine GFP-Expression nachgewiesen werden konnte. In heterozygoten R26$^{t1\Delta}$-Mäusen hingegen konnte in allen analysierten Geweben, mit Ausnahme des Gehirns, Dox-abhängig GFP-Expression induziert werden. Die beobachteten Expressionsniveaus zeigten beträchtliche gewebsbedingte Schwankungen. Ähnlich starke gewebsspezifischen Schwankungen der Expressionshöhe von Genen, die unter Kontrolle des ROSA26-Promotors exprimiert werden, wurde ebenfalls in den Mauslinien Rosa26CreER^{T} (Vooijs et al., 2001) und rosa(CreER^{T2}) (Seibler et al., 2002) beobachtet. In diesen Mauslinien wird, ausgehend vom ROSA26-Promotor ein Cre-ER-Fusionsprotein exprimiert. Dass die unterschiedlichen Expressionsniveaus verschiedener Gewebe nicht bereits bei der Analyse der R26R-Linie (*LacZ*-Reporter) auffiel, ist vermutlich durch die unterschiedliche Visualisierung der Reportergene zu erklären. Nach der durch *β*-Galactosidase katalysierten Enzymreaktion präzipitiert das Substrat als blauer Farbstoff in der Zelle und eine Quantifizierung von LacZ in Gewebsschnitten ist schwer durchführbar. Die von uns verwendeten Westernblot Analysen hingegen

ermöglichen einen Vergleich der Reportergen-Expression in den untersuchten Geweben. Bei der Analyse homozygoter R26$^{t1\Delta}$-Mäuse konnte, besonders im Skelettmuskel und der Testis, eine starke Erhöhung der Expressionsstärke gegenüber heterozygoten R26$^{t1\Delta}$-Mäusen festgestellt werden. In Thymus und Milz waren hingegen keine Unterschiede zwischen hetero- und homozygoten R26$^{t1\Delta}$-Mäusen zu erkennen waren. Sowohl im Skelettmuskel als auch in der Testis sind in heterozygoten R26$^{t1\Delta}$-Mäusen im Vergleich zu Thymus und Milz sehr niedrige expressionsniveaus vorhanden. Somit erscheint die Aktivierung des Reportergens in Thymus und Milz bereits maximal, wohingegen eine Verdopplung der iM2-Menge in Muskel und Testis homozygoter R26$^{t1\Delta}$-Mäuse eine deutliche Reportergenaktivierung hervorruft.
Zeitpunkt und Dauer der Dox-Verabreichung schienen keinen Einfluss auf die Induktion der GFP-Expression zu haben. Auffallend waren individuelle Schwankungen des Expressionsniveaus in den Geweben einzelner R26$^{t1\Delta}$-Mäuse. Als Ursache hierfür konnten Alter und Geschlecht der Mäuse ausgeschlossen werden.

Ein weiterer Diskussionspunkt liegt in der verwendeten Operatorsequenz. In Zellkulturexperimenten zeigte die Fusion von 7 tetO die beste Aktivierbarkeit (Gossen und Bujard, 1992). In den hier verwendeten Konstrukten hingegen sind 5 tetO fusioniert. Inwieweit einer Operatoranzahl von 7 zu einer verbesserten Aktivierbarkeit des benachbarten CMV$_m$ führt wurde bisher nicht im Detail untersucht. Transaktivierungssexperimente mit der LC1-Linie, die bidirektional Luciferase und Cre unter Kontrolle des tetO7 exprimiert, indizieren, dass die reduzierte Anzahl der tetO nicht für die schlechte Induktion im Gehirn verantwortlich ist, da durch Transaktivierung des tetO7-CMV$_m$ im LC1-Lokus ebenfalls keine Reporteraktivität nachgewiesen werden konnte. Zusätzlich lässt die Funktionalität der tetO5-CMV$_m$ Fusion am Beispiel der SK3-Mäusen darauf schließen, dass es sich nicht um einen gravierenden Unterschied handelt. Daten über quantitative Analysen der Operatoranzahl liegen nicht vor.

3. Problematik der Induktion im Gehirn

Während in allen analysierten peripheren Geweben nach Deletion der Selektionskassette in R26$^{t1\Delta}$-Mäusen Dox-abhängig GFP-Expression erreicht wurde,

konnte im Gehirn induzierter Mäuse kein GFP nachgewiesen werden. Doxycyclin kann die Bluthirnschranke nur zu einem geringen Prozentsatz durchdringen. Die Bluthirnschranke wird somit häufig als limitierender Faktor für die Induktion induzierbarer Systeme im Gehirn diskutiert, da die Konzentration der Induktoren im Gehirn nicht für eine Aktivierung ausreicht. In dem bereits erwähnten Mausmodell rosa(CreER^{T2}) (Seibler et al., 2002) konnte keine Cre-Aktivität im Gehirn festgestellt werden, obwohl in Westernblot Analyse Cre-Protein nachzuweisen war. Als Begründung hierfür wurde die kritische Konzentration des Induktors (Tamoxifen) diskutiert. Um zu analysieren ob die Bluthirnschranke, und somit eine zu geringe Dox-Konzentration die Ursache für die schlechte Induktion im Gehirn ist, wurden zunächst heterozygote R26$^{t1\Delta}$-Mäuse unter Dox-Zugabe verpaart, so dass eine Induktion bereits vor Ausbildung der Bluthirnschranke, während der Embryonalentwicklung erfolgte. Doxycyclin diffundiert ohne Einschränkung über die Plazenta vom mütterlichen Blut in das des Embryos (Hillen und Berens, 2002). Immunohistologische Färbungen sagittaler Hirnschnitte der Mäuse auf GFP-Expression am postnatalen Tag P0 zeigte jedoch, dass keine Induktion erfolgte.

In einem weiteren Ansatz die Bluthirnschranke zu umgehen wurde heterozygoten R26$^{t1\Delta}$-Mäusen Dox direkt in den lateralen Ventrikel einer Gehirnhälfte injiziert. Entgegen der Erwartungen führte dies jedoch nicht zur Induktion der GFP-Expression in Neuronen. In immunohistologischen Färbungen auf GFP-Expression konnten lediglich GFP-exprimierende Gliazellen detektiert werden. Der Vergleich injizierter und nichtinjizierter Mäuse zeigte, dass durch die injektionsbedingte Verletzung des Gewebes eine Aktivierung von Gliazellen erfolgte. Eine Aktivierung von Gliazellen als Folge von Verletzungen beinhaltet Proliferation und Migration der Zellen zum Verletzungsherd hin, sowie morphologische und funktionelle Veränderungen (Kreutzberg, 1996). Dabei überrascht es, in welch großer Distanz zum Verletzungsherd GFP-positive Gliazellen zu detektieren waren. Bei der Annahme, dass aktivierte Gliazellen sich zum Verletzungsherd hinbewegen, bedeutet dies, dass Doxycyclin weit vom Injektionsort in das Gewebe hinein diffundiert. Da die Konzentration ausreichend ist um in aktivierten Gliazellen eine Induktion der GFP-Expression zu bewirken, sollte ebenfalls in Neuronen eine Induktion erfolgen, was sich nicht mit unseren Beobachtungen deckt. Dies, sowie die Tatsache dass die Verabreichung von Doxycyclin während der Entwicklung ebenfalls zu keiner

