

**Entwicklung eines stringent kontrollierbaren
Toxingsystems zur Analyse degenerativer Prozesse
im Nervensystem der Maus**

Dissertation vorgelegt von
Stefanie Leuchtenberger

Entwicklungsbiologie und Molekulare Pathologie
Fakultät für Biologie
Universität Bielefeld

Oktober 2003

INHALTSVERZEICHNIS

ZUSAMMENFASSUNG

ABSTRACT

1	EINLEITUNG	1
1.1	ZIELE UND ANWENDUNGEN DER REGULIERTEN TOXINGENEXPRESSION	1
1.2	METHODEN ZUR SPEZIFISCHEN DELETION VON ZELLEN IM TIERMODELL	2
1.3	ANGEWENDETE KONDITIONALE TOXINGENEXPRESSION	3
1.3.1	<i>Virale Thymidin-Kinase und Ganciclovir</i>	3
1.3.2	<i>Das E.coli Nitroreduktase/CB1954-System</i>	3
1.4	INDUZIERBARE KONDITIONALE GENEXPRESSION	4
1.4.1	<i>Das Tetrazyklin-abhängige Expressionsystem</i>	4
1.4.1.1	Tet-off und Tet-on	5
1.4.1.2	Reduktion der Basalrate - Optimierungsstrategien für das Tet-System	6
1.4.1.3	Tet-System in transgenen Mäusen	8
1.4.1.4	Tet-System und Toxingenexpression	9
1.5	INDUZIERTER ZELLSTRESS UND ZELLTOD	11
1.5.1	<i>Stressreaktionen von Zellen</i>	11
1.5.2	<i>Mechanismen des Zelltods: Programmierter Zelltod und Nekrose</i>	11
1.5.3	<i>Übersicht über die Molekularbiologie der Apoptose</i>	13
1.5.4	<i>Pathologische Zustände der Zelle und programmierter Zelltod</i>	15
1.6	ZELLTYPEN IM ZNS UND IHRE ROLLE BEI NEURODEGENERATIVEN ERKRANKUNGEN	16
1.7	ZIELSETZUNG	19
2	MATERIAL UND METHODEN	20
2.1	MATERIALIEN, CHEMIKALIEN, AGENZIEN	20
2.2	ZELLBIOLOGIE	20
2.2.1	<i>Zelllinien</i>	20
2.2.2	<i>Kulturmedien</i>	21
2.2.3	<i>Antibiotika/Medienzusätze</i>	21
2.2.4	<i>Oligonucleotide</i>	22
2.2.5	<i>Antikörper</i>	23
2.2.6	<i>Plasmide</i>	24
2.3	ZELLKULTURMETHODEN	25
2.3.1	<i>Steriles Arbeiten</i>	25
2.3.2	<i>Ablösen adhärenter Zellen</i>	25
2.3.3	<i>Einfrieren und Auftauen von Zellen</i>	25
2.3.4	<i>Transfektion von Plasmid DNA in kultivierten Zellen</i>	26

2.3.5	<i>Immunfluoreszenz</i>	26
2.3.6	<i>Zellvitalität</i>	27
2.4	MOLEKULARBIOLOGIE	28
2.4.1	<i>Plasmidisolierung aus Bakterien</i>	28
2.4.2	<i>Isolierung von Gesamt-RNA aus kultivierten Zellen</i>	29
2.4.3	<i>Konzentrationsbestimmung von RNA-Lösungen</i>	29
2.4.4	<i>Reverse Transkription</i>	29
2.4.5	<i>Polymerase-Kettenreaktion (PCR)</i>	30
2.4.6	<i>Gradienten-PCR</i>	31
2.4.7	<i>Realtime-PCR</i>	31
2.4.8	<i>Agarose-Gelelektrophorese</i>	32
2.5	PROTEINBIOCHEMIE	33
2.5.1	<i>Proteinaufreinigung aus kultivierten Zellen</i>	33
2.5.2	<i>Proteinbestimmung</i>	34
2.5.3	<i>SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)</i>	34
2.5.4	<i>Immunblot (Semidry-Elektroblot, Westernblot)</i>	36
2.5.5	<i>Enzym-vermittelte Chemilumineszenz (ECL)</i>	37
2.6	ANALYSE TRANSGENER MÄUSE	38
2.6.1	<i>Mauslinien</i>	38
2.6.2	<i>Genetische Frühdiagnostik</i>	39
2.6.3	<i>Diagnostik-Primer</i>	39
2.6.4	<i>Schnellpräparation von DNA aus Schwanzspitzen</i>	39
2.6.5	<i>Induktion der doppelt-transgenen Tiere</i>	40
2.6.6	<i>Präparation der Tiere</i>	40
2.6.7	<i>Herstellen von Fibroblasten-Primärkulturen</i>	40
2.6.8	<i>RNA-Präparation aus Gewebe</i>	41
2.7	AUFARBEITUNG DER GEWEBE FÜR HISTOLOGISCHE METHODEN	42
2.7.1	<i>Anfertigung von Gefrierblöcken</i>	42
2.7.2	<i>Anfertigung von Gewebeschnitten</i>	42
2.7.3	<i>Methanolfixierung</i>	42
2.7.4	<i>Paraform-Aldehyd (PFA)-Fixierung</i>	42
2.7.5	<i>Immunhistochemie an Gefrierschnitten</i>	43
2.8	STANDARDFÄRBEMETHODEN	44
2.8.1	<i>NISSL</i>	44
2.8.2	<i>Kernfärbung mit DNA-bindenden Fluoreszenzfarbstoffen</i>	44
2.8.3	<i>HE (Hämatoxylin/Eosin)</i>	44
2.8.4	<i>Acridinorange-Färbung</i>	45
2.9	DOKUMENTATION UND AUSWERTUNG	45

3	ERGEBNISSE	46
3.1	REGULIERTE <i>BARNASE</i> -EXPRESSION DURCH EIN MODIFIZIERTES TETRAZYKLIN-ABHÄNGIGES EXPRESSIONSSYSTEM UND EIN DARAUS RESULTIERENDER ZELLTOD	46
3.2	UNTERSUCHUNGEN ZUM <i>BARNASE</i> -ABHÄNGIGEN ZELLTOD IN ZELLKULTUR	53
3.2.1	<i>Veränderungen der Zellmorphologie in Abhängigkeit der barnase-Induktion</i>	53
3.2.2	<i>Ultrastrukturelle Veränderungen der Zelle nach barnase-Induktion</i>	56
3.2.3	<i>Induktion des barnase-Gens führt zu Stressreaktionen der Zellen</i>	56
3.2.4	<i>Apoptosenachweis induzierter D7-Zellen</i>	61
3.3	ANALYSE VON AKTIVATOR- UND <i>BARNASE</i> -TRANSGENEN MÄUSEN	63
3.3.1	<i>Barnase-transgene Tiere sind vital</i>	63
3.3.2	<i>Doppelt-transgene Mäuse: CMV-rtTA/bar und GFAP-rtTA/bar</i>	64
3.3.3	<i>Induktion von Primärfibroblasten CMV-rtTA/bar-transgener Mäuse führt zur barnase-Expression und zum Absterben der Primärzellen</i>	64
3.3.4	<i>Das Absterben induzierter transgener Primärzellen korreliert mit Veränderungen der Kernmorphologie</i>	67
3.3.5	<i>Ultrastrukturelle Veränderungen der CMV/bar-Primärfibroblasten nach Induktion</i>	68
3.3.6	<i>Induktion CMV/bar-Primärfibroblasten führt zu Veränderungen von Hsp-70 und Ubiquitin</i>	70
3.3.7	<i>Apoptose-Nachweis durch Caspase 3-Immunfluoreszenz</i>	73
3.4	KONDITIONALE <i>BARNASE</i> -EXPRESSION IN TRANSGENEN MÄUSEN	74
3.4.1	<i>Analyse der barnase-Induktion in Geweben induzierter transgener Mäuse</i>	74
3.4.2	<i>Barnase-mRNA ist nach Induktion in Geweben CMV-rtTA/bar-transgener Mäuse nachweisbar</i>	74
3.4.3	<i>Nachweis von barnase-mRNA im ZNS von induzierten GFAP-rtTA/bar-transgenen Mäusen</i>	77
3.5	UNTERSUCHUNGEN HISTOLOGISCHER VERÄNDERUNGEN IM ZNS INDUZIERTER TRANSGENER MÄUSE	79
3.5.1	<i>Histologische Veränderungen im ZNS von CMV/bar-Mäusen nach Induktion</i>	79
3.5.2	<i>Darstellung veränderter Neurone im Großhirn durch Nissl-Färbung</i>	79
3.5.3	<i>Zytologische Veränderungen durch barnase-Induktion im Großhirn und Cerebellum von CMV/bar-Mäusen</i>	81
3.5.4	<i>Nachweis apoptotischer Zellen im Großhirn und Hirnstamm</i>	84
3.5.5	<i>Histopathologische Veränderungen im ZNS von GFAP/bar-Mäusen nach Induktion</i>	85
3.5.6	<i>Darstellung von Neuronen und Glia durch Nisslfärbung im Großhirn</i>	85
3.5.7	<i>Hinweise auf pathologische Veränderungen von Blutgefäßen im Großhirn von GFAP/bar-Mäusen durch GFAP-Darstellung</i>	85
3.5.8	<i>Mikroglia-Aktivierung im Großhirn induzierter GFAP/bar-Mäuse</i>	89
3.5.9	<i>Ubiquitin-Akkumulation im Großhirn von induzierten GFAP/bar-Mäusen</i>	89
3.5.10	<i>Nachweis apoptotischer Zellen im Großhirn von induzierten GFAP/bar-Mäusen</i>	91

4	DISKUSSION	93
4.1	REGULATION DER <i>BARNASE</i> -EXPRESSION DURCH EIN MODIFIZIERTES TET-ABHÄNGIGES-EXPRESSIONSSYSTEM IN ZELLKULTUR	93
4.2	MECHANISMEN DES ZELLTODS NACH INDUKTION DER <i>BARNASE</i>	95
4.3	ANWENDUNG DES <i>BARNASE/TET</i> -SYSTEMS IN <i>CMV/BAR</i> - UND <i>GFAP/BAR</i> -TRANSGENEN MÄUSEN	97
4.4	BEWERTUNG DER HISTOPATHOLOGISCHEN BEFUNDE IM ZNS DER INDUZIERTEN TRANSGENEN MÄUSE	99
4.5	BEWERTUNG DES <i>BARNASE/TET</i> -SYSTEMS ALS NEUE STRATEGIE DER KONTROLLIERTEN TOXINGEN-EXPRESSION FÜR ZELLSPEZIFISCHE ANWENDUNG IM ZNS	101

LITERATURVERZEICHNIS

ANHANG

- I. ABBILDUNGSVERZEICHNIS
- II. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS
- III. SEQUENZEN

Zusammenfassung

Viele degenerative Erkrankungen werden auf den Verlust bestimmter Zelltypen im Organismus zurückgeführt. Um Erkrankungen im Tiermodell zu simulieren, ist es erforderlich, mithilfe genetischer Methoden einen kontrollierten Zelltod ohne invasiven Eingriff herbeizuführen. In einem derartigen Tiermodell kann eine detaillierte Analyse von pathologischen Prozessen und Zellinteraktionen vorgenommen werden. In dieser Arbeit wurde eine konditionale Toxingenexpression durch Modifikation des Tetrazyklin (Tet)-abhängigen Expressionssystems in Kombination mit der bakteriellen Ribonuklease Barnase für Anwendungen in postmitotischen und wenig proliferativen Zellen optimiert. Die regulierte *barnase*-Expression und die Zytotoxizität des Genprodukts wurden in Zellkultur, in Primärzellen transgener Mäuse und beispielhaft im Nervensystem von transgenen Mäusen untersucht. Ein modifizierter Pflanzen-Virus-35S-Promotor (TF), der in Vorarbeiten als Zielpromotor von Tet-abhängigen Transaktivatoren (tTA; reverser tTA) eine niedrige Leckexpression in uninduzierten Zellen zeigte, wurde für die Toxingenanwendung verwendet. Die durch Wegnahme vom Tet-Derivat Doxizylin (Dox) induzierte Expression der *barnase* in doppelt-stabilen CHO-Klonen (CMV-tTA/bar) führte zum Zelltod. Auch durch die Expression des tTA unter Kontrolle des neuronenspezifischen Enolase-Promotors (NSE) wurde eine regulierte Expression in doppelt-stabilen Neuro2A-Zellen (NSE-tTA/bar) beobachtet. Nach Induktion durch Dox erreichte die *barnase*-Expression einen Maximalwert nach 5 Tagen; der Zelltod trat ~ 16 Tage später ein. Die induzierten Zellen reagierten auf die gesteigerte *barnase*-Expression mit signifikanten Hsp70- und Ubiquitin Veränderungen, die stellvertretend als Stressmarker untersucht wurden. Zytologische Untersuchungen zeigten einen von autophagischen Prozessen gekennzeichneten programmierten Zelltod.

TF-*barnase*-transgene Mäuse waren vital, ebenso doppelt-transgene *CMV-rtTA/bar*- (viral kontrollierter Transaktivator/*barnase*) und *GFAP-rtTA/bar*-Mäuse (astrozytenspezifischer Transaktivator/*barnase*). Primärfibroblasten *CMV-rtTA/bar*-transgener Tiere wurden in Zellkultur durch Dox induziert; sie zeigten ebenfalls eine induktionsabhängige *barnase*-Expression und einen Zelltod nach ~ 7 Tagen. Dabei waren auch eine Zunahme von Hsp70 und Ubiquitin und ein verzögerter Zelltod mit autophagischer Morphologie zu beobachten. Nach Dox-Induktion der *CMV-rtTA/bar*- und *GFAP-rtTA/bar*-transgenen Mäuse wurde die stärkste *barnase*-Expression im Skelettmuskel und im Großhirn von *CMV-rtTA/bar*-Mäusen erreicht, die *GFAPrtTA/bar*-Mäuse zeigten im Kleinhirn und im Großhirn eine gute Induktionsfähigkeit. Trotz der gesteigerten *barnase*-Expression wurde keine vollständige Deletion der betroffenen Zellen beobachtet. Im geringen Ausmaß gab es im ZNS von beiden transgenen Linien jedoch Hinweise auf pathologische Vorgänge wie Neurodegeneration und Astroglie. Im ZNS von induzierten *GFAP-rtTA/bar*-Mäusen, in denen primär die Astrozyten durch *barnase*-Expression betroffen sein sollten, konnten pathologische Veränderungen festgestellt werden. So wurden neben Astroglie, Mikroglia-Aktivierung und Anzeichen für Neurodegeneration auch erweiterte, durch aktivierte Astrozyten umgebene Blutgefäße beobachtet, die auf Degeneration von Astrozyten oder deren Funktionsverlust hinwiesen.

Die durchgeführten Untersuchungen zeigen, dass sowohl in Zellkultur als auch eingeschränkt im transgenen Organismus eine regulierte Toxingenexpression durch das modifizierte Tet/Barnase-System erreichbar war und damit eine Alternative zu bestehenden Methoden für die Untersuchung von Pathomechanismen degenerativer Erkrankungen im ZNS darstellt.

Abstract

To analyse molecular events in pathological processes and cell interactions underlying degenerative diseases, a genetic approach of conditional cell ablation is desirable. In my thesis, conditional cell ablation was optimized for applications in post-mitotic and slowly proliferative cells by modification of the tetracycline (tet)-dependent expression system in combination with the bacterial ribonuclease *barnase*. The regulated *barnase* expression and the cytotoxicity of the gene product were examined in cell culture, in primary cells of transgenic mice and in the nervous system of transgenic mice.

In reporter gene studies a modified plant-virus-35S-promoter (TF) showed a low basal expression rate in the uninduced state in the presence of tet-dependent transactivators (tTA and reverse tTA). Under control of TF the expression of *barnase* in double-stable CHO clones (CMV-tTA/bar) was induced by removal of the Tet derivative Doxycyclin (dox) and led to cell death only after induction. In addition, expression of tTA under control of the neuron specific enolase promoter (NSE) led to induced *barnase*-expression in double-stable Neuro2A cells (NSE-tTA/bar). After induction of cells with dox, *barnase*-expression levels reached a maximal value after 5 days; a delayed cell death was observed after ~ 16 days. Dox-induced cells showed significant Hsp70- and Ubiquitin expression changes after increased *barnase*-expression. Morphological analysis showed a programmed cell death accompanied by autophagic processes.

TF-*barnase* transgenic mice crossed with either *CMV-rtTA* (cytomegalovirus promoter controlled transactivator/*barnase*) or *GFAP-rtTA* (glia fibrillary acidic protein controlled transactivator/*barnase*) transgenic mice were viable. Primary fibroblasts prepared from *CMV-rtTA/bar* transgenic animals were induced in cell culture by dox; they showed an induction-dependent *barnase*-expression and cell death after ~ 7 days. Similar to CHO cells, an increase in Hsp70- and Ubiquitin expression as well as cell death with autophagic morphology was observed. When both transgenic mouse lines were induced by dox the strongest *barnase*-expression was reached in skeletal muscle and in the cortex of *CMV rtTA/bar* mice. In *GFAP-rtTA/bar* mice *barnase*-expression was maximal in the cerebellum and in the cortex. Despite an induced *barnase*-expression, which was able to ablate primary cells from transgenic mice, only a low frequency of ablation of rtTA-expressing cells was observed. However to a smaller extent signs of degeneration (e. g. neurodegeneration and astrogliosis) in the CNS of both transgenic mouse lines were observed.