Induktion der GFP-Expression führte, lassen die Bluthirnschranke als Ursache für ein Fehlen der GFP-Expression im Gehirn als unwahrscheinlich erscheinen. Verstärkt wird diese Annahme durch die Beobachtungen in homozygoten R26$^{t1\Delta}$-Mäusen, bei denen sich bei normaler verabreichung von Doxycyclin über das Trinkwasser in distingten neuronalen Populationen eine Induktion der GFP-Expression detektieren lässt. Somit scheint die iM2-Gendosis, die in der Zelle vorliegt, einen wesentlich wichtigerer Faktor für die GFP-Expression darzustellen als die Dox-Konzentration. Wahrscheinlich ist allerdings ein Zusammenspiel beider Faktoren. Sowohl die Dox Konzentration, als auch die Gendosis sind im verwendeten System vermutlich zu gering um eine gute Induktion in Neuronen zu ermöglichen. Konträr zu dieser Vermutung steht allerdings die Tatsache, dass in den R26R-Indikatormäusen nach Deletion der Stop-Kassette ausgehend vom ROSA26-Promotor ß-Gal Aktivität in adulten Neuronen nachzuweisen ist. Eine mögliche Erklärung hierfür kann in den unterschiedlichen Reportergenen liegen. Um eine Enzymaktivität in R26R-Mäusen nachzuweisen, werden wesentlich weniger Moleküle benötigt als für eine Antikörperfärbung zur Detektion von GFP. Dass der ROSA26-Promotor nur relativ geringe Expression ermöglicht, wird ebenfalls bei Vergleichen des ROSA26-LacZ-Reporters mit anderen LacZ-Indikatormäusen wie der G3-Linie (Krestel et al., 2001) deutlich. Während die Enzymaktivität in Mäusen der G3-Linie bereits innerhalb von Minuten bis wenigen Stunden detektierbar ist, erfordert es bei der R26R-Linie eine Inkubation über Nacht .

Nachdem itTA bereits in verschiedenen Mausmodellen erfolgreich für eine Regulierung der Genexpression in Neuronen genutzt werden konnte war es von großem Interesse zu sehen, ob itTA in unserem Expressionssystem zu einer Induktion der GFP-Expression in Neuronen führt. Immunohistologische Färbungen an Hirnschnitten der R26^{t4}-Linie zeigten, dass im Gegensatz zur iM2-exprimierenden R26^{t1}- bzw. R26$^{t1\Delta}$-Linie GFP-Expression im Gehirn nachzuweisen ist. tTA und iM2 unterscheiden sich zwar in ihrer Affinität zu Doxycyclin, nicht aber in der Bindungsaffinität zur DNS. Da bei beiden Expressionssystemen (itTA/iM2) der Transkriptionsaktivator unter Kontrolle des ROSA26-Promotor exprimiert wird, sollte in beiden Fällen eine vergleichbare Anzahl an Molekülen in der Zelle vorliegen. Wenn man nun davon ausgeht, dass die Bluthirnschranke, d.h. die Dox-Konzentration, nicht der ausschlaggebende Faktor ist, warum im iM2-System im

Gehirn keine GFP-Expression induziert werden konnte, müsste aufgrund der gleichen Bindungsaffinitäten der beiden Aktivatoren die Expression in beiden Systemen identisch sein. Somit scheint die itTA-bedingte Expression im Gehirn von $R26^{t4}$-Mäusen zunächst im Widerspruch zu den für das iM2-System ermittelten Daten zu stehen. Dieser vermeintliche Widerspruch lässt sich jedoch klären, wenn man bedenkt, dass für eine Aktivierung der Transkription ein Zusammenspiel mehrere Faktoren notwendig ist. 1) Dimerisierung von iM2 2) Bindung von Dox an das Dimer 3) Bindung des Komplexes an die Operatorsequenz. Jeder dieser drei Schritte ist ein dynamischer Prozess der verschiedenen Bindungskinetiken unterliegt und somit einen Flaschenhals darstellt, der eine Aktivierung der GFP-Expression verhindern kann. Liegen aufgrund der geringen Promotorstärke nicht ausreichend iM2-Moleküle vor, erschwert dies die Dimerisierung. Eine niedrige Dox-Konzentration erschwert die Bildung des aktivierten Komplexes, was dazu führt, dass die Operatorsequenzen nicht ausreichend für Induktion der GFP-Expression gesättigt sind. Für itTA entfällt die Bindung von Doxycyclin an den Dimerisierten Transaktivator. Dies kann, insbesondere wenn man davon ausgeht, dass die im Gehirn vorhandene Doxycyclinkonzentration sich für eine Induktion von iM2 am unteren Limit befindet, dass trotz einer geringen Anzahl von itTA-Molekülen eine Sättigung der Operatorsequenzen gewährleistet ist.

3.4 ROSA26-Lokus

Mit der Charakterisierung der itTA bzw. iM2 exprimierenden $R26^{t4}$-, $R26^{t1}$- und $R26^{t1\Delta}$-Mauslinien konnten bezüglich des ROSA26-Lokus einige neue Erkenntnisse gewonnen werden. Der ROSA26-Lokus wurde bei einem Promotor-Trap ermittelt (Friedrich und Soriano, 1991), bei dem das *LacZ*-Reportergen in den in den ROSA26-Lokus 3' des ersten Exons von Transkript 1 integrierte. Eine genauere Charakterisierung erfolgte 1997 (Zambrowicz et al., 1997), durch Charakterisierung der LacZ-Expression in Mäusen, die aus den beim Gen-Trap gewonnen Stammzellen generiert wurden. Das erste Gen-Targeting des ROSA26-Lokus, Integration des *LacZ*-Reportergens mit vorgeschalteter Stop-Kassette, wurde 1999 publiziert (Soriano, 1999). In beiden Mauslinien wurde eine ubiquitäre Expression des Reportergens dokumentiert, was in der von uns generierten iM2-exprimierenden Mauslinie ebenfalls, mit Ausnahme des Gehirnes, gezeigt werden konnte. Dabei unterlagen die