In the CNS of induced *GFAP-rtTA/bar* mice, in which astrocytes express rtTA and consequently *barnase*, pathological changes have been determined. Besides astrogliosis, microglial activation and signs for neurodegeneration, blood vessels were dilated and surrounded by activated astrocytes. This feature referred to degeneration of astrocytes or their loss of function.

Taken together the analysis of this cell ablation approach demonstrates that in cell culture and to a limited extent in transgenic mice, a conditional cell ablation is feasible. By its universal application, e. g. by crossing *barnase*-transgenic mice with cell-specific transactivator mice, this system represents an alternative to existing methods for the investigation of pathomechanisms of degenerative diseases, also in the CNS.

1 Einleitung

1.1 Ziele und Anwendungen der regulierten Toxingenexpression

Die Entwicklung eines Systems, das es erlaubt, spezifische Zelltypen im Organismus an definierten Zeitpunkten zum Absterben zu bringen, könnte die Basis für die Entwicklung von Tiermodellen vieler menschlicher degenerativer Krankheiten darstellen.

Zellverluste ergeben sich in erkranktem Gewebe normalerweise aus Nekrose oder programmiertem Zelltod (Hetts, 1998; Rinkenberger et al., 1997; MacLellan et al., 1997). Die Gründe dafür können sehr vielfältig sein, der Zellverlust in einem hochspezialisierten Gewebe führt aber immer zur Beeinträchtigung der spezifischen Funktion. Besitzt das Gewebe keine ausreichende Regenerationsfähigkeit, resultieren hieraus klinisch auffällige Krankheitsbilder, so z.B. im zentralen Nervensystem (ZNS). Hier verursacht der Verlust einer kleinen Zellpopulation spezifischer dopaminergener Neurone in der *Substantia nigra* die „Parkinson`sche Krankheit“ (z.B. Barbosa et al., 1997). Die Ursachen sind heterogener Natur und in vielen Fällen noch nicht eindeutig geklärt, insbesondere was die Beteiligung anderer Zelltypen im ZNS betrifft (Übersicht: Lotharius und Brundin, 2002). Die Symptome der Erkrankung treten erst auf, nachdem bereits ca. 70 % der Neurone in diesem Kerngebiet im Mittelhirn degeneriert sind, viele pathologische Prozesse bleiben bis zur Ausprägung der Erkrankungen unerkannt. Durch die Bedeutung von Zell-Interaktionen bei dem Verlauf neurodegenerativer Erkrankungen ist es schwierig innerhalb der Pathogenese zwischen Ursache und Sekundärreaktionen zu unterscheiden.

Erste Ansätze zeigen, dass durch eine zeitlich und örtlich kontrollierte Induktion der Degeneration pathologische Prozesse genauer charakterisiert werden können (Bush et al., 1998, 1999; Lee et al., 1998). Es besteht dann die Möglichkeit, schon in frühen, simulierten Krankheitsphasen lange vor Auftreten der Symptome nach Markern zu suchen, die für den beginnenden Zelltod diagnostisch sind. Kann der Zelltod innerhalb des angewendeten Systems reversibel kontrolliert werden, können Reparatur- und Regenerationsprozesse und die daran beteiligten Zelltypen des ZNS untersucht werden. Weiterhin können herbeigeführte Zellverluste in verschiedenen Entwicklungsstadien eines Organismus zur Untersuchung von Interaktionen unterschiedlicher Zellpopulationen, sowie zur genauen Bestimmung der Funktion bestimmter Zelltypen in der Entwicklung und in der Adoleszenz beitragen. In der Tumorthherapie wird mit Hilfe gentherapeutischer Ansätze an der gezielten Ausschaltung transformierter Zellen durch tumorspezifische Toxingenexpression geforscht. In der Gentherapie, aber auch in der Stammzellforschung werden Sicherungssysteme für notwendig gehalten, die viral transduzierte, genmanipulierte und tumorgene Zellen selektiv aus dem behandelten Gewebe entfernen

können, um so potenzielle Gefahren dieser Zellen abzuwenden (Moolten et al., 2002; Schuldiger et al., 2003).

1.2 Methoden zur spezifischen Deletion von Zellen im Tiermodell

Um die Funktionen bestimmter Zellpopulationen oder anatomischer Strukturen im Organismus zu studieren, werden diese durch verschiedene Techniken ausgeschaltet. Die gezielte Zerstörung von Zellen und Gewebe im Tiermodell durch physikalische und pharmakologische Methoden ist wenig selektiv und z.T. lokal ungenau (Sulston et al., 1983; Shah et al., 1993). Invasive Eingriffe induzieren eine starke Reaktion des betroffenen Gewebes, so dass die nachfolgende Analyse im molekularen und zellulären Bereich schwer den Ursachen zuzuordnen ist. In einigen Fällen kann der zellspezifische Metabolismus dazu führen, dass Toxine selektiv bestimmte Zellen zerstören. So wird im ZNS die besondere Sensibilität dopaminergener Neurone für einige Toxine genutzt, um Parkinson-ähnliche Symptome im Tiermodell auszulösen, z.B. durch intravenöse MPTP (1-Methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 6-tetrahydropyridine) und 6-OHDA (Hydroxydopamin)-Injektionen (Übersicht: Lotharius und Brundin, 2002; Ungerstedt 1968; Cohen und Heikkilä 1974).

Die höchste Selektivität bei der Ausschaltung von Zelltypen wird mit Hilfe genetischer Anwendungen erreicht. Dabei wird die Expression eines Zytotoxins in einem transgenen Tier durch zelltypspezifische Promotoren kontrolliert. Durch konstitutive Expression von Toxinen, wie z.B. das Diphtheria-Toxin-A (DT-A) oder Ricin wurden bereits verschiedene Zelllinien und Gewebe ausgeschaltet (Breitman et al., 1987; Palmiter et al., 1987; Landel et al., 1988; Lem et al., 1991; Messing et al., 1991). Die Probleme hierbei sind hohe Letalitätswahrscheinlichkeiten von Toxin-transgenen Tieren, sowie die Beeinflussung der Zell-Zell-Interaktionen während der Entwicklung, da das Toxin sofort nach dem entwicklungsgemäßen Anschalten des jeweiligen Promotors exprimiert wird und die entsprechenden Zellen absterben.

Konditionale Anwendungen der Toxinexpression haben den Vorteil, dass sie zeitlich kontrolliert und reversibel eingesetzt werden können. So ist es möglich, Zellen nach vorheriger normaler physiologischer Entwicklung, aber auch innerhalb unterschiedlicher Entwicklungsstadien auszuschalten. Zu den klassischen konditionalen Systemen gehört einerseits das Absterben von genetisch veränderten Zellen nach Gabe einer Pro-Droge (*HSV-TK* und Ganciclovir; *E.coli-Ntr* und CB1954), andererseits die induzierbaren, heterologen Expressionssysteme, wie z.B. die Kopplung geeigneter Suizidgene an das Tetrazyklin-induzierbare Expressionssystem (Borelli et al., 1988; Knox et al., 1993; Lee et al., 1998).

1.3 Angewendete konditionale Toxingenexpression

1.3.1 Virale Thymidin-Kinase und Ganciclovir

Die Expression des Herpes-Simplex Thymidin-Kinase-Gens (*HSV-tk*) ist für eukaryotische Zellen solange unschädlich, bis eine Anti-Herpes-Droge wie z.B. Ganciclovir (GCV) verabreicht wird. GCV wird durch die virale Thymidinkinase phosphoryliert und als Nucleotid-Analogen in proliferierende Zellen eingebaut. Dieser Mechanismus führt zum Absterben mitotischer Zellen (Borelli et al., 1988, 1989; Heyman et al., 1998). Die Fusion des *Tk*-Gens mit einem gewebsspezifischen Promotor führt zur Expression von *HSV-Tk* in den Zelltypen, die den Promotor erkennen, wodurch ein Zellverlust erreicht werden kann. Gerade durch die Charakterisierung neuer gewebsspezifischer Promotoren findet dieses System der Toxinexpression eine breite Anwendung, wie z.B. in dendritischen, antigenpräsentierenden Zellen (Salomon et al., 1994), in Oligodendrozyten und Astrozyten der postnatalen Phase (Mathis et al., 2000; Delaney et al. 1996), aber auch zur potentiellen Absicherung der zur Entartung neigenden Stammzellen (Schuldiner et al., 2003).

Da die Toxinwirkung an die Proliferation von Zellen gebunden ist, ist sie im adulten Organismus oft nur nach Läsionen, wie z.B. im Gehirn (Astrozyten, Oligodendrozyten) und in einigen postmitotischen Zellen gar nicht einsetzbar, wie z.B. im neuronalen Anteil des Nervengewebes (Nolte et al., 2001; Bush et al., 1998, 1999; Cortez et al., 2000). Für die Tumorthherapie wird das GCV/*HSV-Tk*-System in gentherapeutischen Ansätzen intensiv hinsichtlich seiner Effizienz und Anwendbarkeit erforscht (Parks et al., 2003; Park et al., 1997; Culver et al., 1992; Moolten et al., 1990).

1.3.2 Das *E.coli* Nitroreduktase/CB1954-System

Die *E.coli* Nitroreduktase (*Ntr*) reduziert die Pro-Droge CB1954 (5-Aziridin-1-yl-2-4-dinitrobenzamid) zu einem zytotoxischen Derivat (Knox et al., 1993; Bridgewater et al., 1995), welches alkylierend wirkt und den Zelltod durch die Stimulierung eines p53-unabhängigen apoptotischen Signaltransduktionsweges auslöst. Die toxische Wirkung ist somit unabhängig von Zellproliferation und Zelldifferenzierung und auch in adulten Geweben und in postmitotischen Zellen anwendbar (Cui et al., 1999). Die Fusion des *Ntr*-Gens mit einem gewebsspezifischen Promotor führt zu einem System, in dem spezifischer Zellverlust durch Gabe von CB1954 erreicht werden kann (analog zu *HSV-Tk* und GCV). Für die konditionale Ausschaltung spezifischer Zellpopulationen transgener Mäuse, wie z.B. in der Brustdrüse, im Blut, sowie von Astrozyten, wurde diese Technik verwendet und ist eine Alternative zu dem

HSV-Tk/GCV-System (Clark et al., 1997; Drabek et al., 1997; Cui et al., 2001). Durch gentherapeutische Übertragungstechniken via viralen Gentransfer wird das *Ntr*-Gen in Tumorzellen eingeführt und zur gezielten Zerstörung von Tumorgewebe verwendet (Djeha et al., 2000; Bilslund et al., 2003). Der entscheidende Vorteil ist die Anwendung in postmitotischen Zellen, wie in Neuronen des ZNS adulter Organismen (Isles et al., 2001). Probleme gibt es dagegen durch die Toxizität der Pro-Drogen, die in den benötigten Dosierungen oft direkt zum Tod der Versuchstiere führen.

1.4 Induzierbare konditionale Genexpression

Um die Mechanismen der eukaryotischen Genexpression in verschiedenen Stadien der Embryonalentwicklung, sowie in unterschiedlichen Geweben zu untersuchen, sind Expressionssysteme erforderlich, die spezifische Gene in unterschiedlichen Entwicklungsstadien an- und abschalten können. Diese Expressionssysteme basieren auf der Bindung von Induktoren an transkriptionelle Aktivatoren oder Repressoren, die so deren DNA-Bindungseigenschaften modulieren und direkt auf die Expression eines Zielgens Einfluss nehmen, wie z.B. das Tetrazyklin-abhängige Expressionssystem und die *Cre/lox/flp*-Technologie in Kombination mit induzierbaren Expressionssystemen (Tet-System/Östrogen-Rezeptor-basierendes Tamoxifen).

1.4.1 Das Tetrazyklin-abhängige Expressionssystem

Das bekannteste und am häufigsten verwendete Liganden-abhängige binäre Expressionssystem ist das Tetrazyklin (Tet)-abhängige Expressionssystem. Es basiert auf dem Tet-Resistenzoperon aus *Escherichia coli* (*E.coli*), welches auf dem Tn10-Transposon lokalisiert ist. Im bakteriellen System ist das Tet-Resistenzgen durch den Tet-Repressor (*tetR*) negativ reguliert. In Anwesenheit des Antibiotikums bindet der Repressor nicht an seine Target-Sequenz (*tetO*), und das Tet-Resistenzgen wird exprimiert. Das unterschiedlich modifizierte *tetR*-Protein und die regulatorischen Sequenzen des Tet-Operons bilden die Grundlage des heute vielfach angewendeten Expressionssystems. Die prokaryotischen Regulationsmechanismen zeigen eine spezifische on/off-Regulation. In eukaryotischen Zellen binden die Regulationselemente ausschließlich an ihre Targetsequenzen, da diese in tierischen Zellen nicht existieren. Zusätzlich erwies sich der Induktor Tetrazyklin bzw. Doxizylin (Dox) selbst in höheren Dosierungen als unkritisch.

1.4.1.1 Tet-off und Tet-on

Um das *E.coli*-Resistenz-System für die regulierte Expression von Fremdgenen in eukaryotischen Zellen anzupassen, wurde der tetR durch Fusion mit der Aktivierungsdomäne des *Herpes-Simplex-Virus* VP16-Proteins zu einem transkriptionellen Aktivator umgewandelt (Gossen und Bujard, 1992). Der virale Faktor VP16 rekrutiert initiale Transkriptionsfaktoren und stellt die virale Transkription über die der Wirtszelle (Herr 1998). In Fusion mit dem tetR (AS 1-207) erfüllt die VP16-Domäne Transaktivierungsfunktion (Triezenberg et al., 1989). Der so entstandene tTA (tetracycline transcriptional activator) bindet in Abwesenheit des Antibiotikums an die tetO-Sequenzen eines Zielpromotors und aktiviert die Genexpression. Die regulatorische tetO-Region besteht aus sieben direkten Wiederholungen einer 42 bp langen Operatorsequenz, die sich vor einem Cytomegalovirus (CMV) - Minimalpromotor befindet. Eine mutagenisierte Version des tTA, welche an die tetO-Sequenzen in Anwesenheit von Dox bindet und somit die Transkription aktiviert, wurde 1995 von Gossen und Bujard vorgestellt. Der sogenannte rtTA (reverse tTA) hat kinetisch den Vorteil, dass in niedrigen Dosierungen des Tetrazyklinderivats die Expression eines Gens schnell und kontrollierbar angeschaltet werden kann. Das ist gerade bei transgenen Mäusen von Vorteil. Die Tiere müssen zur Repression des Aktivators nicht permanent unter Tc/Dox gehalten werden. Die Aktivierung des Transgens durch Antibiotika-Entzug ist im Gegensatz zur Aktivierung durch Antibiotika-Gabe langsam und graduell (Kistner et al., 1996; Robertson et al. 2002). Ein Nachteil des rtTAs ist seine Restaffinität für tetO-Sequenzen auch in der Abwesenheit von Dox. Die daraus resultierende basale Expression ist für besonders für die regulierte Toxinexpression unvorteilhaft.

Die beiden Systeme sind auch in Adeno- und Lentiviralen Vektoren verfügbar und werden für gentherapeutische Anwendungen optimiert (z. B. Chtarto et al., 2003, Kafri et al., 2000).

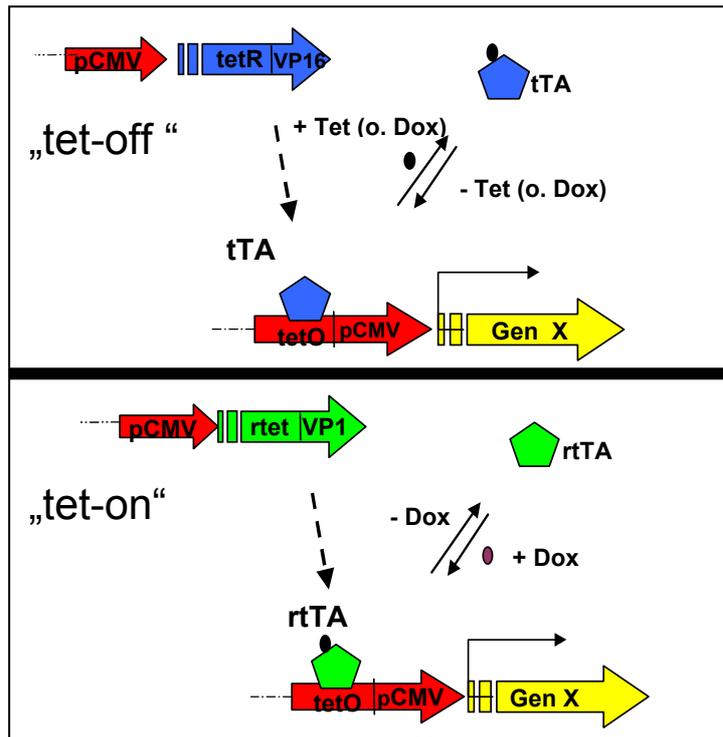


Abb 1.1: Schematische Darstellung der Genregulation durch „tet-off“ und „tet-on“.

Der tTA ist ein Fusionsprodukt aus Wildtyp-Repressor (tetR) und C-Terminus der VP16-Domäne des *Herpes-Simplex-Virus*. Das tetO-Element des Targetvektors besteht aus sieben Kopien der tet-Operatorsequenz (42bp). Diese Sequenz liegt stromaufwärts eines CMV-Minimalpromotors. In Abwesenheit von Tet (o. Derivat) bindet tTA an die tetO-Sequenz und aktiviert die Genexpression von Gen X (GOSSEN UND BUJARD 1992)

Der reverse tet-Aktivator (rtTA) wurde durch den Austausch von 4 AS erzeugt. Nach Fusion mit der VP16-Region funktioniert das Hybrid-Protein als reverser Transaktivator, der in Anwesenheit von Dox die Transkription initiiert (GOSSEN UND FREUNDLIEB 1995).

1.4.1.2 Reduktion der Basalrate - Optimierungsstrategien für das Tet-System

Die Aktivierung von Toxingenen durch Pro-Drogen und induzierbare konditionale Expressionssysteme sind entweder an die Proliferation von Zellen gebunden oder durch Regulationsprobleme nicht optimal für eine Toxinexpression geeignet. Für Anwendungen im ZNS sind proliferations-gekoppelte Systeme nur bedingt anwendbar. Für die gezielte Ausschaltung der in der Regel postmitotischen Neurone müssen bestehende genetische Expressionssysteme optimiert werden.

Gerade in Bezug auf eine regulierte Toxingenenexpression ist eine Basalrate nicht tolerierbar (Paulus et al., 1997) und führt zum unerwünschten Absterben von Zellen. Modifikationen innerhalb des Tet-Systems sollen zu einer niedrigen Residualaktivität bei ausreichend hoher Aktivierbarkeit führen. In der nachfolgenden Tabelle sind einige Varianten des Expressionssystems aufgeführt, welche diese Probleme lösen sollen.

Typ	Aktivität	Induktion	Referenz
tTSkid/rtTA	Repressor	-/+	Freundlieb et al., 1995
tTR/rtTA	Repressor	-/+	Zhu et al., 2001
rtTA2-M2	Aktivator	+	Urlinger et al., 2000

Tab. 1.1: *Optimierte Tetrazyklin-regulierte Expressionssysteme.*

Die Aktivität ist induziert (+) oder reprimiert (-) durch Doxyzyklin (Ryding et al., 2001; modifiziert).

Eine Möglichkeit die unerwünschte Bindung des Aktivators im uninduzierten Zustand zu verhindern, ist die Blockierung seiner Targetsequenz (tetO-Elemente). Durch Fusion des Tet-Repressors mit der KRAB-Silencer-Domäne des humanen Kox-1-Gens wurden Repressoren entwickelt, die in Abwesenheit von Tc/Dox an die tetO-Sequenzen des Zielgens binden (Freundlieb et al., 1995; Rossi et al., 1998; Sander et al., 2000). So können rtTA und Repressor parallel in der Zelle exprimiert und gegensätzlich vom Induktor kontrolliert werden. In Anwesenheit von Tc/Dox dissoziiert der Repressor von den tetO-Sequenzen. Der rtTA kann dort binden und die Transkription initiieren. Die Basalrate konnte so um den Faktor 6 verringert werden (Forster et al., 1999). Auch *in vivo* wurde diese Strategie angewendet; die Basalrate wurde gesenkt, ohne die Induktionsfähigkeit zu beeinträchtigen (Zhu et al., 2001). Ein offensichtlicher Nachteil ist die Notwendigkeit von zwei Transfaktoren, also auch die Verfügbarkeit von dreifach transgenen Mäusen und damit die Gefahr einer ungleichmäßigen Expression durch unterschiedliche chromosomale Integration.

Eine Alternative ist die Verbesserung der Eigenschaften des rTAs durch Mutagenese und Veränderung der Transaktivierungsdomäne. Die rtTA2-M2-Variante zeigte, im Vergleich zum rtTA, in Zellkulturexperimenten eine niedrigere Basalrate bei verbesserter Doxyzyklin-Sensitivität und guter Induzierbarkeit (Urlinger et al., 2000).

Ein weiterer Ansatz ist eine Reduzierung der Leckexpression durch Modifizierung des Targetpromotors. Im Originalpromotor befinden sich SP-1-Bindungssequenzen, die unabhängig vom Aktivator zu einer Transkriptionsfaktor-Rekrutierung führen können. Um die Basalaktivität des CMV-Minimalpromotors zu senken, wurden neue Promotoren konstruiert. Eine modifizierte MMTV-Sequenz (mouse mammary tumor virus promoter), deren Steroid-Bindungs-elemente gegen tetO-Elemente ausgetauscht wurden, wurde als Targetpromotor getestet (Hoffmann et al., 1997). Verglichen mit dem Originalpromotor zeigte sich eine geringere Basalrate, aber auch eine ungefähr zehnfach niedrigere Induktion. Um mögliche Synergieeffekte zu vermeiden, wurden außerdem synthetische tetO-Elemente durch unterschiedliche Spacer-Sequenzen getrennt und zusammen mit einem pflanzlichen Viruspromotor hinsichtlich der Basalrate und

Induktionsfähigkeit untersucht (Leuchtenberger et al., 2001). Hier zeigte sich in Zellkulturstudien eine deutliche Reduzierung der Basalrate bei ausreichender Induktionsfähigkeit, aber auch eine Abhängigkeit vom jeweiligen Zelltyp. Da das optimale Funktionieren des Tet-Systems insbesondere in transgenen Tieren von unterschiedlichen Parametern, wie z.B. Promotoreigenschaften, Zellphysiologie, Gewebe und Integration ins Chromatin abhängig ist, ist es meistens notwendig für eine bestimmte Fragestellung ein optimiertes Tet-System zu verwenden. Im Hinblick auf die Toxingenexpression ist eine niedrige Basalrate Voraussetzung, ferner muss gewährleistet sein, dass das Expressionssystem trotz zelltypspezifischer Promotoren eine ausreichende Aktivierungsfähigkeit bietet.

1.4.1.3 Tet-System in transgenen Mäusen

Dieses Expressionssystem wurde bereits vielfach angewendet, um Gene und ihre Funktionen in der Maus zu charakterisieren. tTA- und rtTA-transgene Mäuse, gekreuzt mit Luciferase- oder β -Galactosidase-Reporterstämmen, zeigten beides, gelungene praktische Anwendungen, sowie die bestehende Problematik (Furth et al., 1994, Kistner et al., 1996). Zwischen den verschiedenen transgenen Linien variierte die Reporterexpression, was möglicherweise an unterschiedlicher chromosomaler Integration und unterschiedlicher Anzahl der transgenen Kopienzahl liegen könnte (Robertson et al., 2002). In vielen Linien wurde eine starke Leckexpression beobachtet, auch in gewebspezifischen Anwendungen (Trembley et al., 1998). Ausgewählte Linien haben dagegen eine kaum detektierbare basale Expression und in einigen Geweben eine bis zu 100.000-fache Induzierbarkeit. Kinetische Studien zeigten eine Induzierbarkeit des Zielgens durch Dox innerhalb von Stunden bei rtTA-Transgenen und Tagen bei tTA-Transgenen. Die feine Regulation des Transgens, besonders das postnatale Anschalten, wurde in vielen unterschiedlichen Anwendungen erfolgreich gezeigt. Einige Beispiele sind: Endothelin Rezeptor Typ B (Shin et al., 1999), epidermale Expression von TGF β (Liu et al., 2001) und verschiedene Onkogene (Ewald et al., 1996; Xiu et al., 1999; Felsher und Bishop, 1999; Huettner et al., 2000). Auch für das Nervensystem gibt es eine Reihe von charakterisierten neuronalen Promotoren, die für eine zellspezifische Expression des Aktivators und somit auch des Zielgens verwendet werden können: Prion-tTA (verschiedene Prionproteinmutanten), CamKII α -tTA und -rtTA (lacZ, CamKII α -Mutanten und Huntigtin), NSE-tTA (Luciferase, FosB und CREB), um einige zu nennen (Trembley et al., 1998; Mayford et al., 1996; Mansuy et al., 1998; Yamamoto et al., 2000; Chen et al., 1998, 2003; Nestler et al., 1999; Kelz et al., 2000).

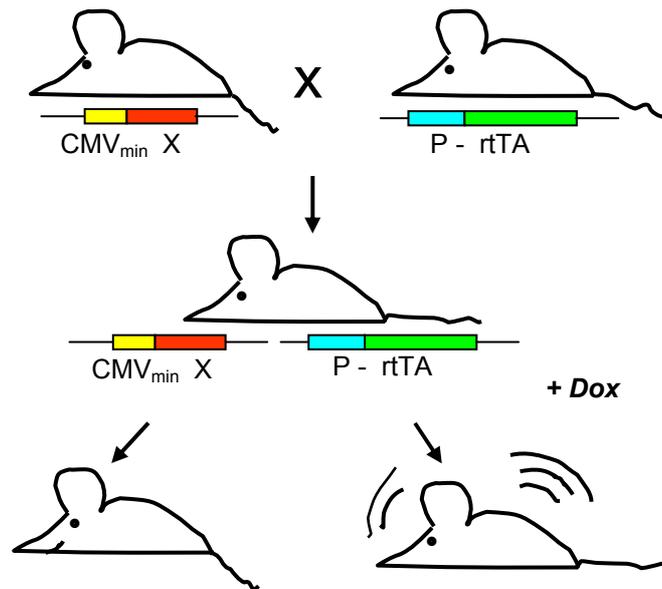


Abb. 1.2: Kreuzungsschema der Aktivator-Mäuse (enthalten Transaktivator-Konstrukt = rtTA) und Target-Mäuse (enthalten Ziel-Promotor mit Gen X).

Die Induktion des Aktivators und Expression des Zielgens erfolgt durch Applikation von Doxizylin.

1.4.1.4 Tet-System und Toxingensexpression

Der zeitlich und räumlich kontrollierte Zelltod durch Toxingensexpression ist nur möglich, wenn das Expressionssystem stringent ist und gewebspezifisch eingesetzt werden kann. Lee et al. (1998) exprimierte das Diphtheria Toxin A (DT-A) in Herzmuskelzellen, erreichte damit deren Absterben und induzierte so eine progressive Kardiomyopathie. Eine Lebendgeburtrate von 1,75 % (normal: 10-40 %) der transgenen Nachkommen macht deutlich, dass das Original-Tet-System für eine Toxingensexpression eine zu hohe Basalaktivität zeigt und noch nach Optimierungstrategien gesucht werden muss. Schon einzelne Moleküle des DT-A sind in der Lage die Proteinsynthese zu inhibieren und reichen für einen Zelltod aus (Yamaizumi et al., 1978). Außer der Reduzierung der Basalrate durch Veränderungen des Expressionssystems (rtTA-M2, Targetpromotor) wird nach alternativen Toxinen gesucht und bekannte so modifiziert, dass sie für den Organismus in kleineren Dosierungen tolerierbar sein könnten. In Zellkultur erwies sich das Original-Tet-System als ungeeignet das Toxin DT-A zu regulieren. Auch eine DT-A-Mutante mit einer verminderten Toxizität führte ohne Induktion zum Absterben der Zellen (Paulus et al., 1997; Keyvani et al., 1999).

Ein alternatives Toxingen könnte die bakterielle Barnase sein (Hartley, 1989). Die G-spezifische Endonuklease ist ein kleines Monomer mit einer Masse von 12382 Da und besteht aus 110 AS.

RNAsen der *Bacillus*-Spezies wirken durch ihre katalytischen Eigenschaften zytotoxisch auf eukaryotische Zellen (Ilinskaya et al., 1996), sie scheinen, wie auch fungale RNAsen und der „Onconase“ aus Oocyten des *Rana pipiens*, resistent gegen den eukaryotischen zytosolischen RNAse Inhibitor (RI) zu sein (Übersicht: Marakov et al., 2003). Die extrazellulär sekretierte RNAse des *Bacillus amyloliquefaciens* wurde schon als potentes Toxin zur Herbeiführung von Sterilität in transgenen Pflanzen verwendet (Mariani et al., 1991, Goldmann et al., 1994; Strittmatter et al., 1995). Der Inhibitor der Barnase, Barstar, bildet einen 1:1-Komplex mit der RNAse (Hartley, 1989), so dass bei gleichzeitiger Expression der Moleküle die toxische Wirkung aufgehoben und die Zelle so vor der Ribonuklease geschützt wird.

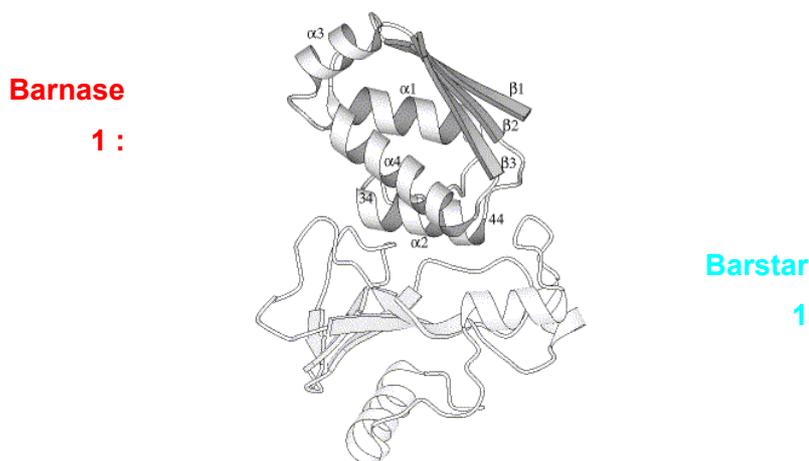


Abb. 1.3: Interaktionsmodell der bakterielle RNAse Barnase und ihres Inhibitors (aus: Hartley, 1989).

Die Barnase und das *Pseudomonas* Endotoxin A (PE) wurden als chimäres Konstrukt in eukaryotischen Zellen getestet. Durch die Domänen I (Zelladhäsion) und II (Translokation) des PE konnte die Barnase in die Zelle gelangen und wirkte zytotoxisch (Prior et al., 1991, 1992, 1996). Die konditionale Expression eines *barnase*-Konstruktes durch das Tet-Expressionssystem wurde in mehreren tierischen Zelllinien untersucht. Dabei wurde ein induziertes Absterben von Zellen erreicht (Leuchtenberger et al., 2001). Die Barnase wurde auch in Kombination mit ihrem Inhibitor Barstar innerhalb des Tet-Systems verwendet. Die gemeinsame Expression von *barnase* und *barstar* in der Zelle führte nicht zum Zelltod. In Kombination mit dem Tet-System konnte nach Induktion ein zytotoxischer Effekt erreicht werden, wobei es keine Angaben zur Basalrate gab (Bi et al., 2001).

1.5 Induzierter Zellstress und Zelltod

1.5.1 Stressreaktionen von Zellen

In Zellen, die durch negative Stimuli wie Toxine, Infektionen, UV-Strahlung oder Hitze gestresst und in ihrer Leistungsfähigkeit beeinträchtigt werden, tritt eine genetisch hochkonservierte so genannte „Hitzeschock-Reaktion“ oder allgemeiner „Stress-Reaktion“ (Übersicht: Welch 1993; Macario und de Macario 2000) ein. Die Stressreaktion wird hauptsächlich auf transkriptioneller Ebene durch Hitzeschock-Faktoren (HSF) reguliert. Diese liegen als Monomere und assoziiert mit Hsp70 (Hitzeschock-Protein, benannt nach Molekular-Gewicht) im Zytoplasma vor, welches konstitutiv exprimiert wird. In ungestressten Zellen wirken einige Hsp als Chaperone, die die Faltung neu synthetisierter Proteine vereinfachen und korrigieren. Vermehrte, durch zellulären Stress missgefaltete Proteine binden Hsp70, HSF-Monomere werden frei, bilden Trimere, gelangen in den Zellkern und binden an das HSE (heat-shock-element) des Hitzeschock-Promotors in der DNA, daher werden „Stress-Proteine“ vermehrt exprimiert. Nach Phosphorylierung ist die Bindung von Hsp an das Trimer möglich, und es kann so vom Promotor dissoziieren (Übersicht: Morimoto 1993). Die Hsp stabilisieren und korrigieren makromolekulare Strukturen, korrigieren Faltungen partiell denaturierter Proteine und markieren irreversibel geschädigte für die Degradation. Ubiquitin, welches zur Familie der kleinen Hsp gehört, markiert Proteine die durch das Proteasom abgebaut werden. Hsp70 markiert selektive zytosolische Proteine für den Abbau in Lysosomen (Übersicht: Knowlton 1997). Ist die Zelle durch den Stressor so stark geschädigt, dass sie die Folgen nicht korrigieren und beseitigen kann, wird der Zelltod eingeleitet.