beobachteten Expressionsniveaus gewebsspezifischen Variationen. Diese Schwankungen im Expressionsniveau von GFP können gewebsspezifische Unterschiede der ROSA26-Promotorstärke und somit eine gewebsspezifische Regulation des ROSA26-Promotors reflektieren. In dem hier verwendeten System wird die Promotorstärke aufgrund des zwischengeschalteten tetO5-CMV_m nicht linear durch die Expression des Reportergens widergespiegelt. Möglicherweise sind die Schwankungen in einem direkten System weniger ausgeprägt. Die Ursache könnte ebenfalls von einer gewebsbedingten schlechten Aktivierbarkeit des tetO5-CMV_m im ROSA26-Lokus herrühren. Dies ist aber eher unwahrscheinlich, da diese gewebsspezifischen Expressionsniveaus ebenfalls, wie bereits erwähnt, in den Mauslinien Rosa26CreER^T (Vooijs et al., 2001) und rosa(CreER^{T2}) zu beobachten sind (Seibler et al., 2002), welche das Reportergen direkt unter Kontrolle des ROSA26-Promotors exprimieren. Um den CMV_m unabhängig von ROSA26-kontrollierter Expression auf dessen Aktivierbarkeit zu testen wurden heterozygote R26$^{t1\Delta}$-Mäuse mit einer gut charakterisierten, vorderhirnspezifisch tTA-exprimierenden transgenen Mauslinie verpaart (KT1, Mayford, M., 1996). Hierbei wurde bei immunohistologischen analysen der GFP-Expression in sagittalen Hirnschnitten in zellulärer Auflösung erkennbar, dass die Aktivierung des CMV_m zwar möglich, aber mosaikartig war und somit nicht dem KT1-Expressionsmuster entsprach. Diese Mosaikexpression kann ein Hinweis auf eine schlechte Aktivierbarkeit des in den ROSA26-Lokus integrierten CMV_m darstellen. Denkbar ist allerdings auch, dass das mosaikartige Expressionsprofil auf eine Interaktion zwischen iM2 und itTA (Schnappinger et al., 1999) zurückzuführen ist, da heterodimere beider Aktivatoren eine Aktivierung des CMV_m erschweren.

Der bei der Analyse homozygoter R26$^{t1\Delta}$-Mäuse beobachtete Effekt der Gendosis auf die Expressionsstärke lässt auf eine geringe Stärke des ROSA26-Promotors schliessen, so dass die Expression von einem Allel nicht auszureichend scheint, um eine Sättigung der Operatorsequenzen und somit eine volle Induktion des Systems zu erreichen.

Die Induktion der GFP-Expression nach Injektion von Doxycyclin in den lateralen Ventrikel in aktivierten Gliazellen indiziert, dass entweder ein Silencing des ROSA26-Promotors in nicht proliferierenden Zellen vorliegt oder aber der in den ROSA26-Lokus integrierte CMV_m in diesen Zellen schlecht zugänglich ist.

Die hier diskutierten Daten zeigen, dass der ROSA26-Lokus in peripheren Geweben nur bedingt, und im Gehirn nicht für die Integration induzierbarer Systeme geeignet ist.

4. Material und Methoden

Zell und molekularbiologische Standardverfahren wurden, soweit nicht explizit erwähnt, folgenden Standardweken entnommen.

Current Protocols in Molecular Biology
F.M. Ausubel, R. Brent, R.E. Kingston, D.D. Moore, J.G. Seidman, J.A. Smith, K. Struhl
Wiley Interscience, 1989

Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Edition
J. Sambrock, E.F. Frisch, T. Maniatis
Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989

Gene Targeting: A Practical Approach
A.L. Joyner
Oxford University Press, 1993

Manipulating the Mouse Embryo
B. Hogan, R. Beddington, F. Costantini, E. Lacy
Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1994

4.1 Kultur, Transformation und Selektion von ES-Zellen der Maus

Pluripotente embryonale Stammzellen (R1; Nagy, A., et al., 1993) der Maus wurden in ES-Zellmedium ("Dulbecco´s modified Eagle medium" mit hohem Glukoseanteil, 2 mM Glutamin, 0,1 mM nicht essentiellen Aminosäuren, 1 mM Natriumpyruvat, 0,1 mM b-Mercaptoethanol; 20% fötales Kälberserum, 50 μg/ml Penicillin/Streptomycin, 1000 U/ml Leukämie Inhibitionsfaktor) kultiviert. Dies geschah entweder auf mitotisch inaktivierten (Mitomycin C) primären Maus Fibroblasten oder auf mit Gelatine (0,1%) überzogenen Kulturplatten. Für die Transformation wurden die Gen-Targeting-Vektoren zunächst durch *Not*I-Restriktionsverdau linearisiert und nach Ethanolpräzipitaton in 75 ml PBS gelöst. Um eine Phenolisierung zu vermeiden

wurde die DNS über eine mit PBS umgepufferte Gelfiltrationssäule (Chroma Spin TE-1000) aufgereinigt. Für die Elektroporation (BioRad Genepulser mit 500 mFD und 240 V) der vereinzelten ES-Zellen in einer PBS-Suspension wurden 40 mg des linearisierten Gen-Targeting-Vektors eingesetzt. Die transformierten Zellen wurden für 8-10 Tage mit G418 (250 μg/ml) selektioniert. Resistente Klone wurden isoliert und zur Expansion auf Muldenplatten-Platten überführt. Ein Teil der Zellen wurde für die DNS Analyse durch PCR verwendet, wobei in der Regel 6, 8 oder 12 Einzelklone zur Analyse vereinigt wurden und positive Pools anschließend auf Einzelklonebene getestet wurden. Für die Cre-Rekombination in den ES-Zellen wurden 30 mg ungeschnittenes pMC-Cre Plasmid verwendet. PCR-positiven Klone wurden im Southern Blot überprüft. Die als positiv identifizierten Klone wurden expandiert, tiefgefroren (5 x 10^6 Zellen/ml; 1 h bei –20°C, dann 12 h bei –70°C) und anschließend bis zur Injektion in C57Bl/6-Mausblastozysten in flüssigem Stickstoff gelagert.

4.2 Herstellung und Haltung transgener Mäuse

Mausblastozysten-Injektionen und Embryo-Transfers wurden in der transgenen Einheit des ZMBH bzw. dem Zentralen Tierlabor der Universität Heidelberg (ZTL) von Frank Zimmermann und Sascha Dlugosz durchgeführt. Es wurden hierbei je 15-20 ES-Zellen in Mausblastozysten des Inzuchtstammes C57Bl/6 injiziert. Jeweils 8-10 Blastozysten wurden in scheinschwangere C57Bl/6-Mäuse transplantiert. Die chimären Nachkommen sowie in C57Bl/6 rückgekreuzte Folgegenerationen wurden entsprechend dem Tierschutzgesetz in dafür vorgesehenen Räumen in der Versuchstierhaltungen des ZMBH, ZTL und im zentralen Tierlabor des MPI gehalten. Die behördliche Zulassung der transgenen Manipulationen erfolgte durch das Regierungspräsidium Karlsruhe.

4.3 Genotypisierung der mutanten Mauslinien

Mausschwanzspitzenbiopsien wurden mit Proteinase K (1mg/ml) in TENS-Puffer (50 mM Tris-HCl pH 8.0, 100 mM EDTA, 100 mM NaCl, 1% SDS) bei 55°C verdaut. Nach Fälling in 1 Volumen Isopropanol und Waschen in 70% Ethanol wurde die genomische DNS in 300-600 μl sterilem H_2O-Millipore, bei 55°C für 30 min gelöst und für die Genotypisierung durch PCR-Analyse eingesetzt. Ein 25 μl PCR-Ansatz enthielt PCR-Puffer (Invitrogen), 2mM $MgCl_2$, dNTP-Mix (0.2-0.5 U Taq-

Polymerase, ddH_2O und 1μl Matrizen-DNS-Lösung (10-100ng/μl). Einer initialen Denaturierung (3 min, 94°C) folgten 20-35 Zyklen mit je 20 sec, bei 94°C (Denaturierung), 30 sec bei 55°C (Oligonukleotid-Anlagerung), 1 min/kb 72°C (Extension). Nach dem letzten Zyklus wurde eine finale Extension von 10 min bei 72°C durchgeführt. Die erwarteten Größen der PCR-Produkte wurden anschließend durch Agarosegel-Elektrophorese überprüft.

4.4 Verabreichung von Doxycyclin

Doxyclinhydrochlorid (Sigma) wurde den Mäusen in der Konzentration von 2 g/l im Trinkwasser zusammen mit 10 % Sucrose in den jeweiligen Tierhaltungen verabreicht. Die Lösung wurde alle 2 Tage frisch in lichtgeschützen Trinkflaschen der Doxycyclinlösung.

4.5 Isolierung hochmolekularer genomischer DNS aus Mausgeweben

Für die Gewinnung hochmolekularer genomischer DNS aus der Leber adulter Mäuse für Southern Blot-Analysen wurde das Gewebe mechanisch zerkleinert und in 5 ml TENS-Puffer mit 10 mg Proteinase K für 1-2 Tage bei 55°C unter leichtem Schütteln (40 Upm) inkubiert. Nach 2-3maliger Phenol/Chloroform-Extraktion und 2-3maliger Chlochoform. Extraktion wurde die in der wässrigen Phase gelöste DNS mit 10% 3M Natrium-Acetat und 2,5 Volumina Ethanol bei Raumtemperatur präzipitiert, mit 70% Ethanol gewaschen, abgetropft und in 0,5-1.5 ml ddH_2O bei 55°C auf einem Überkopf-Schüttler bei 4°C gelöst.

4.6 Southern Blot-Analyse

Für eine Southern Blot-Analyse wurde genomische DNS (mind. 10 μg) in einem entsprechendem Volumen mit Restriktionsenzymen (MBI) nach einem Standardprotokoll für 24-48 h inkubiert. Nach einem kompletten Verdau wurde die DNS mit dem 2,5-fachen Volumen von 100%igem Ethanol und dem 0,1-fachen Volumens von 3M Natriumacetat-Lösung präzipitiert und mit 70% Ethanol gewaschen. Das DNS-Pellet wurde getrocknet und in 30μl Wasser gelöst. Anschließend erfolgte eine RNase-Behandlung. Hierfür wurde 1 U RNase zugegeben und 10 min bei RT inkubiert. Nach Zugabe von Ficoll-Probenpuffer wurde die Lösung bei für 10 min bei 55°C inkubiert und auf einem 1%igen Agarosegel mit 25

V für 24 h aufgetrennt. Für eine Gelbildaufnahme mit Maßstabsanzeige wurde das Agarosegel in einem 0,01%igem Ethidiumbromid-Bad für 10 min gefärbt. Anschließend wurde das Gel zuerst für 30 min in Denaturierungslösung (1,5 M NaCl; 0,5 N NaOH) und danach 30 min in Reneutralisierungslösung (1,5 M NaCl; 1,5 M Trishydroxyaminomethan (Trizma), pH 7,4) inkubiert. Eine Nylonembran (Parablot, Macherey-Nagel) und Whatman-Papiere wurden in entsprechender Größe zugeschnitten. Für den Aufbau der Blot-Apparatur wurde das Gel auf eine Whatman-Papier-„Brücke“, getränkt in 20X SSC, luftblasenfrei plaziert. Es folgt die Nylonmembran, getränkt in Wasser und 10X SSC, danach drei Lagen Whatmanpapier, getränkt in 10X SSC und anschließend mehrere Lagen an trockenen Whantmanpapier, sowie einem 500g schweren Gewicht. Die Whatmanpapierbrücke hatte Kontakt mit 20X SSC gehalten. Nach dem Transfer über Nacht wurde die Nylonmembran in 5X SSC gewaschen, luftgetrocknet und zum Crosslinken der DNS 2X UV behandelt.

4.6 Radioaktive Markierung von Sonden und Hybridisierung

Die DNS-Sonde wurde entsprechend des Protokolls des „random primed DNA labeling kit“ (Boehringer Mannheim) radioaktiv markiert und über ein Bio spin 30 Säulchen (Bio-Rad) dem mitgelieferten Protokoll entsprechend aufgereinigt.

Die geblottete und gecrosslinkte Nylonsemembran wurde kurz in ddH_2O gewaschen und mit der radioaktiv markierten DNS-Sonde in einer entsprechenden Menge von „Quickhyb hybridisation solution“ (Stratagen) hybrdisiert. Alle weiteren Schritte wurden dem beiliegenden Protokoll entnommen.

4.7 DNS-Sequenzierung

Die Sequenzierung von Plasmiden und PCR-Fragmenten erfolgte, basierend auf der Kettenabbruchmethode (Sanger et al., 1979) nach Protokollen der Firma ABI (Applied Biosystems) durch „Dye terminator cycle sequencing“ auf der automatischen Sequenziermaschiene 377 (Applied Biosystems) durchgeführt. Pro Reaktion wurden 100-200 ng/kb Plasmid bzw. 10-20 ng/kb PCR-Produkt in 5,5 μl ddH_2O, 0,5 μl Oligonukleotid (10 μM) und 4 μl „Big Dye Terminator“ mix (ABI) eingesetzt.

Gesamt-RNS wurde aus Geweben nach der Methode von Chomczynski und Sacchi (1987) mit TRI-Reagenz (TRI-REAGENT, Molecular Research Center Inc.) isoliert. 10-20 μg RNS wurden für 1 h bei 37°C mit 20 U RNase freier DNaseI (Boehringer Mannheim) und 40 U RNasin (MBI) in 60 μl Puffer B (10 mM Tris-Hcl pH 7.5; 10 mM $MgCl_2$; 50 mM NaCl; 1 mM DTT) inkubiert und nach Phenol/Chlofoform-Extraktion und Etahnolpräzipitation in 20 μl H_2O gelöst.

4.8 Oligonucleotidsynthese

Syntetische Oligonukleotide wurden von der Firma Thermo Electron Corporation (Germany) hergestellt. Eine Auflistung der verwendeten Oligonukleotide ist in Kapitel 4.18 angegeben.