1.5.2 Mechanismen des Zelltods: Programmierter Zelltod und Nekrose

Zellen können durch Nekrose oder programmierten Zelltod (PCD = „Programmed Cell Death“) sterben. Unter Nekrose wird im allgemeinen der durch äußere Einwirkung herbeigeführten „Zell-Mord“ (Stephan et al., 2000) verstanden. Die Auslöser können physikalischer oder chemischer Natur sein, wie z.B. Verbrennungen, Vergiftungen, Nährstoffmangel oder mechanische Beschädigung. Der nekrotische Zelltod ist durch bestimmte morphologische Veränderungen der Zelle charakterisiert. Durch Schädigung der Plasmamembran gelangt vermehrt Wasser in die Zelle, diese schwillt an und lysiert (Wyllie, 1986). Die Freisetzung zytosolischer Bestandteile verursacht eine entzündliche Reaktion im Gewebe (Savill, 1997).

Im Gegensatz dazu setzt bei dem PCD ein genetisch gesteuertes Programm den „Zell-Selbstmord“ in Gang, der in der Regel nur einzelne Zellen betrifft. Die unterschiedlichen Signalwege bis zum Zelltod sind durch verschiedene Morphologien gekennzeichnet, so dass unterschieden wird zwischen Type I (Kern-Kondensation prominent, Apoptose) und Type II (Autophagie)(Bursch et al., 2000). Der PCD tritt vor allem unter physiologischen Bedingungen im Organismus auf und ist essentiell in der Embryonalentwicklung und Morphogenese, Differenzierung, Gewebe-Homeostase und Verteidigung gegen Pathogene (Oppenheim 1997; Weller et al., 1997). Ein verringerter oder verstärkter PCD kann zu pathologischen Zuständen führen (Tumore, Anämien, neurodegenerative Erkrankungen). Morphologisch sind besonders die Apoptosestadien gut charakterisiert (Kerr et al., 1972). In der Anfangsphase schrumpft die Zelle, das Chromatin kondensiert und der Zellkern wird fragmentiert. Die Zellmembran bleibt unbeschädigt, so dass keine Entzündungsreaktion entsteht. Die Zelle zerfällt später in membranumschlossene Abschnürungen, die von Nachbarzellen oder Makrophagen phagozytiert werden (Wyllie 1986; Kiechle und Zhang, 2002). Biochemische Merkmale des apoptotischen Zelltods sind die Reduktion des mitochondrialen Transmembranpotentials, Ansäuerung des intrazellulären Milieus und die vermehrte Produktion von freien Radikalen. Weiterhin kommt es zu einer Translokation von Phosphatidylserin, das normalerweise Bestandteil der zytoplasmatischen Plasmamembran ist, auf die extrazelluläre Seite (van der Eijnde et al., 1997; van Engeland et al., 1998). Die DNA wird durch aktivierte Endonukleasen abgebaut und Proteine werden degradiert (Bredesen, 1995; Walker und Sirkorska, 1997).

Die andere Form des PCD, Typ II, ist gekennzeichnet durch frühe zytoplasmatische Veränderungen und Autophagie. Autophagische Lysosomen vermehren sich und degradieren Organellen und zelluläre Komponenten. Das Zytoplasma ist angefüllt mit Vakuolen, erst in späten Stadien ist eine Chromatinkondensation zu erkennen (Bursch et al. 2000, 2001). Physiologisch wird der autophagische Zelltod in epithelialen Zellen, im Gewebe der Brustdrüse, in der Entwicklung des Nervensystems und in Gewebe von Insekten und Amphibien während der Metamorphose beobachtet. Durch Untersuchungen von degenerativen Prozessen in Zellkultur und entsprechenden Mausmodellen, wurde festgestellt, dass Lysosomen/Vakuolen frühe Marker für neuronale Degeneration darstellen können (z.B. Huntington-, Alzheimer-Erkrankung) (Larsen und Sulzer, 2002; Kegel et al., 2000; Adamec et al., 2000). Es wird vermutet, dass besonders zytoplasmareiche und nicht proliferationsaktive Zellen durch autophagische Mechanismen absterben, wobei der Übergang zur Apoptose fließend sein kann. Autophagie wird auch als protektiver Mechanismus der Zelle angesehen in frühen Stadien den PCD zu verhindern (Larsen und Sulzer, 2002).

Obwohl Apoptose und Autophagie als unterschiedliche Formen des PCD betrachtet werden, gibt es viele Hinweise, dass beide nur eine Reihe von möglichen morphologischen und biochemischen Zuständen des Zelltods sind. Auch der Übergang zu nekrotischen Formen aus

energetischen Gründen wurde beobachtet. (Ameisen et al., 2002; Schwartz et al., 1993; Ankarcrona et al., 1995; Leist und Nicotera, 1997).

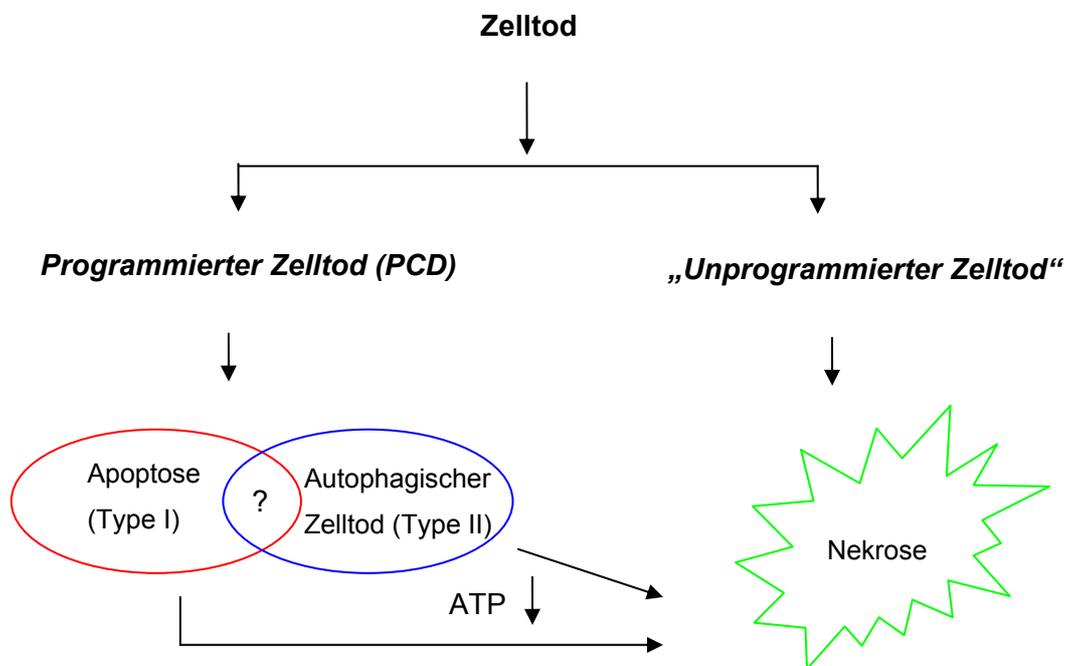


Abb. 1.4 : Morphologische und funktionale Klassifizierung von Zelltod.

1.5.3 Übersicht über die Molekularbiologie der Apoptose

Apoptose ist das Ergebnis einer Aktivierung und eines Zusammenspiels evolutiv hoch konservierter Moleküle. Es gibt zwei hauptsächlich involvierte Proteinfamilien, die Familie der Caspase-Proteasen und die Mitglieder der Bcl-2-Familie, die vom Nematoden *C.elegans* bis zu den Säugetieren pro- und antiapoptotische Funktionen ausüben (Steller, 1995).

Die zytosolischen Caspasen (= Cysteine Aspartate Specific Proteases) gehören zu der Familie der ICEs (Interleukin 1b-Converting Enzyme) und haben ein konserviertes QACXG-Pentapeptid im aktiven Zentrum. Sie werden konstitutiv als inaktive Pro-Enzyme exprimiert und durch Autokatalyse oder eigene Familienmitglieder gespalten und aktiviert. Durch ihre unterschiedlichen Funktionen innerhalb der Apoptose können die Caspasen in „Initiator“- und „Effektor“-Caspasen unterteilt werden.

Die Ersteren besitzen lange Pro-Domänen wie DED (Death Effector Domain; Caspase-8, -10) oder CARD (Caspase Recruitment Domain; Caspase-2, -9), welche die Verbindung zu den

meist membrangebundenen „Todes“-Rezeptoren darstellen. Die „Effektor“-Caspasen-3, -6, -7 haben kurze Pro-Domänen und bewirken die direkte Spaltung von Substraten, die für die charakteristischen morphologischen Veränderungen während der Apoptose verantwortlich sind, wie für die des DNA-Reparatur-Enzyms PARP (poly (ADP)-ribose polymerase), des Inhibitors der caspase-aktivierten DNase (ICAD), Gelsolin und Lamin A (Earnshaw et al., 1999).

Die Mitglieder der Bcl-2-Familie, die mindestens über eine von vier Bcl-2-Homologie-Domänen verfügen (BH1-4), haben sowohl anti- als auch pro-apoptotische Funktionen (Kelekar et al., 1998). Zu den pro-apoptotischen Mitgliedern gehören Bax und Bak, wobei Bax nach einem Todessignal vom Cytosol zur Mitochondrienmembran gelangt. Durch seine Fähigkeit Poren zu bilden, wird wahrscheinlich das Membranpotential verändert und der Ausstrom von Cytochrom C bewirkt, welches die Caspase-Kaskade aktiviert (Priault et al., 1999; Susin et al., 1999; Budihardjo et al., 1999). Anti-apoptotische Mitglieder, wie z.B. Bcl-2 und Bcl-xl können dagegen steuern. Bei vermehrter Expression inhibieren die an der mitochondrialen Membran lokalisierten Proteine die Porenbildung durch Bax. Die Menge und das Gleichgewicht der in der Zelle befindlichen pro- und anti-apoptotischen Proteine sind dafür verantwortlich, ob Apoptose eingeleitet wird oder nicht. Eine Deregulation der unterschiedlichen „Spieler“, besonders der „Effektor“-Moleküle, kann die Balance zwischen Proliferation und Zelltod zerstören.

Im Prinzip lassen sich zwei generelle Signaltransduktionswege beschreiben. Der erste und evolutiv primitivere wird u.a. durch Wachstumsfaktor-Entzug oder DNA-Schäden ausgelöst. Dabei wird das Austreten von mitochondrialem Cytochrom C erreicht. Dies führt zur Bildung eines Caspase-3 aktivierenden Komplexes, das so genannte Apoptosom, bestehend aus vier Komponenten: (d)ATP, CytochromC, Apaf1 und Caspase-9 (Cai et al., 1998; Adrain and Martin, 2001). Nach Spaltung von Pro-Caspase-3 wird durch deren enzymatische Aktivität der Zelltod eingeleitet. Auch hier kann vorher noch modulierend eingegriffen werden. Bcl-xl kann an Apaf1 binden und so die Bildung des Apoptosomes verhindern oder verzögern. Der zweite Weg zur Caspase-Aktivierung ist die direkte Stimulation von „Todes“-Rezeptoren durch Ligandenbindung. Diese Form der Aktivierung ist im adulten Organismus besonders für das Immunsystem wichtig. Die „Todes“-Rezeptoren, bestehend aus einer cysteinreichen extrazellulären Domäne und einer homologen zytoplasmatischen „Todes“-Domäne (DD = Death Domain), gehören zu der Tumor-Nekrose-Faktor (TNF)-Rezeptorgen-Superfamilie. Die am besten charakterisierten Rezeptoren sind der Fas-, der TNF- und die „Todes-Rezeptoren“ 3, 4 und 5 und ihre Liganden, der Fas-Ligand, TNF und Lymphotoxin, der Apo3-Ligand und Apo4-Ligand. Es gibt mehrere Synonyme für deren Bezeichnung. Nach Bindung des jeweiligen Liganden erfolgt eine Zusammenlagerung der zytoplasmatischen DDs, eine Rekrutierung von Adapterproteinen und letztlich eine Bindung und Autokatalyse von Caspase-8. Caspase-8 aktiviert „Effektor“-Caspasen und spaltet das pro-apoptotische Molekül Bid, das bei der Kontrolle des mitochondrialen Cytochrom C-Ausstroms eine wichtige Rolle spielt.

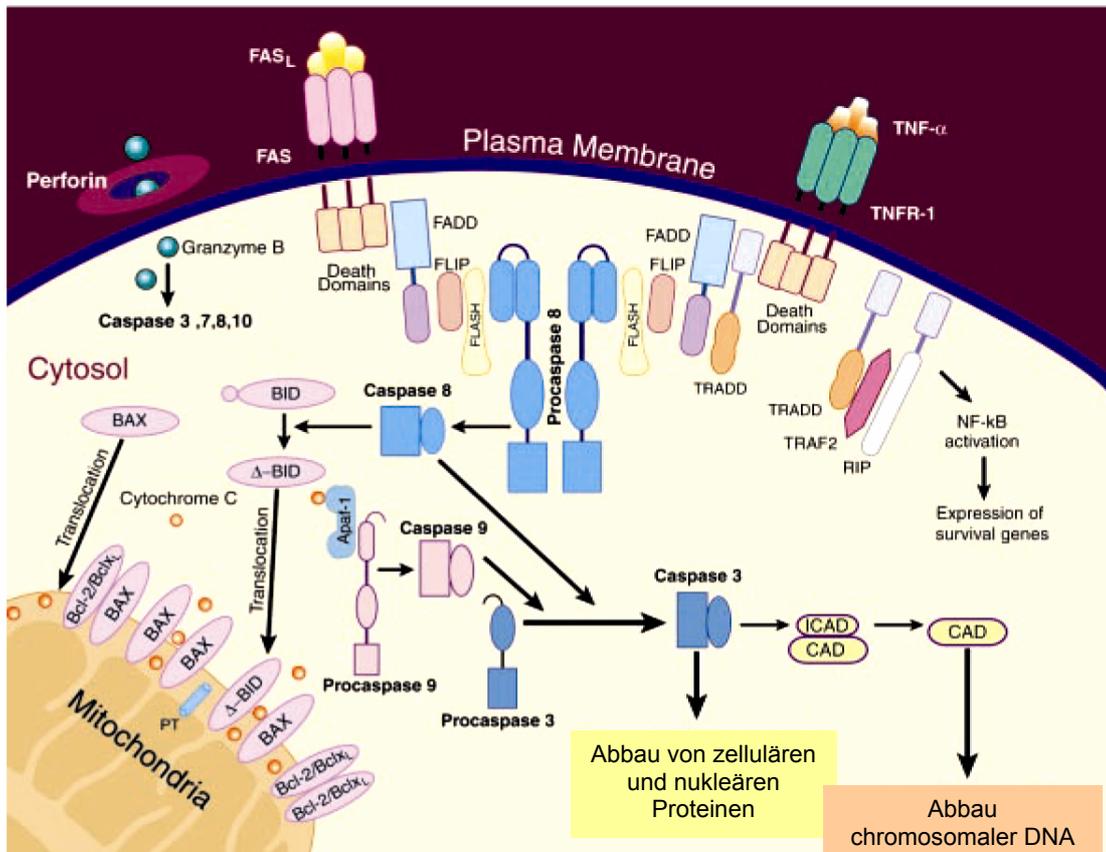


Abb. 1.5: Signaltransduktion der Apoptose.

Schematische Darstellung der Interaktionen pro- und antiapoptotischer Mechanismen.

1.5.4 Pathologische Zustände der Zelle und programmierter Zelltod

Der PCD wird durch eine Reihe von externen Signalen ausgelöst, wie UV- und Röntgenstrahlung und daraus resultierende DNA-Schädigung, aber auch durch Wachstumsfaktorenentzug, Hormone, viraler Befall und zytotoxische Drogen. So werden Zellen die sich in pathologischen Zuständen befinden eliminiert und aus dem Zellverband entfernt. Ist dieser Schutzmechanismus der Apoptose durch genetische Ursachen oder z.B. viralen Befall gestört, wird das Verhältnis zwischen Zellelimination und Proliferation verändert. Einige menschliche Tumore werden durch Virusinfektionen ausgelöst. Diese Viren haben Strategien entwickelt, die den Tod der Wirtszelle durch PCD verhindern (z.B. Inaktivierung des p53-Promotors; Synthese Bcl-2-ähnlicher Proteine). Andere Tumore können nicht nur durch verstärkte Proliferation, sondern auch durch eine verringerte Zelleliminationsrate entstehen (vermehrte Produktion von Bcl-2 transformierter Zellen). Umgekehrt kann auch vorzeitige oder verstärkte Apoptose zu Erkrankungen des Organismus führen. Hierzu gehören beispielsweise

Anämien, Herzinfarkte und neurodegenerative Erkrankungen. Die Ursachen sind oft ungeklärt, aber gerade bei degenerativen Erkrankungen des Nervensystems wird eine genetische Prädisposition angenommen. Hier gibt es viele Hinweise für eine Akkumulation von Proteinaggregaten in den postmitotischen Neuronen, so dass von einer genetischen Veränderung der Aminosäuresequenz dieser Proteine, deren Proteolyse-Systeme oder indirekt des Ubiquitin-Proteasom-Systems ausgegangen wird; Beispiele sind Presenilin 1 und 2 bei früher Alzheimer-Erkrankung, Huntingtin und Ataxin bei der Huntington-Erkrankung, Spinocerebellare Ataxie und frühe Form der Parkinson'schen Erkrankung (Kim et al., 1997; van Leeuwen et al., 1998; Davies et al., 1997; Cummings et al., 1998; Shimura et al., 2000). Diskutiert werden auch Defekte in Ebenen der zellulären Stress-Antwort. Das HSP/Ubiquitin-Proteasom-System ist in viele Regulationen zellulärer Prozesse, wie z. B. Zellzyklus, Mitose, aber auch Stress und Apoptose, involviert. Die zu degradierenden Proteine werden durch kovalentes Anhängen eines Ubiquitin-Moleküls markiert und deren Abbau erfolgt normalerweise durch das 26S-Proteasom oder in einigen Fällen durch Lysosomen (Übersicht: Ciechanover, 1998). Ist die Zelle „vermüllt“, also voller ubiquitinerter aber trotzdem nicht degradierter Proteine, können die normalen Funktionen nicht mehr hinreichend ausgeführt werden, so dass sie eliminiert wird. In degenerierenden Neuronen unterschiedlichster neuronaler Erkrankungen sind häufig Ubiquitinhäufungen und vermehrt Lysosomen nachweisbar (Übersicht: Nixon und Cataldo, 1993; Mayer et al., 1996; Adamec et al., 2000).