4.9 Isolierung von gesamt-RNS aus Mausgeweben

Gesamt-RNS wurde aus Geweben nach der Methode von Chomczynski und Sacchi (1987) mit TRI-Reagenz (TRI-REAGENT, Molecular Research Center Inc.) isoliert. 10-20 μg RNS wurden für 1 h bei 37°C mit 20 U RNase freier DNaseI (Boehringer Mannheim) und 40 U RNasin (MBI) in 60 μl Puffer B (10 mM Tris-Hcl pH 7.5; 10 mM $MgCl_2$; 50 mM NaCl; 1 mM DTT) inkubiert und nach Phenol/Chlofoform-Extraktion und Etahnolpräzipitation in 20 μl H_2O gelöst.

4.10 RACE (Rapid amplification of cDNA ends)

Die RACE wurde entsprechend des Protokolls des FirstChoice RLM-RACE-Kit der Firma Ambion durchgeführt. Gesamt-RNS wurde mit TRI-Reagenz isoliert (siehe oben). Von diesen wurde mittels CIP-Behandlung (*calf intestine phosphatase*) 5´ Phosphatgruppen entfernt, danach wurde die RNS mit TAP (*tobacco acid pyrophosphatase*) behandelt, welches die Cap-Struktur von intakten RNS Molekülen entfernt und schliesslich wurde der mitgelieferte 5´RACE-Adaptor zu der so prozessierten RNS ligiert. Um cDNS herzustellen wurde mit der modifizierten RNS eine „random primed reverse transcription“ durchgeführt. Schliesslich wurde mit den so hergestellten cDNS Molekülen eine „nested“ PCR durchgeführt mit spezifischen Primern für den Adaptor und das Transgen. Eine „nested“ PCR erhöht die Menge des Endproduktes und die Spezifität der Amplifikation.
Die durch die PCR amplifizierten Fragmente subkloniert und sequenziert.

4.11 Isolierung von Proteinen aus Mausgeweben

Alle Präparationsschritte erfolgten bei 4°C in Anwesenheit von Proteinase-Inhibitoren (Complete, EDTA-free; Roche Diagnostics). Die Gewebe wurden mit einem Ultra Thurrax in 25 mM HEPES (pH 7.4) homogenisiert und für 10 min auf Eis inkubiert. Die Homogenisate wurden durch Zentrifugation bei 900xg für 10 min (4 °C) von Zellkernen und großen Zelltrümmern getrennt und bei –70 °C gelagert.

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte durch die Bradford-Methode (Bio-Rad). Hierfür wurden die Proteinlösungen 1:10 in 25mM HEPES (pH 7.4) mit Proteinaseinhibitor verdünnt und 10 μl davon mit 1 ml einer 1:5 verdünnten Bradfordlösung in H_2O für 20 min bei RT inkubiert. Anschließend erfolgte die OD-Bestimmung bei 595 nm.

4.13 Westernblot-Analyse

Je nach Experiment wurden unterschiedliche Proteinmengen (10-20μg) aus Proteinpräparationen in 2X STS-Ladepuffer für 5 min bei 95°C denaturiert und durch 8-12%ige SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese aufgetrennt (Mini-Protean 3, Bio-Rad). Der Nasstranfer der Proteine auf eine Nitrocellulose-Membran erfolgte bei 30V, 90mA für 16 Stunden oder unter Kühlung bei 100V, 350mA für eine Stunde (Protean BA 85, Schleicher & Schuell; Mini Trans-Blot, Bio-Rad) in Transferpuffer (25mM Tris, 192mM Glycin, 20% Methanol). Die Membranen wurden mit Block-Puffer (0,1% Tween 20, 8-10% Magermilchpulver in PBS pH 7,4) für 2-3h bei RT geblockt. Die Inkubation mit spezifischen Primärantikörpern (Verdünnung Kapitel 4.19) erfolgte in PBS/0,1% Tween 20 (PBS-T) für 2h bei Raumtemperatur. Nach viermaligem Waschen für jeweils 10 min in PBS-T erfolgte die Detektion der Primärantikörper durch spezies-spezifische Meerrettichperoxidase-gekoppelte Anti-IgG-Sekundärantikörper (1:15000 Anti-Kaninchen-IgG oder Anti-Maus-IgG; Dianova) für 45 min in PBS-T. Die Detektion der Antigen-Antikörperreaktion erfolgt durch „verstärke Chemilumineszens“ (ECL+Plus, Amersham Pharmacia).

4.14 Vibratom-Gewebsschnitte von Mäusegehirnen

Die Mäuse wurden mit Halothan betäubt und intrakardial mit PBS (pH 7,4) perfundiert. Das Gehirn wurde entnommen und über Nacht in 4% PFA/PBS bei 4°C

postfixiert oder nach Perfusion mit PBS anschließend mit 4% PFA/PBS perfundiert und die Gehirne für 1-3 h bei 4°C nachfixiert. Danach wurde das Gehirn mit PBS gewaschen, in 2% Agarose/PBS eingebettet, in 70 μm dicke Schnitte am Vibratom (Leika VT 1000S) geschnitten und in PBS bei 4°C aufbewahrt.

4.15 Immunohistochemische Untersuchungen von Vibratomgewebsschnitten

Die Vibratom-Schnitte wurden zur Blockierung der endogenen Peroxidase-Aktivität in 2%igH_2O_2/PBS für 15 min inkubiert. Nach 3-maligem Waschen in PBS für je 10 min wurden die Schnitte für 1 h zur Reduktion unspezifischer Antikörper-Reaktionen in Tag1-Puffer (1% Rinderserum-Albumin (BSA), 0,3% Trinton X-100 in PBS) mit 4% Normalserum (NS) blockiert. Das Normalserum entspricht der Spezie, in der der 2. Antikörper gewonnen wurde. Die Inkubation mit Primärantikörpern (Verdünnung siehe Kapitel 4.19) erfolgte in Tag1 Puffer/1%NS über Nacht bei Raumtemperatur. Nach dreimaligem Waschen in Tag2-Puffer (0,3% BSA, 0,1% Triton X-100 in PBS) erfolgte die Inkubation mit Meerretichperoxidase-gekoppelte Anti IgG-Sekundärantikörper (1:600, Vektor) für 1 h bei Raumtemperatur. Nach zweimaligem Waschen in Tag2-Puffer und zweimaligem Waschen in PBS wurden die Schnitte in 0.05% DAB (Diaminobenzidin-Hydrochlorid, Sigma) in 20 mM Tris-HCL (pH 7.6)/0,01%H_2O_2 entwickelt. Nach zweimaligem Waschen in PBS und einmaliger kurzer Inkubation in 10mM Tris-HCl (pH 7.6) wurden die Schnitte auf Objektträger überführt und bei Raumtemperatur über Nacht luftgetrocknet. Anschließend wurden die Schnitte nach kurzer Inkubation in Xylol mit Eukitt (Kindler GmbH, Freiburg) eingebettet.