1.6 Zelltypen im ZNS und ihre Rolle bei neurodegenerativen Erkrankungen

Die zellulären Bestandteile des ZNS sind im wesentlichen Neurone und Glia-Zellen, Astrozyten, Oligodendrozyten und Mikroglia. Neurone sind hochspezialisierte, weitgehend postmitotische Zellen, die eine energetische Abhängigkeit von Astrozyten zeigen. Diese stehen in engem Kontakt sowohl zu Neuronen als auch zu Blutgefäßen. Astrozyten sind am Stoffwechsel der Neurone beteiligt, vor allem hinsichtlich der Regulation des Ionen- und Metaboliten-„Haushaltes“ (Übersicht: Kirchhoff et al., 2001). Weiterhin beeinflussen sie das Ionenmilieu am synaptischen Spalt und nehmen dort Neurotransmitter, wie GABA (Gamma-Amino-Buttersäure) und Glutamat durch spezielle Transportproteine auf (Minelli et al., 1995, Rothstein et al., 1996). Astrozyten sind auch an der Funktionalität der Blut-Hirn-Schranke durch den Kontakt zu Endothelzellen beteiligt, die durch Tight-Junctions, besonders enge Zell-Zell-Verbindungen, ansonsten kapillargängige Substanzen zurückhält (Janzer und Raff, 1987). Auch Oligodendrozyten stehen in metabolischem Kontakt zu Neuronen. Ihre die Neuronen

umgebenden Markscheiden ermöglichen die saltatorische Erregungsleitung und reduzieren den Gesamtionenfluss im ZNS. Mikroglia sind Zellen des mononukleären, phagozytotischen Systems im ZNS. Diese Zellen mesodermaler Abstammung werden bei pathologischen Veränderungen aktiviert (Fedoroff et al., 1991). Sie übernehmen mit ihren phagozytotischen und pathogen-degradierenden Eigenschaften die Aufgaben des Immunsystems im ZNS (Übersicht: Zielasek und Hartung, 1996). Die hohe Spezialisierung der einzelnen Zelltypen bedingt eine starke Abhängigkeit voneinander, so dass Neurodegeneration eine Reaktion der Glia-Zellen, aber eine Degeneration von Glia-Zellen auch eine Reaktion der neuronalen Zellen bewirkt (Bush et al., 1999).

Neurodegenerative Erkrankungen zeigen ein komplexes Zusammenspiel zwischen Umweltfaktoren und genetischer Prädisposition. Oxidativer Stress, Umweltgifte, programmierter Zelltod, Protein-Aggregation und -Degradation werden als Ursache diskutiert. Dabei ist die molekulare Basis der selektiven Degeneration einzelner Neuronengruppen im ZNS noch weitgehend unverstanden. In einigen Fällen, so bei den frühen Formen der Alzheimer-Erkrankung oder familiär früh auftretender Parkinson'scher Erkrankung, sind genetische Faktoren nachweislich die Auslöser (Haltia et al., 1994; Kitada et al., 1998; Shimura et al., 2000). Die größte Zahl der Erkrankungen ist allerdings sporadischer Natur. Die klinische Präsentation tritt meist erst nach großen Zellverlusten und schon jahrelangen pathologischen Vorgängen im ZNS auf, so dass Wechselwirkungen mit Astrozyten und Mikroglia schon lange auf das pathologische Geschehen einwirken. Die Vitalität einzelner Neurone ist zusätzlich abhängig von erregenden und/oder inhibitorischen Stimuli anderer Neurone. Das Gehirn bildet ein Netzwerk von Neuronen, die aufgrund ihrer Eigenschaften voneinander abhängig sind. Führen degenerative Prozesse zu dem Verlust einzelner Populationen, kann das Auswirkungen auf entfernt liegende Neuronen-Verbände haben, deren Gleichgewicht in erregenden und inhibitorischen Eingängen gestört wird. Neuronenverluste führen, je nach Regionalität und Kompensationsmöglichkeit, früher oder später zu Funktionsverlusten des Gehirns. Gliareaktionen gibt es in nahezu allen neuronalen Erkrankungen. Astrozyten werden aktiviert (Kettenmann and Ransom, 1995), wobei sich ihr molekulares Profil verändert, es werden z.B. vermehrt Zelladhäsionsmoleküle exprimiert und Proteasen, Proteaseinhibitoren, Proteine der extrazellulären Matrix und Cytokine sezerniert (Fedoroff et al., 1986; Eddleston and Mucke, 1993). Dieser als Astrogliose bezeichneter Prozess ist immunhistologisch durch eine erhöhte Expression des spezifischen Intermediärfilamentes GFAP (Glial Fibrillary Acidic Protein) nachzuweisen, mit der auch morphologische Veränderungen einhergehen (Bignami et al., 1972; Eddleston und Mucke, 1993; Ridet et al., 1997). Nach Zellverlusten bilden die proliferationsfähigen Astrozyten so genannte Glia-Narben, die hemmend auf das Auswachsen neuer Neuriten wirken (Liuzzi and Lasek, 1987; Rudge und Silver, 1990). Durch Narbenbildung, durch Sezernierung verschiedener zytotoxischer Signalstoffe (z.B. Tumor-Nekrose-Faktor α)

und erregender Monoamine und durch ihr oxidatives Potenzial wird den Astrozyten nicht ausschließlich eine protektive Rolle, sondern in vielen Fällen eine Verstärkung dystropher Effekte zugesprochen (Schipper, 1996). Mikroglia werden durch fast alle neurodegenerativen Prozesse aktiviert (Kettenmann und Ilscher, 1993). Sie ist Teil eines inflammatorischen Prozesses, der lokal nach Zellverletzungen auftreten kann. Aktivierte Mikroglia verändert sich antigenisch und morphologisch, sie geht von ruhenden in differenzierte, hypertrophierte Zellen über. In späteren Stadien nehmen die Zellen eine rundliche, amöboide Form ein und besitzen makrophagische Eigenschaften. Einmal aktiviert können sie durch ihre Produktion von reaktiven Stickstoff- und Sauerstoff-Intermediaten (RNI, ROS) auch zytotoxisch auf Neurone und Oligodendrozyten wirken (Übersicht: Owen et al., 2001; Wiesinger 2001). Im pathologischen Prozess der Parkinson'schen Erkrankung wird beispielsweise eine verstärkte neuronale Schädigung durch Inflammation vermutet (Czlonkowska et al., 2002). In den meisten Fällen geht man bei Astrogliose und Mikroglia-Aktivierung von Sekundärreaktionen auf vorherige Neurodegeneration aus. Unbestritten sind aber neuronale Reaktionen auf das biochemisch veränderte Milieu und auf molekulare Veränderungen der Glia selbst, die den neuronalen Verlust verstärken und Regeneration behindern können (Bush et al., 1999).

Durch zeitlich und örtlich kontrollierte Induktion von Zellverlusten im ZNS könnten Wechselwirkungen und Zusammenhänge der Neuronen-Glia-Population näher untersucht und neuroprotektive Ansätze getestet werden.

1.7 Zielsetzung

Die Ziele meiner Dissertation sind einerseits die Charakterisierung von biochemischen Reaktionen repräsentanter Zellen auf die Expression von *barnase* durch das Tetrazyklin-abhängige Expressionssystem.

Andererseits soll untersucht werden, ob die konditionale *barnase*-Expression auch im transgenen Tiermodell möglich ist, um selektiv Zellen zu deletieren. Allgemein soll evaluiert werden, ob das Tet-abhängige Expressionssystem zusammen mit dem Toxin Barnase eine neue Strategie der kontrollierten Toxingenexpression, besonders für zellspezifische Anwendungen im zentralen Nervensystem der Maus, darstellen kann.

Daraus resultieren die folgenden Arbeitsschritte:

- I. Regulierte *barnase*-Expression durch ein modifiziertes Tetrazyklin-abhängiges Expressionssystem wurde in Zellkultur analysiert (Leuchtenberger et al., 2001).
- II. Untersuchungen zum Barnase-induzierten Zelltod in einer stabilen Zelllinie:
Die (Stress-) Reaktionen der induzierten Aktivator/*barnase*-stabilen Zellen sollen dargestellt und deren Zelltod analysiert werden.
- III. Anwendung der Tet-abhängigen konditionalen Barnase-Expression *in-situ*:
Herstellung *barnase*-transgener Mäuse und Einkreuzung in Aktivator-Linien.
Analyse der Aktivator/*barnase*-transgenen Mäuse:
 - a) Analyse der *barnase*-Expression und der Auswirkung der Toxingenexpression in induzierten Primärzellen *CMV-rtTA/bar*-transgener Mäuse.
 - b) Untersuchung der Induktionseffizienz der bakteriellen RNase durch einen viral und einen astrozytenspezifisch kontrollierten Aktivator in verschiedenen Geweben.
 - c) Histologische Analyse des ZNS von induzierten *CMV-rtTA/barnase*- und *GFAP-rtTA/barnase*-transgenen Mäusen.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien, Chemikalien, Agenzien

Chemikalien und molekularbiologische Agenzien werden hauptsächlich von den Firmen Applichem, SIGMA (Dreieich) und Merck (Darmstadt) bezogen, Zellkulturmaterial von Invitrogen (Groningen, NL), Gibco oder Seromed Biochrom AG (Berlin), Plastikware von Greiner Labortechnik GmbH (Solingen), Eppendorf (Hamburg) oder Nunc (Wiesbaden). Soweit nicht im Folgenden aufgeführt, sind verwendete Materialien an entsprechenden Stellen angegeben.

2.2 Zellbiologie

2.2.1 Zelllinien

Folgende Zelllinien wurden im Rahmen der durchgeführten Arbeiten verwendet:

- *CHOAA8 ("tet-off")*,
CHO-Zelllinie (Chinese Hamster Ovary), exprimiert unter der Kontrolle eines CMV-Promotors konstitutiv den Transaktivator tTA des Tet-abhängigen Expressionssystems (pUHD15-1neo, Yin et al., 1996); bezogen von Clontech.
- *CHOAA8_bar_pac = Klon D7*,
CHOAA8-Zelllinie, stabil transfiziert für: TF-*barnase*/Puromycin-Resistenz-Gen.
- *Neuro2A*,
Neuroblastoma Zelllinie (ATCC CCL 153, American Type Collection of Cell Culture), freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. C. Spilker, Institut für Neurobiologie, Universität Magdeburg.
- *Neuro2A_NSE_tTA/bar*,
stabil transfizierte Neuro2A-Zelllinie für: NSE-tTA und TF- *barnase*/ Puromycin-Resistengen.
- *Hela (ATCC CCL 2)*.

2.2.2 Kulturmedien

- *Neuro2A*

DMEM +10 % FCS, 7,5 % CO₂, 37 °C

13,38 g DMEM (Invitrogen, Groningen, Niederlande)

3,0 g/l NaHCO₃ (Invitrogen)

1 % nichtessentielle Aminosäuren (100 x Biochrom AG Seromed, Berlin)

1 % stabiles Glutamin (200 mM N-Acetyl-L-alanyl-L-glutamin, Biochrom AG Seromed)

10 % FCS (Biochrom AG Seromed)

- *CHOAA8*

α-MEM + 10 % FCS, 7,5 % CO₂, 37 °C

10,08 g/L α -MEM

2,2 g/L NaHCO₃

10 ml/L Vitaminlösung (100 x)

10 % FCS (Biochrom AG Seromed)

sonst wie DMEM

- *Fibroblasten-Primärkulturen*

RPMI + 10 % FCS, 5 % CO₂, 37 °C

- für Induktionsanalysen transgener Primärzellen:
Tet-approved FCS, Clontech

2.2.3 Antibiotika/Medienzusätze

- Penicillin G (Biochrom AG Seromed)
- Streptomycin Sulfat (Sigma)
- G418 Sulfat (PAA, Linz, Österreich)
- Fungizone (Gibco)
- Doxizylin (Sigma)
- Staurosporin (Sigma)

2.2.4 Oligonucleotide

Zur Detektion der cDNA des Zielgens im RT-Ansatz mittels PCR wurden spezifische Primer gelegt. Die cDNA-Sequenzen der Zielgene wurden in einer Internet-Datenbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Nucleotide>) recherchiert und in ein Internet-Programm zur Konstruktion von Primern (<http://www-genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3>) eingefügt. Alle Oligonucleotide wurden bei der Firma *MWG, Ebersberg* bestellt. Die Lyophilisate wurden zu einer Konzentration von 50 pg/µl gelöst und in 20 µl Portionen aliquotiert bei -20 °C gelagert.

Bezeichnung	Sequenz 5' -----3'	Tm [°C]	Zyklen	PCR- Produkt	Acc.-No.
<i>Bar_s</i> <i>Bar_as</i>	AAG GGA ACC TGG CAG ACG TC AGG TCT GAT AAT GGT CCG T	60	35	210 bp	Sequenz s. Anhang
<i>bar_LC_s</i> <i>bar_LC_as</i>	CCG GTC TGA ATT TCT GAA GC AAT CAG AAG CAC AAG CCC TC	60	35	182 bp	Sequenz s. Anhang
<i>TFs</i> <i>TFas</i>	TGG AGA AGA TCC CAA ACG GTA C TCG CTT GAG TAA AGA ATC CGG TC	61	35	290 bp	M_19736
<i>Tet_s</i> <i>Tet_as</i>	GAT GTC CTT TAC TAA GTC ATC GCG A CTT GTC GTA ATA ATG GCG GCA TAC	63	30	260 bp	U_89929
<i>mL7_s</i> <i>mL7_as</i>	AGA TGT ACC GCA CTG AGA TTC ACT TAC CAA GAG ACC GAG CAA	60	25	352 bp	NM_011291
<i>hL7_LC_s</i> <i>hL7_LC_as</i>	ACG CTT TGA TTG CTC GAT CT GAA GAC AAT TTG AAG GGC CA	60	25	180 bp	NM_000971
<i>hHsc70_s</i> <i>hHsc70_as</i>	GAT GTC ACT CCT CTT TCC CTT G CAT TGA GGA TAC CAT TGG CAT C	60	30	276 bp	NM_006597
<i>hUbi_s</i> <i>hUbi_as</i>	GAC ATT GAC TGG GAA GAC C CTC TTT CTG GAT ATT GTA GTC	58	25	177 bp	M_26880

Tab 2.1: Verwendete Oligonucleotidprimer für RT und Lightcycler.

2.2.5 Antikörper

Verwendeter Antikörper	Charakterisierung	Western Blot	Immunfluoreszenz
anti-Hsp70 (Maus)	Monoklonal gegen Hsp70 aus Rinderhirn (Höning et al., 1994)	-	1 : 500
anti-Ubiquitin (Kaninchen)	Polyklonale gegen Ubiquitin und Konjugate aus Rindererythrozyten (Sigma, U5379)	1 : 100	1 : 50
anti-G-Aktin (Maus)	Monoklonal gegen G-Aktin (Gonsior et al., 1999)	1 : 2000	-
anti-caspase3 (Kaninchen) <i>gespaltene Form</i>	Monoklonal gegen aktivierte Caspase-3 (Cell signaling Technology; Vertrieb: New England Biolab)	1 : 1000	1 : 100
anti-CD45 (Ratte)	Monoclonal gegen LCA, LY1 Oberflächenantigene von Leukozyten und Mikroglia (Pharmingen)	-	1 : 100
anti-GFAP-Cy3 (Maus)	Monoklonal gegen das Glia Fibrillary Acidic Protein; Cy3 konjugiert (Sigma)	-	1 : 800
anti-Glattmuskelaktin-Cy3 (Maus)	Monoklonal gegen Glattmuskel γ -Actin, Cy3 konjugiert (Sigma, C 6198)	-	1 : 100

Tab. 2.2: Verwendete Primär-Antikörper.

Zum **Nachweis in der Immunfluoreszenz** wurden Rhodamin-Farbstoff *Cy3-gekoppelte* polyklonale Antikörper eingesetzt:

- Goat-a-Rabbit IgG (dianova, Hamburg)
- Goat-a-Mouse IgG (dianova, Hamburg)
- Goat-a-Rat IgG (dianova, Hamburg)

Der **Nachweis im Immunblot** erfolgte über Chemilumineszenz.