Eine Verstärkung des DAB-Signals kann durch Anwendung von ABC (Vector) erreicht werden. Hierfür wurden die Schnitte nach Inkubation des Primärantikörpers und dreimaligem Waschen in Tag2-Puffer mit Biotin-gekoppelten Sekundärantikörper (1:600, Vector) in Tag2-Puffer für 1 h bei Raumtemperatur behandelt. Nach dreimaligem Waschen in in Tag 2-Puffer wurden die Schnitte für 1 h in ABC-Lösung (1:400, Vektor) inkubiert. Anschließend wurden die Schnitte je zweimal in Tag2-Puffer und in PBS gewaschen und in 0.05 % DAB in 20 mM Tris-HCl (pH 7.6)/0,01 % H_2O_2 entwickelt. Nach zweimaligem Waschen in PBS und einmaliger kurzer Inkubation in 10 mM Tris-HCl (pH 7.6) wurden die Schnitte auf Objektträger überführt und bei Raumtemperatur über Nacht luftgetrocknet. Anschließend wurden

die Schnitte nach kurzer Inkubation in Xylol mit Eukitt (Kindler GmbH, Freiburg) eingebettet.

4.16 Eukaryotische Zellen

R1 ES-Zellen: Pluripotente, embryonale Stammzellen aus der inneren Zellmasse von 129/SVx129/SCJ-Mausblastozysten (Nagy et al., 1993)

Feeder-Zellen: Primäre Mausfibroblasten aus E 13,5 NMRI-Embryonen (Passage 2)

4.17 Mauslinien

C67Bl/6:	Fa. Charles River (Deutschland)
CD-1:	Fa. Charles River (Deutschland)
KT1 :	Marc Mayford
LC1:	Kai Schönig
Cre-deleter:	Klaus Rajewski

4.18 Sequenzen verwendeter Oligonukleotide

Die Sequenzen sin 5'-3' dargestellt.

ROSA26-OUT	CCCACCGCCCCACACTTATTG
SA-OUT	GACCGCGAAGAGTTTGTCCTCAAC
ROSA26-IN	CCTAAAGAAGAGGCTGTGCTTTGG
SA-IN	CATCAAGGAAACCCTGGACTACTG
ROSA-20-4944	GGCTCCTCAGAGAGCCTCGG
ROSA-20-5024	CCGCCCATCCCCGCAAACG
htTA-F	ATGTCCAGACTGGACAAGAGCAAA
htTA-R	GGGCACGTGAGAGCCAGACTC
rspNEO4	GGCTATTCGGCTATGACTGGGC
rspNEO5	GGGTAGCCAACGCTATGTCCTG
SF-ROSA01	TTCCCTCGTGATCTGCAACTCC
SF-ROSA02	GCTTCAGATGTGCCTTGCTCTC
SF-ROSA07	CATCAGACTTCTAAGATCAGG
Rsp Cre1	ACCAGGTTCGTTCACTCATGG
Rsp Cre2	AGGCTAAGTGCCTTCTCTACAC

4.19 Verwendete Antikörper

Rabbit Anti GFP, A-6455; Molecular Probes ICH, WB 1:5000

Rabbit Anti GFAP, Z0334, DAKO; ICH 1:400

Rabbit Anti Calnexin WB 1:3000

Peroxidase-conjugated Goat Anti-Rabbit IgG (H+L), PI-1000 Vector

Biotinylated Goat Anti-Rabbit IgG (H+L), BA-1000, Vector

5. Anhang

5.1 Abkürzungen

α	Alpha
α-	Anti-
μ	Mikro
Abb	Abbildung
bp	Basenpaar
BSA	Rinderserum Albumin
CaMKII	Calcium/Calmodulin abhängige ProteinkinaseII
cDNS	zur mRNS komplementärer DNS-Strang
Da	Dalton
DNS	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Deoxynukleosidtriphosphat
Dox	Doxycyclin
E	embryonaler Tag
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ES	embryonale Stammzellen
et at.	und andere
g	Gramm
G418	Geniticin
GFP	grün fluoreszierendes Protein
h	Stunde
HeLa	humane Cervixcarcinom-Zellinie
IHC	Immunohistochemie
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
LIF	Leukemia Inhibitory Factor
m	Milli
M	molar
min	Minute
mRNS	Boten-Ribonukleinsäure
n	Nano
neo	Neomycin-Phosphotransferase
NS	Normal-Serum
nt	Nukleotid
P	postnataler Tag
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung
PBS-T	PBS-Tween
PCR	Polymerasekettenreaktion
PFA	Paraformaldehyd
pH	potentia Hydroxii
RT	(PCR) Reverse Transkriptase
RT	Raumtemperatur
RNS	Ribonukleinsäure
sec	Sekunde
SDS	Natriumdodecylsulfat

TE	Tris/EDTA-Puffer
TENS	Tris-EDTA-Natriumchlorid-SDS-Puffer
tg	Transgen
U	enzymatische Einheit
Upm	Umdrehungen pro Minute
z.B.	zum Beispiel
ZNS	Zentrales Nervensystem

6. Literatur

Albanese, C., Reutens, A. T., Bouzahzah, B., Fu, M., D´Amico, M., Link, T., Nicholson, R., Dephino, R. A. and Pestell, R. G. (2000). Sustained mammary gland-directed, ponasterone A-inducible expression in transgenic mice. Faseb J *14*, 877-84.

Andrews, B. J., Proteau, G. A., Beatty, L. G. and Sadowski, P. D. (1985). The FLP recombinase of the 2 micron circle DNA of yeast: interaction with its target sequences. Cell *40(4)*, 795-803.

Arnheiter H., Skuntz S., Noteborn M., Chang S. and Meier E. (1990). Transgenic mice with intracellular immunity to influenca virus. Cell *62*, 51-61.

Baron, U., Freundlieb, S., Gossen, M., and Bujard, H. (1995). Co-regulation of two gene activities by tetracyline via a bidirectional promoter. Nucleic Acids Res *23*, 3605-3606.

Baron, U., Gossen, M., and Bujard, H. (1997). Tetracycline-controlled transcription in eukaryotes: novel transactivators with graded transactivation potential. Nucleic Acids Res *25*, 2723-2729.

Baron, U., Schnappinger, D., Helbl, V., Gossen, M., Hillen, W., and Bujard, H. (1999). Generation of conditional mutants in higher eukaryotes by switching between the expression of two genes. Pro Natl Acad Sci USA *96 (3)*, 1013-1018.

Baron, U., and Bujard, H. (2000). Tet repressor-based system for regulated gene expression in eukaryotic cells: principles and advances. Methods Enzymol *327*, 401-421.

Berens, C., and Hillen, W., (2003) Gene regulation by tetracyclines. Eur. J. Biochem. 270, 3109-3121.

Bond, C. T., Sprengel, R.; Bissonnette, J. M., Kaufmann, W. A., Pribnow, D. Neelands, T.; Storck, T., Bactscher, M.; Jerecic, J.; Maylie, J.; Knaus, H. G., Seeburg, P. H. and Adelman, J. P. (2000) Respiration and parturition affected by conditional overexpression of the Ca^{2+}-activated K^{+} channel subunit, SK3. Science *15; 289(5486),* 1942-1946.