Verwendeter Antikörper	Charakterisierung	Verdünnung
Goat-anti-Mouse IgG	anti-Maus IgG + IgM (H + L), HRP-gekoppelt (Jackson Immuno Research, West Grove, PA; Vertrieb: Dianova)	1 : 4000
Goat-anti-Rabbit IgG	anti-rabbit IgG (whole molecule), HRP-gekoppelt (SIGMA)	1 : 4000

Tab. 2.3: *Verwendete Sekundär-Antikörper für den Immunblot.*

2.2.6 Plasmide

- pSBC/TF_{wt} Barnase

Target-Promotor aus einem pflanzlichen viralen Promotor (35S-Promotor des Cauliflower-Mosaik-Virus) mit sechs tetO-Elementen und unterschiedlichen Spacer-Regionen (TopFree-Promotor = TF) und dem 450 bp Barnase-Fragment in einem Expressionsvektor (Leuchtenberger et al., 2001).

Die TF-Promotor- und Barnase-Sequenz wurde freundlicherweise von Frau Prof. Gatz, Institut für Pflanzenphysiologie, Georg-August-Universität Göttingen, zur Verfügung gestellt (s. Anhang).

- NSE/tTA

Tetrazyklin-abhängiger Aktivator unter der Kontrolle des 1,8 kb NSE (Neuron-Specific-Enolase)-Promotors (Leuchtenberger et al. 2001).

2.3 Zellkulturmethoden

2.3.1 Steriles Arbeiten

Glasflaschen und Phosphatpuffer wurden vor Gebrauch autoklaviert. Gestopfte Pipetten wurden im Sterilisator für 4 h bei 160°C hitzesterilisiert. Zellkulturschalen, Kryoröhrchen (Fa. Nunc) und andere Plastikware (Greiner), sowie Pipettenspitzen wurden als sterile Einmalplastikware verwendet. Alle Medienzusätze (FCS, HT-Supplement, nichtessentielle Aminosäuren, Glutamin), außerdem Trypsin-EDTA, wurden als sterile Flüssigprodukte vom Hersteller bezogen. Die fertigen Zellkulturmedien (in Ionen- und Endotoxinfreien Milli-Q-Wasser, Millipore-Anlage, angesetzt) wurden vor Gebrauch durch Druckfiltration sterilisiert. Alle Zellkulturarbeiten wurden in einer Klasse II-Reinraumwerkstatt (SterilGuard, Fa. Baker, USA) durchgeführt.

2.3.2 Ablösen adhärenter Zellen

Um adhärenente Zellen in neue Kulturgefäße zu überführen, die Zelldichte zu bestimmen, sowie die Zelldichte in den Kulturgefäßen zu verringern, werden diese in Suspension gebracht. Das jeweilige Medium wurde abgesaugt und die Zellen einmal mit PBS gewaschen. Neuro2A-Zellen wurden für 2 min bei 37 °C mit einer 1:1-Verdünnung von Trypsin/EDTA (PAA, Linz, Österreich) in PBS inkubiert und anschließend im entsprechenden Kulturmedium resuspendiert. CHOAA8-Zellen wurden mit unverdünntem Trypsin/EDTA (PAA) 5 min bei 37 °C inkubiert. Nach erfolgter Trypsinierung wurden die Zellen in dem jeweiligen Kulturmedium resuspendiert.

- 10 x CMF-PBS

136 mM NaCl

3 mM KCl

8 mM Na₂HPO₄·2H₂O

1,5 mM KH₂PO₄

2.3.3 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Um Zellen in flüssigem Stickstoff eingefroren zu lagern, wurden sie zunächst resuspendiert und abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde auf Eis in Cell Culture Freezing Medium (Invitrogen, Groningen, Niederlande) oder Kulturmedium + 10 % DMSO resuspendiert, so dass eine Zelldichte von ca. 1x10⁶ Zellen/ml erreicht wurde, und dann je 1 ml in vorgekühlte Kryoröhrchen

abgefüllt. Die Kryoröhrchen wurden in einer Einfrierhilfe zunächst bei -20°C gelagert und nach 24 h in den Stickstofftank überführt. Zum Auftauen von in flüssigem Stickstoff gelagerten Zellen wurden je Kryoröhrchen 10 ml des entsprechenden Kulturmediums in einem 15 ml Plastikröhrchen auf 37°C vorgewärmt. Die Zellen wurden im 37°C -Bad aufgetaut, zum Medium gegeben, mit diesem vermischt und bei 500 g abzentrifugiert. Anschließend wurde das Zellpellet in frischem vorgewärmtem Kulturmedium resuspendiert und die Zellen in einer Kulturflasche ausgesät.

2.3.4 Transfektion von Plasmid DNA in kultivierten Zellen

Die zu transfizierenden Zellen wurden auf 30 mm Kulturschalen ausgesät und dabei optimalerweise eine Zelldichte eingestellt, die zur Durchführung der Transfektion eine 60-80 %ige Konfluenz der Zellen gewährleistete. Zur Transfektion wurde das Lipofectamine-Transfektionsreagenz eingesetzt und nach der Anleitung des Herstellers verfahren. Transient transfizierte Zellen wurden 48 h nach der Transfektion durch das entsprechende Verfahren auf das Vorhandensein von Ziel-mRNA bzw. Zielprotein analysiert. Durch Aufnahme einer Resistenzkurve wurde die erforderliche Konzentration bestimmt, um stabile Klone zu selektieren, die durch Transfektion mit einer Resistenzkassette ausgestattet waren. 72 h nach der Transfektion wurden die Zellen in Selektionsmedium überführt. Dieses wurde regelmäßig gewechselt. Nachdem einzelne Kolonien von Zellen übriggeblieben waren, wurden diese gepickt und in die Vertiefungen einer Mikrotiterplatte überführt. Sobald eine Vertiefung dicht bewachsen war, wurden die Zellen in größere Kulturschalen überführt. Schließlich wurde jeder Klon auf drei 60 mm Schalen verteilt, von zwei wurden Einfrierkulturen angelegt und die die Zellen der dritten zum Nachweis der Fremd-DNA-Integration lysiert.

2.3.5 Immunfluoreszenz

Zur Detektion zellulärer oder membranständiger Proteine eignet sich das Verfahren der Immunfluoreszenz, sofern ein für das Zielprotein spezifischer Antikörper zur Verfügung steht. Die Zellen wurden auf Objektträgern ausgesät und nach Erreichen der gewünschten Zelldichte fixiert. Zur Detektion intrazellulärer Proteine oder zytoplasmatischer Domänen von Membranproteinen war zusätzlich eine Permeabilisierung der Zellmembran erforderlich.

Je drei kollagenisierte Deckgläser wurden in einer 30 mm Kulturschale vorgelegt. Die Zellzahl wurde je nach Inkubationszeitraum gewählt. Vor der Immunfluoreszenzfärbung wurde das Medium abgesaugt und die Zellen 2 x mit CMF-PBS gewaschen.

<i>Fixieren:</i>	4 % Paraformaldehyd in CMF-PBS, 10 min, RT
<i>Permeabilisieren:</i>	0,2 % Triton x 100; 5 min, RT
<i>(Fixieren und Permeabilisieren: -20 °C kaltes Methanol, 4 min)</i>	
<i>Blocken:</i>	2 % BSA in PBS, 30 min bis 2 h , RT
<i>1. Antikörper:</i>	Deckgläser vereinzelt in Feuchtkammer legen, je Deckglas 50 µl des Antikörpers in 0,5 % BSA in PBS, 1-2 h, RT
<i>Waschen:</i>	3 x mit PBS, 5 min, RT
<i>Blocken:</i>	2 % BSA in PBS, 30 min, RT
<i>2. Antikörper:</i>	je Deckglas 50 µl der entsprechenden Verdünnung des fluoreszenz-markierten Antikörpers in 0,5 % BSA in PBS, 45 min, RT
<i>Waschen:</i>	3 x mit PBS, 5 min, RT
<i>Eindecken:</i>	Elvanol

Die Fluoreszenz der Zellen wurde unter Verwendung eines Fluoreszenzmikroskops (Axiophot, Zeiss) oder eines konfokalen Laser-Scanning Mikroskops (TCS SP2, Leica) detektiert.

- Elvanol

10 g Mowiol 4-88 wurden unter Rühren in 40 ml 50 mM Tris-Base gelöst (24 h, RT). Nach Hinzufügen von 20 ml Glycerol, wurde die Lösung erneut 24 h vermischt (4 °C) und anschließend 1 h bei 15000 rpm zentrifugiert. Das Eindeckmittel wurde bei 4 °C gelagert.

2.3.6 Zellvitalität

1) Die Messung des Verhältnisses von toten zu lebenden Zellen kann durch eine Färbung mit **Neutralrot** erfolgen. Dieser Farbstoff wird von lebenden Zellen durch aktiven Transport aufgenommen, tote Zellen bleiben ungefärbt. Dazu wurden je Vertiefung 100 µl Kulturmedium mit 10 µl einer steril filtrierte 0,33 %igen Neutralrot-Lösung in PBS gemischt. Das Medium wurde abgesaugt, 100 µl je Vertiefung von dem farbstoffhaltigen Medium zugegeben und für 2 h in den Inkubator gestellt. Die Farbstoffaufnahme wurde unter dem Mikroskop überprüft und die Zellen zweimal mit PBS gewaschen. Der inkorporierte Farbstoff wurde durch Zugabe von 1 % Essigsäure in 50 % Ethanol gelöst. Nach 10 minütiger Inkubation bei RT konnte die zur Anzahl

lebender Zellen proportionale Extinktion ($\lambda = 540 \text{ nm}$) im ELISA-Reader (Tecan, Crailsheim) gemessen werden.

2) Trypanblau markiert –umgekehrt- tote Zellen. Diese Färbung beruht auf dem Prinzip, dass lebende Zellen große Farbstoffe nicht aufnehmen, die bei toten Zellen durch zerstörte Membran-„Architektur“ unselektiv eindringen können. Die zu zählenden Zellen wurden abtrypsinisiert und in PBS resuspendiert. 0,5 ml 0,4 % Trypanblau-Lösung wurde zu 0,3 ml PBS und 0,2 ml Zellsuspension gegeben (Verdünnung 1:5). Nach 5-15 min wurden die totale Zellzahl, sowie die Zellzahl der nicht angefärbten Zellen ermittelt.

$$\text{Zellvitalität (\%)} = \frac{\text{nicht markierte Zellen}}{\text{totale Zellzahl}} \times 100$$

2.4 Molekularbiologie

2.4.1 Plasmidisolierung aus Bakterien

Zur Gewinnung großer Mengen Plasmide, die für Transfektionen eingesetzt werden, wird eine alkalische Lyse und Ionenaustauscherchromatographie mit dem Quiagen-Midi-Präp-Kit (Quiagen-tip 100, Hilden) durchgeführt. Nach der alkalischen Lyse erfolgt die Bindung der Plasmid-DNA an eine Anionenaustauschersäule. RNA, Proteine und niedermolekulare Verbindungen werden durch Waschlösungen mittlerer Salzkonzentrationen entfernt. Für eine Plasmidisolierung wurde eine Einzelkolonie in 30 ml LB-Medium mit 60 $\mu\text{g/ml}$ Ampicillin über Nacht bis zum Erreichen der Stationärphase bei 37° C geschüttelt. Die Bakterien wurden bei 10000 x g in einer Kühlzentrifuge (Sorvall RC2 oder RC5) bei 4° C für 2 Minuten abzentrifugiert und die Plasmidpräparation laut Protokoll durchgeführt. Die Konzentration der präparierten DNA wurde durch die optische Dichte einer 1:50 Verdünnung mit 10 mM Tris-Cl, pH 8,4 bei 260 nm am BioPhotometer (Eppendorf) bestimmt. Die Plasmid-DNA wurde bei 4° C gelagert.

- LB-Medium, pH 7,0 (1 l)

10 g NaCl

10 g Trypton

5 g Hefeextrakt

Auffüllen mit dest. H₂O auf 1 l, pH-Wert einstellen und autoklavieren

2.4.2 Isolierung von Gesamt-RNA aus kultivierten Zellen

Zur RNA-Isolierung wurde das Medium abgesaugt und die Zellen mit PBS gewaschen. Um die Zellen zu lysieren und die RNA zu präparieren, wurde das NucleoSpinRNAII-Kit (Macherey-Nagel, Düren) verwendet, das eine DNaseI-Behandlung mit einschließt. Die Durchführung der RNA-Isolierung erfolgte nach Anleitung des Kits.

Die RNA wurde in 40 µl RNase-freiem-H₂O eluiert und bei -80 °C gelagert.

2.4.3 Konzentrationsbestimmung von RNA-Lösungen

Die Konzentrationsbestimmung erfolgte photometrisch im BioPhotometer (Eppendorf, Hamburg). Dazu wurde eine 1:50 Verdünnung von der isolierten Gesamt-RNA in RNase-freiem-H₂O eingesetzt. Gemessen wurden die Extinktionen bei 230 nm, 260 nm, 280 nm und 320 nm Wellenlänge und aus der angegebenen Verdünnung wurde direkt die RNA-Konzentration in der Lösung berechnet. Durch die Extinktionwerte bei 280 nm können Verunreinigungen durch Proteine erkannt werden. Die Extinktion bei 320 nm ist ein Maß für Streulichtverluste durch verunreinigende Partikel in der Lösung.

2.4.4 Reverse Transkription

Mit retroviraler reverser Transkriptase kann mRNA in komplementäre DNA (cDNA) übersetzt werden. Als Primer können random-Primer verwendet werden oder oligo-dT-Primer, wobei dann nur polyadenylierte RNA revers transkribiert wird. 1 µg Gesamt-RNA-Lösung wurde mit RNase-freiem-H₂O auf 7,5 µl aufgefüllt, 1 µl Oligo(dT)₁₂₋₁₈-Primer (Invitrogen, Groningen, Niederlande) zugegeben und 10 min bei 65 °C denaturiert, dann direkt in Eiswasser für 2 min auf 0 °C abgekühlt. Nach Zugabe von 2 µl 10 x PCR-Puffer (Roche, Mannheim), 2 µl 25 mM MgCl₂-Lösung (Roche), 4 µl 2,5 mM dNTP-Mix (hergestellt aus 10 mM Lösungen von dATP, dGTP, dCTP und dTTP, Roche), 1 µl RNasin (RNase-Inhibitor, Roche) und 1 µl Expand-RNaseH-

Reverse Transkriptase (der rekombinant in *E.coli.* hergestellten Reversen Transkriptase des Mouse Moloney Leukemia Virus) erfolgte die cDNA-Synthese in einer PCR-Maschine bei 42 °C. Anschließend wurde die reverse Transkriptase durch 15 minütige Inkubation bei 70 °C inaktiviert. Die cDNA-Proben wurden bei –20 °C gelagert. Von den RT-Ansätzen wurden 1 µl oder 2 µl als Template für eine PCR eingesetzt, wobei zuerst mit intron- oder Promotor-spezifischen Primern eine DNA-Verunreinigung ausgeschlossen wurde.

2.4.5 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Zur Amplifikation des Zielgens aus der mittels reverser Transkription der isolierten RNA erhaltenen cDNA, sowie für das Bestimmen der transgenen Nachzucht, wurde das Verfahren der Polymerase-Kettenreaktion genutzt. Dazu wurden zunächst für die Zielgene Primer-Paare (Tab. 2.1, 2.7) gelegt. Folgende Parameter dienen als Grundlage für die Primerauswahl: ca. 20 bp Länge, Schmelztemperatur zwischen 55 °C und 65 °C, GC-Gehalt 45-55 %, maximal drei gleiche Basen hintereinander und möglichst kein T am 3'-Ende. Weiterhin überprüft das zur Primer-Bestimmung verwendete Programm die Primer auf Selbstkomplementarität und berechnet die Schmelztemperatur nicht nur nach der Näherungsformel $T_m = (G+C) \times 4 \text{ °C} + (A+T) \times 2 \text{ °C}$, sondern berücksichtigt auch kooperative Effekte. Wurde bei der so ermittelten Annealing-Temperatur kein Amplifikat erhalten, wurde eine Gradienten-PCR durchgeführt und die Annealing-Temperatur anhand des Ergebnisses optimiert. Zur PCR-Reaktion wurde zunächst ein Mastermix angesetzt.

Die angegebenen Mengen entsprechen einem 20 µl Reaktionsansatz.

- 1 x PCR-Mastermix

8,2 µl H₂Odest.

10 µl 2 x Taq PCR-Mastermix (Qiagen, Hilden)

0,4 µl sense-Primer (50 mM)

0,4 µl antisense-Primer (50 mM)

Je 19 µl des PCR-Mastermixes wurden auf die einzelnen Reaktionsgefäße aliquotiert und anschließend in der Regel je 1 µl Probe zugegeben. Die Ansätze wurden gemischt, anzentrifugiert und eine PCR durchgeführt (Trio Thermoblock, Biometra, Göttingen). Folgendes Programm wurde üblicherweise verwendet (Annealingtemperatur X und Zyklenzahl Z des jeweiligen Primerpaares s. Tab. 2.1, 2.7):

4 min 94 °C

1 min 94 °C

1 min X °C

1 min 72 °C



Z - Zyklen

10 min 72 °C

Abkühlen auf 10°C

Bis zur Analyse durch eine Agarose-Gelelektrophorese wurden die Proben bei 4 °C gelagert.