Boshart, M., Weber, F., Jahn, G., Dorsch-Hasler, K., Fleckenstein, B., and Schaffner, W. (1985). A very strong enhancer is located upstream of an immediate early gene of human cytomegalovirus. Cell *41 (2)*, 925-932.

Braselmann, S., Graninger, P. and Busslinger, M. (1993). A selective transcriptional induction system for mammalian cells based on Gal4-estrogen receptor fusion proteins. Proc Natl Acad Sci USA *90*, 1657-1661.

Brocard, J., Feil, R., Chambon, P., and Metzger, D. (1998). A chimeric Cre recombinase inducible by synthetic, but not by natural ligands of the glucocorticoid receptor. Nucleic Acids Res *26*, 4086-40890.

Brocard, J., Warot, X., Wendling, O., Messaddeq, N., Vonesch, J. L., Chambon, P., and Metzger, D. (1997). Spatio-temporal controlled site-specific somatic mutagenesis in the mouse. Proc Natl Acad Sci USA *94*, 1459-1463.

Buchholz, F. Ringrose, L., Angrand, P. O., Rossi, F. and Stewart, A. F. (1996) Different thermostabilities of FLP and Cre recombinases: implications for applied site-specific recombination. Nucleic Acids Res *24(21)*, 4256-4262.

Corces, V. and Pellicer, A. (1984). Identification of sequences involved in the transkription. Journal of Biol Chem *259,* 4812.

Cronin, C. A., Gluba, W., and Scrable, H. (2001). The lac operator-repressor system is functional in the mouse. Genes Dev 15, 1506-1517.

Danielian, P. S., Muccino, D., Rowitch, D. H., Michael, S. K., and McMahon, A. P. (1998). Modification of gene activity in mouse embryos in utero by a tamoxifen-inducible form of Cre recombinase. Curr Biol *8*, 1323-1326.

Dymecki, S.M. (1996). Flp recombinase promotes site-specific DNA recombination in embryonic stemm cells and transgenic mice. Pro Natl Acad Sci USA *93(12)*, 6191-6196.

Filmus, J., Remani, J. and Klein, M. H. (1992). Synergistic induction of promoters containing metal- and glucocorticoid- responsive elements. Nucleic Acids Res *20*, 2755-2760.

Friedman, H. M., Yee, A., Diggelmann, H., Hastings, J. C., Tal-Singer, R., Seidel-Dugan, C. A., Eisenberg, R. J. and Cohen, G. H. (1989). Use of glucocorticoid-inducible promoter for expression of herpes simplex virus type 1 glycoprotein gC1, a cytotoxic protein in mammalian cells. Mol Cell Biol *9*, 2303-2314.

Friedrich, G. and Soriano, P. (1991). Promoter traps in embryonic stem cells: a genetic screen to identify and mutate developmental genes in mice mutants. Genes & Development *5*, 1513-1523.

Furth, P. A., Hennighausen, L., Baker, C., Beatty, B., and Woychick, R. (1991). Temporal control of gene expression in transgenic mice by a tetracycline-responsive promoter. Proc Natl Acad Sci USA *91*, 9302-9306.

Fussenegger, M. (2001). The impact of mammalian gene regulation concepts on functional genomic research, metabolic engineering, and advanced gene therapies. Biotech Prog *17*, 1-51.

Gill, G. and Ptashne, M. (1988). Negative effect of the transcriptional activator GAL4. Nature *334*, 721-724.

Goodrich, J. A., Hoey, T., Thut, C. J., Admon, A., and Tjian R. (1993). Drosophila TAFII40 interacts with both a VP16 activation domain and the basal transcription factor TFIIB. Cell *75 (3)*, 519-30.

Gossen, M. and Bujard, H. (1992). Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters. Proc Natl Acad Sci USA *89*, 5547-5551.

Hartley, J. L. and Donelson, J.E. (1980). Nucleotide sequence of the yeast plasmid. Nature *286(5776)*, 860-866

Higuchi, M., Maas, S., Single, F. N., Hartner, J., Rozov, A., Burnashev, N., Feldmeyer, D., Sprengel, R., and Seeburg, P. H. (2000) Pointmutatio in an AMPA receptor gene rescues lethality in mice deficient in the RNA-editing enzyme ADAR2. Nature, *406*, 78-81

Hillen, W. and Berens, C. (1994). Mechanisms underlying expression of Tn10 encoded tetracyclin resistance. Annu Rev Microbiol *48*, 345-3469.

Hillen, W., and Berens, C. (2002) Tetracyclin-gesteuerte Genregulation: Vom bakteriellen Ursprung zum eukaryotischen Werkzeug. Biospektrum *4*, 355-358

Hoess, R. H., Wierzbicki, A., and Abremski, K. (1986). The role of the loxP spacer region in P1 site-specific recombination. Nucleic Acids Res *14*, 2287-2300.

Hoess, R. H., Ziese M. and Sternberg N. (1982). P1 site-specific recombination: nucleotide sequence of the recombining sites. Proc Natl Acad Sci USA *11*, 3398-3402.

Hu, M. C., and Davidson, N. (1987). The inducible lac operator-repressor system is functional in mammalian cells. Cell *48*, 555-566.

Ingles, C. J., Shales, M., Cress, W. D., Triezenberg, S. J. and Greenblatt, J. (1991). Reduced binding of TFIID to transcriptionally compromised mutants of VP16. Nature *351 (6327),* 251-261.

Jayaram M. (1985). Two-micrometer circle site specific recombination: the minimal substrate and the possible role of flanking sequences. Proc Natl Acad Sci USA *82(17),* 5875-5879.

Kellendonk, C., Tronche, F., Casanova, E., Anlag, K., Opherk, C., and Schutz, G. (1999). Inducible site-specific recombination in the brain. J Mol Biol *285*, 175-182.

Kellendonk, C., Tronche, F., Monhagan, A. P., Angrand, P. O., Stewart, F., and Schutz, G. (1996). Regulation of Cre recombinase activity by the synthetic steroid RU 486. Nucleic Acids Res *24*, 1404-1411.

Kothary, R., Clapoff, S., Darling, S., Perry, M. D., Moran, L. A., and Rossant, J. (1989). Inducible expression of an hsp68-lacZ hybrid gene in transgenic mice. Development *105*, 707-714.

Krestel, H. E., Mayford, M., Seeburg, P. H. and Sprengel, R. (2001). A GFP-equipped bidirectional expression module well suited for monitoring tetracycline-regulated gene expression in mouse. Nucleic Acids Res *29*, E39.

Kreutzberg, G. W. (1996) Microglia: a sensor for pathological events in the CNS. TINS *19(8)*, 312-318.

Lakso, M., Sauer, B., Mosinger, B. Jr., Lee, E. J., Manning, R. W., Yu, S. H., Mulder, K. L. and Westphal (1992). Targeted oncogene activation by site-specific recombination in transgenic mice. Proc Natl Acad Sci USA *89 (14),* 6232-6236.