2.4.6 Gradienten-PCR

Zur Ermittlung der optimalen Annealingtemperatur eines neuen Primerpaares wurde eine Gradienten-PCR durchgeführt. Dazu wurde ein 12 x PCR-Mastermix wie oben beschrieben angesetzt und ein geeignetes Template zum Mastermix gegeben. Der fertige Reaktionsansatz wurde aliquotiert und die PCR-Reaktion in einem Gradienten-PCR-Block (Mastercycler Gradient, Eppendorf, Hamburg) durchgeführt, der parallel zwölf verschiedene Annealingtemperaturen ermöglicht. Als Temperaturgradient wurde von der errechneten Annealingtemperatur Differenzen von 7 °C eingestellt. Es wurde das gleiche PCR-Programm wie in 2.4.5 angegeben verwendet.

2.4.7 Realtime-PCR

Zur quantitativen Analyse von Expressionsunterschieden der mRNA in Geweben und Zellen wurde mit jeweiliger cDNA (RT wie angegeben) und spezifischen Primern eine Realtime-PCR mit dem LightCycler (Roche, Idaho Technologies) durchgeführt. Der Lightcycler detektiert die Fluoreszenz-Emission des an die doppelsträngigen DNA-Moleküle bindenden Fluoreszenz-Farbstoffes. Hier wurde das QuantiTec SYBR Green PCR Kit (Qiagen) verwendet, wobei SYBR Green I bei 494 nm angeregt wird und ein Emissionsspektrum bei 521 nm besitzt. Der Reaktionsansatz wurde wie im Protokoll angegeben angesetzt, die Primerkonzentration entsprach 0,5 µM. Die Produkte der Primer waren idealerweise 150 bp lang.

- Real-Time-PCR-Bedingungen:

15 min 95°C

15 sec 94°C

20 sec X °C (i.d.R. 60°C)

5 – 25 sec 72°C (5 s per 100 bp)



55 – 70 Z

5 sec Y°C (T_m-Dimer ≤ x ≤ T_m-Produkt)

Die Auswertung der Ergebnisse erfolgte im Vergleich zu einem „Standardgen“, in diesem Fall durch die parallele gemessene L7-mRNA, die die Gesamtmenge an Transkript wiedergeben sollte. Die Läufe wurden je nach Schwankung 2 – 3 x wiederholt, mit jeweils doppelter Anzahl einer Probe. Das arithmetische Mittel wurde für die weitere Berechnung verwendet. Die Transkriptmenge im Vergleich zu einem Standard-Gen wurde wie folgt berechnet:

- $\Delta C_T = C_T (\text{Gen A in Gewebe X}) - C_T (\text{Gen N in Gewebe X})$
- $X = 2^{-\Delta C_T}$

N = Standard-Gen (Normalizergene)

C_T = Certain Threshold Level (Fluoreszenzdetektion an Schwellenwert als Zyklenzahl)

2.4.8 Agarose-Gelelektrophorese

Zum Nachweis der PCR-Produkte wurden 2 %ige Agarose-Gele (Seakem LE Agarose, Biozym, Hessisch-Oldendorf) in TBE-Puffer gegossen. Die Agarose wurde durch Aufkochen im TBE-Puffer gelöst, nach dem Abkühlen auf ca. 70 °C in einen Gelträger gegossen und ein Kamm zur Ausbildung von Taschen zum Probenauftrag eingesetzt. Zu den PCR-Ansätzen wurden entsprechende Mengen 6 x. Elektrophorese-Puffer gegeben und je 12 µl auf das Gel aufgetragen. Es wurden zwei verschiedene Marker als DNA-Längenstandard eingesetzt, 100 bp DNA-Leiter (MBBL, Bielefeld) und GeneRuler DNA Ladder-Mix (MBI Fermentas, St. Leon-Rot). Beide hatten eine Gesamtkonzentration von 100 ng/µl, je 2,5 µl wurden aufgetragen. Das auspolymerisierte Gel wurde mit TBE-Puffer überschichtet und die Proben in die Taschen gegeben. Der Gel-Lauf erfolgte bei 5 V/cm Elektrodenabstand. Anschließend wurde das Gel in

ein Ethidiumbromid-Bad (1 µg/ml in TBE) gefärbt. Ethidiumbromid ist ein Fluoreszenzfarbstoff der in die DNA interkaliert. Die DNA-Banden können somit auf einem UV-Transilluminator sichtbar gemacht und das Gel zur Auswertung fotografiert werden.

- 5 x TBE

54 g/l Tris-Base

27,5 g/l Borsäure

10 mM EDTA

pH 8,0

- 6 x Elektrophorese-Puffer

0,25 % Bromphenolblau

0,25 % Xylencyanol FF

30 % Glycerin in H₂O-dest.

2.5 Proteinbiochemie

2.5.1 Proteinaufreinigung aus kultivierten Zellen

Zur Proteinisolierung wurde zunächst das Medium abgesaugt und die Zellen mit PBS gewaschen. Die Zellyse wurde mit RIPA-Lysoislösung durchgeführt. Auf eine 30 mm Schale wurden 100 µl der Lösung gegeben und die Zellen unter Verwendung eines Zellschabers von der Kulturschale gelöst. Die Suspension wurde in ein Eppendorf-Gefäß überführt und durch eine 26 G-Kanüle homogenisiert. Das Homogenat wurde 1 h auf Eis gestellt und dann für 1 min mit Ultraschall behandelt. Anschließend wurden die unlöslichen Bestandteile 10 min bei 14000 g abzentrifugiert. Die Lysate wurden bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert werden.

- RIPA-Puffer

1 % NP-40

0,5 % Natriumdeoxychololat

0,1 % SDS

in PBS

- RIPA-Lysoislösung

5 mM EDTA

5 mM 1,10-Phenanthrolin

1 x Proteinaseinhibitor

in RIPA-Puffer

2.5.2 Proteinbestimmung

Die Proteinbestimmung eines Zellextraktes wurde mit der Bicinchoninsäure (BCA)-Methode bestimmt. Zuerst wurde eine Eichgerade aus einer BSA-Verdünnungsreihe in dem jeweiligen Lysis-Puffer ermittelt (0,1-0,5 mg/ml). 20 µl des Zellextraktes wurden mit 30 µl H₂O verdünnt und mit 1 ml BCA-Reagenz (1 Teil CuSO₄ x 5H₂O, 50 Teile BCA-Lösung, Fa. Pierce) für 30 min bei 37°C inkubiert (Komplexbildung). Die Extinktion der Proben wurde bei einer Wellenlänge von 562 nm am Spektralphotometer gemessen. Als Referenz diente ein Ansatz mit H₂O und BCA-Reagenz.

2.5.3 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zur Auftrennung von Proteinen aus Zellextrakten und Zellkulturlysaten nach Masse wurden SDS-Polyacrylamidgelelektrophoresen mit SDS-haltigem diskontinuierlichen HCl/Tris-Glycin-Puffersystem nach Lämmli (1970) durchgeführt. Ein Sammelgel mit pH 6,8 überschichtet dabei ein Trenngel mit pH 8,8. Die Dicke der Minigele beträgt 1 mm. Die Trenn- und Sammelgele setzen sich wie folgt zusammen:

Mengen für 1 Minigel	Trenngel		Sammelgel
	10 %	15 %	3,75 %
Acrylamid-Mix mit 30 % AA, 0,8 % BisAA (Rotiphorese Gel 30, Roth, Karlsruhe)	675 µl	1 ml	250
3 M Tris, pH 8,8	500 µl	500 µl	-
1 M Tris, pH6,8	-	-	190 µl
Aqua bidest.	2,7 ml	2,4 ml	650 µl
60 % Saccharose	-	-	375 µl
10 % SDS	40 µl	40 µl	15 µl
10 % APS	40 µl	40 µl	15 µl
TEMED	4 µl	4 µl	1,5 µl

Tab. 2.4: Mengenangaben für die verwendeten Trenn- und Sammelgele.

Die Polymerisation startet durch den Radikalstarter TEMED und den Katalysator APS, die deshalb als letztes unmittelbar vor dem Gießen der Gele zugegeben wurden. Erst nach der Polymerisation der Trenngele wurden die Sammelgele gegossen. Zur Ausbildung einer glatten Gekante wurden die Trenngele bei der Polymerisation mit Isopropanol überschichtet. In die Sammelgele wurden vor der Polymerisation Käbme zur Ausbildung von Geltaschen gesteckt. Nach Zusammenbau wurde die Gelkammer mit 1 x SDS-Laufpuffer gefüllt. Zur Denaturierung wurden die Proteinproben mit 5 x SDS-Probenpuffer für 5 Minuten bei 95° C inkubiert. Die Proteinproben liefen nach der Beladung der Gele bei einer konstanten Spannung von 80 V in die Sammelgele ein. Nach dem Übergang ins Trenngel wurde die Spannung auf 100 V erhöht. Als Molekulargewicht-Marker wurde Mark 12 von Invitrogen verwendet.

- 10 x SDS-PAGE-Laufpuffer

250 mM Tris

2,5 M Glycin pH 8,3

1 % SDS

- 5 x SDS-Probenpuffer

250 mM Tris-HCl pH 6,8

50 mM DTT

50 % Glycerin

10 % SDS

0,5 % Bromphenolblau

2.5.4 Immunblot (Semidry-Elektroblot, Westernblot)

Zur Antikörper-Detektion müssen die Proteine aus dem SDS-Polyacrylamidgel auf eine Nitrocellulose-Membran transferiert werden. Dieses erfolgt durch Diffusion oder im elektrischen Feld. In dieser Arbeit wurde das Verfahren des Semidry-Elektroblots durchgeführt, bei dem zwei Graphitplatten als Anode und Kathode dienen. Als erstes wurden zwei Filterpapiere (GB002, 190 g/cm², Schleicher&Schuell, Dassel), getränkt in 300 mM Tris, 20 % Methanol, auf die Anode gelegt und darauf ein weiteres Filterpapier, getränkt in 30 mM Tris, 20 % Methanol. Als nächstes wurde die in H₂Odest. angefeuchtete Nitrocellulose-Membran (Protran BA85, Porengröße 0,45 µm und µm bei 15 % Gelen, Schleicher&Schuell) aufgelegt. Das SDS-Polyacrylamidgel wurde luftblasenfrei auf die Membran gelegt und darüber drei Filterpapiere, getränkt in 25 mM Tris, 20 % Methanol, 40 mM α -Aminocapronsäure.

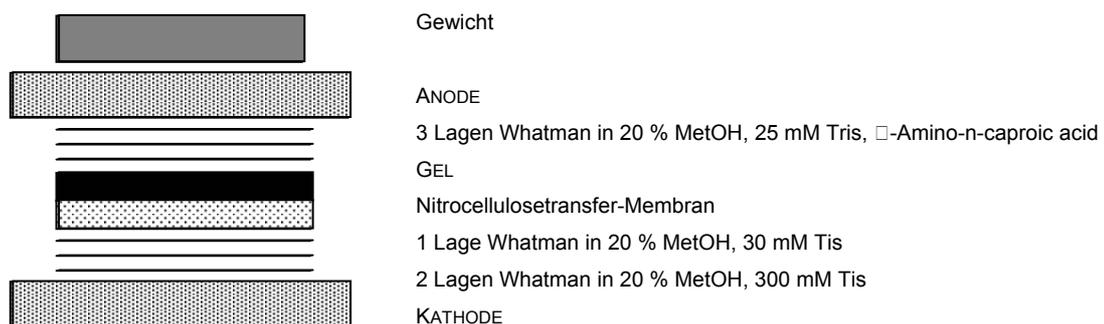


Abb. 2.1: Aufbau eines Elektroblots.

Die Membran und das Gel sollten gleich groß sein und möglichst genau übereinander liegen. Durch vorsichtiges Rollen einer Glaspipette auf dem Semidry-Blot wurden Luftblasen entfernt.

Die Kathode wurde aufgesetzt und beschwert. Die Übertragung der Proteine aus dem Gel auf die Nitrocellulosemembran erfolgte für 60 min mit einer Stromstärke von 100 mA je Gel. Nach dem Blotten wurde eine Kontrollfärbung mit PonceauS durchgeführt. Dazu wurde das Gel in eine Schale mit Wasser gelegt und PonceauS-Lösung (0,1 % PonceauS, 5 % Essigsäure, Sigma, Deisenhofen) zugegeben. Die Marker-Banden und die einzelnen Spuren wurden mit Bleistift auf der Membran markiert und anschließend PonceauS durch Schütteln in TBS-Puffer abgewaschen.

- 10 x TBS

100 mM Tris-Cl pH 7,3

1,37 M NaCl

2.5.5 Enzym-vermittelte Chemilumineszenz (ECL)

Bevor die Detektion der gesuchten Proteine auf der Immunblot-Membran erfolgen kann, müssen zunächst freie Proteinbindungsstellen auf der Nitrocellulose abgesättigt werden. Dazu wurde der Blot für 4 h bei RT oder über Nacht bei 4 °C in Absättigerlösung geschüttelt. Dann wurde der spezifische 1. Antikörper verdünnt in Absättigerlösung auf den Blot gegeben und nach entsprechender Zeitvorgabe geschüttelt. Durch viermaliges Waschen in TTBS für je 10 min wurde nicht gebundener 1. Antikörper entfernt. Der Peroxidase markierten Sekundär-Antikörper wurde in der entsprechenden Verdünnung in Absättiger für 45 bis 60 min bei RT unter Schütteln inkubiert. Nach dreimaligem Waschen des Blots mit TTBS konnte die Detektion durch ECL erfolgen. Die an den Sekundär-Antikörper gebundene Meerrettich-Peroxidase oxidiert in Gegenwart von Wasserstoffperoxid das Substrat Luminol. Dabei entsteht ein kurzlebige Zwischenprodukt, das unter Lichtemission in den Grundzustand übergeht. Das emittierte Licht kann mit einem Röntgenfilm detektiert werden.

Die Durchführung der ECL-Detektion erfolgte in der Dunkelkammer. Es wurde LumiLightPLUS - Reagenz (Roche, Mannheim) verwendet. Die beiden Lösungen wurden im Verhältnis 1:1 gemischt und gleichmäßig auf der Membran verteilt. Nach einminütiger Inkubationszeit wurde das Reagenz seitlich mit einem Tuch abgesaugt und die Membran in eine Belichtungskammer luftblasenfrei und glatt zwischen zwei Folien gelegt und ein Röntgenfilm (X-OMAT, Kodak, Rochester, N.Y.) aufgelegt. Je nach Intensität der Reaktion wurden die Filme nach unterschiedlichen Belichtungszeiten zwischen 30 s und 90 min entnommen. Zur Entwicklung der Banden wurden die Filme zunächst in ein Entwicklerbad gelegt (LX24 x-ray developer, Kodak), die Entwicklungsreaktion wurde in essigsäurehaltigem Wasser gestoppt und die Filme

2.6.2 Genetische Frühdiagnostik

Die Unterscheidung des Genotyps erfolgte durch PCR-Amplifikation (s. 2.4.5) genomischer DNA mit spezifischen Primern, die das jeweilige Fremdgen detektierten.

2.6.3 Diagnostik-Primer

Bezeichnung	Sequenz 5' ----- 3'	Tm [°C]	Zyklen	PCR- Produkt [bp]	Acc.-No.
Tets Tetas	GAT GTC CTT TAC TAA GTC ATC GCG C CTT GTC GTA ATA ATG GCG GCA TAC	63	30	360	U_89929
GFAPs GFAPas	AGG AGT TGG CGT GCC CAG GAA CGG AGG TGA TGC GTC TCC TCT	63	30	242	M_67446
Bar+s Bar+as	AAA TTG ACC GAT CAG AGT TTG AA GGG TTG CGG ATT ATC TCC TTC AG	60	35	398	Sequenz s. Anhang
TFs TFas	TGG AGA AGA TCC CAA ACG GTA C TCG CTT GAG TAA AGA ATC CGG TC	60	35	290	M_19736

Tab. 2.6: Für Diagnostik der transgenen Tiere verwendete Primer.

2.6.4 Schnellpräparation von DNA aus Schwanzspitzen

Um eine Früherkennung des Genotyps zu ermöglichen, ist die Gewinnung einer DNA-Probe nötig. Diese wurde aus einem ca. 1-2 mm langen Stück Schwanzspitze gewonnen, die den Tieren in einem Alter von 21 Tagen abgenommen wurde. Das Gewebe wurde in 400 µl Pufferlösung überführt und nach Zugabe von Proteinase K in einer Endkonzentration von 10 µg/ml für mindestens zwei Stunden bei 55°C im Schüttler inkubiert. Die Proteinase wurde anschließend durch 10 minütiges Erhitzen auf 95°C denaturiert. Von der DNA Lösung aus der Schwanzspitzepräparation wurden 1-2 µl in einem 20 µl PCR-Ansatz eingesetzt.

- 10 x Schwanzspitzenpuffer

1 mM Tris-HCl

5 mM KCl

0,45 % NP40

0,45 % Tween 20

2.6.5 Induktion der doppelt-transgenen Tiere

Zur Induktion wurde den Tieren, je nach Versuch 14 bis 21 d 0,6 % Doxizylin (Sigma) in feuchtes Futter beigemischt. Da das Antibiotikum lichtempfindlich ist, wurde das Futter in spezielle lichtabschirmenden Futterschalen gegeben.