Lin, Y. S., Ha, I., Maldonado, E., Reinberg, D. and Green, M. R. (1991). Binding of general transcription factor TFIIB to an acidic activating region. Nature *353 (6344),* 569-571.

Logan, J. and Shenk, T. (1984) Adenovirus Tripartite Leader Sequences enhances Translation of mRNAs Late after infection. PNAS 81*(12)*, 3655-3659

Kühn, R., Schwenk, F., Aguet, M., and Rajewsky, K. (1995). Inducible gene targeting in mice. Science *269*, 1427-1429.

Mayford, M., Bach, M. E., Huang, Y. Y., Wang, L., Hawkins, R. D. and Kandell, E. R. (1996). Control of memory formation through regulated expression of a CamKII transgene. Science *274*, 1678.

Mao, X., Fujiwara, Y., Chapedelaine, A., Yang, H. and Orkin, S. H. (2001). Activation of EGFP expression by Cre-mediated excision in a new ROSA26 reporter mouse strain. Blood *97,* 324-326.

Metzger, D., Clifford, J., Chiba, H. and Chambon, P. (1995). Conditional site-specific recombination in mammalian cells using a ligand-dependent chimeric Cre recombinase. Proc Natl Acad Sci USA *92*, 6991-6995.

Nagy, A. Rossant, J., Nagy, R., Abramow-Newerly, W. and Roder, J. C. (1993). Derivation of completely culture-derived mice from early-passage embryonic stem cells. Proc Natl Acad Sci USA *90*, 8424-848

No, D., Yao, T. P. and Evans, R. M. (1996). Ecdyson-inducible gene expression in mammalian cells and transgenic mice. Proc Natl Acad Sci USA *93*, 3346-3351.

Pardridge, W. M., (2001). Brain drug targeting – the future of brain drug development. Cambridge University Press

Pardridge, W. M., (2002). Drug and gene targeting to the brain with molecular Trojan horses. Nature reviews 1, 131-139

Possemato, R. Eggan, K., Moeller B.J., Jaenisch, R. and Jackson-Grusby, L. (2002) Flp recombinase regulated LacZ expression at the ROSA26 locus. Genesis *32(2)*, 184-6

Schnappinger, D., Schubert, P., Berens, C., Pfleiderer, K. and Hillen, W. (1999). Solvent-exposed residues in the Tet repressor (TetR) four-helix bundle contribute to subunit recognition and dimmer stability. J Biol Chem. *274(10)*, 6405-10.

Seibler, J., Zevnik, b., Küter-Luks, B., Andreas, S., Kern, H., Hennek, T., Rode, A., Heimann, C., Faust N., Kauselmann, G., Schoor, M., Jaenisch, R., Rajewski, K., Kühn, R. and Schwenk F. (2003). Rapid generation of inducible mouse mutants. Nucleic Acids Research *31(4)*, e12

Senecoff, J.F. and Cox, M. M. (1986). Directionality in FLP protein-promoted site-specific recombination is mediated by DNA-DNA pairing. J. Biol. Chem. *261(16)*, 7380-7386.

Schönig, K., Schwenk, F., Rajewsky, K. and Bujard, H. (2002). Stringent doxycycline dependent control of CRE recombinase *in vivo*. Nucleic Acids Research *30(23)*, e134

Schweinfest, C. W., Jorcyk, C. L., Fujiwara, S., Papas, T. S. (1988). A heat-shock-inducible eukaryotic expression vector. Gene *71(1)*, 207-210.

Schwenk, F., Baron, U. and Rajewsky, K. (1995) A cre-transgenic mouse strain for the ubiquitous deletion of loxP-flanked gene segments including deletion in germ cells. Nucleic Acids Res *23*, 5080-5081

Sigler, A., Schubert, P., Hillen, W. and Niederweis, M., Permeation of tetracyclines through membranes of liposomes and *Escerichia Coli*. Eur. J. Biochem *267*, 527-534

Single, F. N., Rozov, A., Burnashev, N., Zimmermann, F., Hanley, D. F., Forrest, D., Curran, T., Jensen, V., Hvalby, O., Sprengel, R. und Seeburg, P. H. (2000) Dysfunktions in Mice by NMDR Receptor Point Mutations NR1(N598Q) and NR1(N598R). The Journal of Neuroscience, *20(6)*, 2558-2566

Srinivas, S., Watanabe, T., Lin, C., William, C. M., Tanabe, Y., Jessell, T, M. and Costantini, F. (2001) Cre reporter strains produced by targeted insertion of *EYFP* and *ECFP* into the *ROSA26* locus. BMC Developmental Biology 1:4

Thomas, H. E., Stunnenberg H. G., Stewart A. F. (1993). Heterodimerization of the Drosophila ecdysone receptor with retinoid X receptor and ultraspiracle. Nature *362(6419),* 471-475.

Tribble, G., Ahn, Y. T., Lee J., Dandekar, T., and Jayaram, M. (2000). DNA Recognition, Strand Selectivity, and Cleavage Mode during Integrase Family Site-specific Recombination. J. Biol. Chem *275 (29),* 22255-22267.

Van Duyne, G. D. (2001). A structural view of cre-loxp site-specific recombination. Annu Rev Biophys Biomol Struct. *30*, 87-104.

Vooijs, M., Jonkers, J. and Berns, A. (2001) A highly efficient ligand-regulated Cre recombinase mouse line shows that LoxP recombination is position dependent. EMBO rep. *2(4)*, 292-297

Wang, Y., O`Malley, B. W., Jr., Tsai, S. Y. and O`Malley, B. W. (1994). A regulatory system for use in gene transfer. Proc Natl Acad Sci USA *91*, 8180-8184.

Yao, T. P., Forman, B. M., Jiang, Z., Cherbas, L., Chen, J. D., McKeown, M., Cherbas, P., and Evans, R. M. (1993). Functional ecdysone receptor is the product of EcR and Ultraspiracle genes. Nature *366*, 476-4769.

Xiaohong, M., Fujiwara, Y. and Orkin, S. (1999). Improved reporter strain for monitoring Cre recombinase mediated DNA excisions. Proc. Natl. Acad. Sci. USA *96*, 5037-5042

Yao, T. P., Segraves, W. A., Oro, A. E., McKeown, M. and Evans, R. M. (1992). Drosophila ultraspiracle modulates ecdysone receptor function via heterodimer formation. Cell *71(1)*, 63-72.

Yu, B., Lane, M. E., Pestell, R. G., Albanese, C., and Wadler, S. (2000). Downregulation of cyclin D1 alters cdk 4- and cdk2-specific phosphorylation of retinoblastoma protein. Mol Cell Biol Res Commun *3*, 352-359.

Zambrowicz, B. P., Imamoto, A., Fiering, S., Herzenberg, L.A., Kerr, W.G. and Soriano, P. (1997). Disruption of overlapping transcripts in the ROSA ßgeo 26 gene trap strain leads to widespread expression of ß-galactosidae in mouse embryos and hematopoetic cells. Proc Natl Acad Sci USA *94,* 3789-3794.