2.6.6 Präparation der Tiere

Die Tiere wurden durch Dekapitation mit vorheriger Betäubung (Isofluran/CO₂) getötet und die verschiedenen Organe schnell herauspräpariert, um eine möglichst gute Erhaltung des Gewebes zu gewährleisten.

2.6.7 Herstellen von Fibroblasten-Primärkulturen

Nach Dekapitation wurde das Bauchfell mit sterilem Präparationsbesteck herauspräpariert und in sterilem CMF-PBS gesammelt. Nach Überführung des Gewebes in einen sterilen, mit ca. 10 ml einer Verdauungslösung gefüllten Erlenmeyerkolben, wurde es dort zerkleinert und 1 – 2 h bei 37 °C geschüttelt. Zur weiteren Vereinzelung der Zellen wurde die Suspension mit einer 5 ml Glaspipette auf- und abpipettiert, dann in ein steriles Plastikröhrchen gefüllt und 100 x g 10 min zentrifugiert. Das Zellpellet wurde 2 x mit PBS gewaschen, die Zellsuspension auf 6 x 10⁵ Zellen/0,5 ml verdünnt und die Zellen in RPMI + 10 % FCS (Penicillin/Streptomycin- und Fungizonehaltig) kultiviert.

- Verdauungslösung (10 ml):

20 mg Dispase II
15 mg Collagenase
5 mg DNase I
1 % Horse Serum
in CMF-PBS
(-20°C lagern)

2.6.8 RNA-Präparation aus Gewebe

Transgenen induzierten, sowie nicht induzierten Tieren wird Gewebe für Expressionsanalysen des Fremdgens entnommen. Zur Extraktion der RNA wird die Phenolmethode nach Chomczynski und Sacchi (1987) angewendet. Zur Vermeidung der RNA-Degradation durch Kontamination mit Ribonucleasen wurde RNase-frei gearbeitet. Alle Lösungen wurden mit DEPC-Wasser angesetzt. DEPC carboxyliert Histidin-Reste und inaktiviert damit die stabilen Ribonucleasen. Je 100 mg schockgefrorenes Gewebe wurde in 1 ml GTC (4 M Guanidinium Thiocyanat, 25 mM Natriumcitrat und 0,5 % Sarkosyl in DEPC-Wasser) mit 7,2 µl β-Mercaptoethanol homogenisiert. Nach Zugabe von 100 µl Natriumacetat pH 4,0, 1 ml H₂O-gesättigtem Phenol und 200 µl Chloroform/Isoamylalkohol (49:1) und Invertieren nach Zugabe jeder einzelnen Reagenz, wurden Proteine und andere Zellbestandteile für 15 min bei 4° C ausgefällt. Anschließend wurde 30 min bei 4° C mit 10000 x g zentrifugiert. Die RNA wurde aus der wässrigen Phase mit 1 Volumen 100 % Isopropanol gefällt. Es folgte eine mindestens einstündige Inkubation bei -20° C oder eine 15 minütige Inkubation bei -70° C. Die Sedimentation der RNA erfolgte durch Zentrifugation für 20 min bei 10000 x g und 4 °C. Das Pellet wurde in 300 µl GTC-Lösung resuspendiert und erneut gefällt. Die Fällung erfolgte mit dem doppelten Volumen 100 % Ethanol und einer mindestens einstündigen Inkubation bei -20° C oder einer 15 minütigen Inkubation bei -70° C. Die RNA wurde erneut durch Zentrifugation für 20 min bei 10000 x g und 4 °C sedimentiert. Nach zweimaligem Waschen in 75 % Ethanol in DEPC-Wasser wurde das Pellet getrocknet und in 100 µl DEPC-Wasser aufgenommen. Die RNA wurde durch 15 minütiges Schütteln (37 °C) gelöst und direkt ins Eis gestellt. Nach einer Konzentrationsbestimmung durch Messung der optischen Dichte einer 1:50 Verdünnung in 10 mM Tris-Cl, pH 8,4 bei 260 nm im BioPhotometer (Eppendorf) wurden die RNA-Proben bei -70° C gelagert.

Messung der RNA, sowie Herstellung von cDNA zur Expressionsanalyse s. 2.4.3 und 2.4.4.

2.7 Aufarbeitung der Gewebe für Histologische Methoden

2.7.1 Anfertigung von Gefrierblöcken

Zur Anfertigung von Gefrierblöcken wurde frisch entnommenes Gewebe verwendet. Die Gewebestücke wurden mit Einbettmedium der Firma Jung auf Korkplatten aufgeklebt und zum Schutz vor Gefrierschäden damit benetzt. Um eine Schädigung des Gewebes durch zu schnelles Abkühlen zu vermeiden, wurde dieses zunächst für ca. 1 min in flüssigem Propan vorgekühlt, anschließend in flüssigen Stickstoff überführt. Die Gewebelöcke wurden in Plastikröhrchen bei -80 °C gelagert.

2.7.2 Anfertigung von Gewebeschnitten

Die gefrorenen Gewebe wurden mit einem Gefriermikrotom (2800 Frigocut, Reichert-Jung, Nussloch) in einer Dicke von 5-10 µm geschnitten und direkt mit dem Objektträger (Menzel-Gläser, Braunschweig) abgenommen, anschließend maximal 10 min zum Antrocknen bei 4 °C gelagert.

2.7.3 Methanolfixierung

Methanolfixierung eignet sich besonders zur Darstellung von Cytoskelettelementen, fibrillären Strukturen und Organellen. Die starke Entwässerung führt oft zu einem Verlust zytosolischer Proteine. Die Gefrierschnitte wurden nach dem Antrocknen 15 min in eiskalten 100 % Methanol fixiert und anschließend dreimal 5 min in PBS gewaschen.

2.7.4 Paraform-Aldehyd (PFA)-Fixierung

Die Vernetzung der Proteine durch PFA-Fixierung führt zu einer guten Erhaltung zytosolischer Proteine. Bei Immunfärbungen ist eine unspezifische Bindung von Antikörper z. T. vorhanden. Die Objekte wurden 10 Minuten mit 4 % PFA in PBS, RT, fixiert.

2.7.5 Immunhistochemie an Gefrierschnitten

Diese Methode nutzt die äußerst spezifische Bindung von Antikörpern an ihre Antigene. Monoklonale Antikörper erkennen nur ein einzelnes Epitop und sind von daher äußerst spezifisch. Sie werden in der Regel aus dem Kulturüberstand von Hybridomazellen (Fusion aus antikörperproduzierenden B-Lymphozytenzellen und Zellen einer immortalisierter Zelllinie) gewonnen. Polyklonale Antikörper werden aus dem Serum von Tieren aufgereinigt, die zuvor mit dem entsprechenden Antigen immunisiert wurden. Dabei werden Antikörper gegen verschiedene Epitope des Antigens gebildet. Ist das Antigen ein ganzes Protein, werden durch die Antikörper verschiedene Domänen des Gesamtproteins erkannt. Dieses Antikörpergemisch ist weniger spezifisch. Dies kann unter Umständen, z.B. nach Fixierung des Gewebes von Vorteil sein. Die Antikörper können entweder direkt an ein Fluorochrom oder Enzym gebunden sein, oder sie werden durch einen markierten Zweitantikörper (Fluorochrom oder Enzym konjugiert) erkannt, was zu einer Signalverstärkung führt, da an die Primärantikörper in der Regel mehrere Sekundärantikörper binden.

Wahlweise Fixieren: 20 min mit 4 % Paraformaldehyd in PBS, RT

Blocken: 1 - 2 h in feuchter Kammer mit 2 % BSA in PBS, RT

Waschen : 1 x mit CMF-PBS

1. AK-Inkubation: 1 - 2 h, in jeweiliger Verdünnung mit 0,5 % BSA, in feuchter Kammer, RT oder über Nacht, 4 °C

Waschen: 3 x 5 min mit CMF-PBS

Wahlweise Blocken: 30 min - 1 h mit 2 % BSA

2. AK-Inkubation: 45 min in feuchter Kammer (Lichtschutz bei Fluorochrom)

Waschen: 3 x 5 min mit CMF-PBS, 1 x mit dest. H₂O zur Vermeidung von Salzkristallen spülen

Eindecken: Elvanol

2.8 Standardfärbemethoden

2.8.1 NISSL

Die Objekte wurde nach Methanol-Fixierung in die auf 60 °C vorgewärmte Farbstofflösung überführt und darin für 15 min (im Wärmeschrank) gefärbt. Anschließend wurden die Schnitte für 5 min in 70 % Alkohol differenziert und über 80 %, 90 % und 100 % Ethanol, sowie Xylol für jeweils 5 min entwässert. Eingedeckt wurde mit Entellan (Merck).

Als Farbstoff kann Kresylviolett oder Methylenblau verwendet werden.

2.8.2 Kernfärbung mit DNA-bindenden Fluoreszenzfarbstoffen

Eine Anfärbung mit DNA-bindenden Fluoreszenzfarbstoffen wurde in einigen Fällen zusätzlich zur Fluoreszenzmarkierung mit Antikörpern verwendet. Mit dieser Methode lassen sich auch apoptotische und proliferierende Zellen detektieren, deren Chromatin stark kondensiert ist und die dadurch intensivere Fluoreszenz zeigen.

Der blau fluoreszierende Farbstoff Bisbenzimid (Hoechst 33258, Sigma B 2261) wurde in einer Endkonzentration von 0,1 µg/ml in PBS verwendet. Die Lösung wurde nach dem letzten Waschschrift aufgetropft, für 5 min inkubiert, die Schnitte anschließend in PBS, dann kurz in Wasser gespült und mit Elvanol eingedeckt.

2.8.3 HE (Hämatoxylin/Eosin)

Mit Hämatoxylin wird eine Anfärbung von Nukleinsäuren, also eine Kernfärbung erreicht. Eosin färbt das Zytoplasma. Die Schnitte wurden für 15 min mit frisch filtrierter Hämatoxylinlösung (Gemisch aus Meyers Hamatoxylin und Harris) gefärbt, die Färbelösung abgesaugt und die Schnitte in fließendem Leitungswasser für 10-15 min gespült. Dabei findet eine Oxidation des gebundenen Hämalan statt was zur endgültigen Farbstoffentwicklung führt. Die 0,1% Eosin-Färbelösung wurde 5 min auf den Objektträger gegeben, dann 10 min mit H₂O abgespült. Die Schnitte wurden entwässert und mit Entellan eingedeckt (s. 2.8.1).

2.8.4 Acridinorange-Färbung

Mit dieser nicht dauerhaften Färbung lässt sich DNA und RNA gleichzeitig durch unterschiedliche Anregungswellenlängen darstellen. Dabei fluoresziert RNA rot und DNA grün bei jeweils anderen Fluoreszenzfiltern. Das Absorptionsmaximum liegt bei 467 nm.

Die Objekte wurden in einem Äther/Alkohol-Gemisch (1:1) fixiert, in aufsteigender Alkoholreihe entwässert, dann für 5 sec in 1 % Essigsäure gespült; anschließend wurden die Präparate 2 min in Phosphat-Puffer (pH 6,0) gewaschen. Die Objekte werden 3 min in Färbelösung (0,01% Acridinorange in Phosphatpuffer, pH 6,0) inkubiert, 2 x 2 min in Phosphatpuffer gewaschen, in diesem eingedeckt und sofort unter dem Fluoreszenz-Mikroskop betrachtet.

- Stammlösung Acridinorange

0,1% Acridinorange in destilliertem H₂O

- Sörensen-Phosphat-Puffer

12 ml Na₂HPO₄ (1M)

88 ml KHPO₄ (1M)

8 g NaCl

0,2 g Kcl

auf 1L auffüllen und pH 6,0 einstellen

2.9 Dokumentation und Auswertung

- *Mikroskopie*
Axiophot Fluoreszenzmikroskop (Phasenkontrast und UV), Zeiss
Konfokales Lasermikroskop (TCS SP2), Leica
- *Fotodokumentation*
Digitalkamera Coolpix 990, Nikon
- *Software*
Adobe Photoshop, Version 6,0
Excel, Version XP
Image J (version 1.26; <http://rsb.info.nih.gov/ij/>)

3 Ergebnisse

3.1 Regulierte *barnase*-Expression durch ein modifiziertes Tetrazyklin-abhängiges Expressionssystem und ein daraus resultierender Zelltod

In meiner Diplomarbeit und im 1. Jahr meiner Dissertation wurden neue Zielpromotoren des Tetrazyklin-abhängigen Expressionssystems in Reporterstudien auf ihre Induzierbarkeit und Basalrate in Zellkultur getestet, um eine Optimierung des Systems für die konditionale Toxingenexpression zu erreichen. Der stringenteste Zielpromotor wurde als Promotor für ein Toxingen, das für *barnase*, eine bakteriellen RNase kodiert, verwendet. In Zellkultur konnte gezeigt werden, dass eine regulierte Expression der *barnase* in doppelt-stabilen Zelllinien, die den Tet-Aktivator und *barnase* enthielten, durch Induktion möglich war und ein Absterben dieser Zellen erfolgte. Weiterhin wurde die Kinetik der *barnase*-Induktion untersucht und die Aktivierbarkeit des Toxins durch einen neuronenspezifischen Aktivator (NSE-tTA) getestet.

Diese Ergebnisse werden in Form einer Publikation vorgestellt:

„Conditional cell ablation by stringent tetracycline-dependent regulation of *barnase* in mammalian cells“

Leuchtenberger, Perz, Gatz, Bartsch; Nucleic Acids Research, 2001, Vol.1, No. 16.

Conditional cell ablation by stringent tetracycline dependent regulation of *barnase* in mammalian cells

Stefanie Leuchtenberger¹, Angela Perz¹, Christiane Gatz², and Jörg W. Bartsch^{1*}

¹ Developmental Biology/Molecular Pathology, W7, University of Bielefeld, 33615 Bielefeld, Germany; and ² Albrecht-Haller Institute for Plant Sciences, University of Göttingen, Untere Karspüle 2, 37073 Göttingen, Germany

*To whom correspondence should be addressed at

Dr. J.W. Bartsch
Developmental Biology/Molecular Pathology
University of Bielefeld
33615 Bielefeld
Phone: + 49 521 1065630
FAX: + 49 521 106 5654
E-Mail address joerg.bartsch@uni-bielefeld.de

Abstract

Conditional expression of suicide genes *in vivo* has a wide range of applications in biological research and requires a minimal basal promoter activity in the uninduced state. To reduce basal activity of tetracycline (tc)-inducible target promoters we combined synthetic *tet* operators in varying numbers with a core promoter derived from the plant viral 35S promoter. An optimized promoter, P_{TF}, was found to exert a stringent regulation of luciferase in combination with tTA and rtTA in different mammalian cell lines. We linked P_{TF} to the *barnase* gene, coding for a highly active RNase from *Bacillus amyloliquefaciens*. Stable cell clones expressing *barnase* under control of tTA exerted cell death only after tc withdrawal, correlating with a 10-fold induction of *barnase* mRNA expression. Directing tTA expression through a neuron-specific enolase promoter (P_{NSE}) leads to *barnase* expression and cell death in neuronal cells after tc withdrawal. Taken together, our data demonstrate that a stringent control of *barnase* expression in the uninduced state improves cell ablation studies, as high frequencies of transgene propagation in both, cell lines and in transgenic mice, are observed.

Introduction

For many applications in gene therapy and medical research, the expression of a suicide gene at defined time points is of great advantage. In particular, the cell-specific induction of toxin genes represents a promising approach for the functional analysis of distinct cell types *in situ*. In many human diseases, loss of distinct cell types leads to detrimental diseases, for instance in the central nervous system (CNS). Until now, conditional cell-ablation has been achieved either by introduction of the herpes simplex thymidine kinase (HSV-*tk*) cassette for functional analysis of astrocytes in transgenic mice (1,2) or by tetracycline (tc)-dependent expression of diphtheria toxin A chain (DTA) in cell lines (3) and transgenic mice (4). These approaches faced several limitations: the HSV-*tk* gene is only applicable to ablation of proliferating cells within the CNS. Tetracycline controlled expression of DTA led to very low yields of recombinant cell clones of transgenic mice, as the original target promoter (5) revealed leakiness in the uninduced state.

The tc-dependent expression system is based on a chimaeric transcriptional transactivator tTA, which is a fusion between the bacterial Tet repressor (TetR) and the constitutive activation domain of herpes simplex protein 16 (VP16). Binding of tTA to a target promoter consisting of multiple operators upstream of a core promoter leads to activation of transcription, which can be abrogated by addition of tc or the commonly used analog doxycycline (dox), which interferes with DNA binding of tTA. In addition, a TetR mutant that binds DNA only in the presence of tc has been exploited for the construction of rtTA, yielding a tc-inducible promoter (6).

In previous reports it has been demonstrated that the efficiency of the tc system is dependent on the cell line tested and is even more complex in transgenic mice where residual activity even in the absence of the transactivator depends on the tissue (7,8). The difference in expression levels between induced and uninduced transgenic tissue is 100 in optimal cases and varies in different tissues. Residual activity might be due to transcription factor binding to the CMV core promoter (7). The problem of leakiness is even more pronounced when rtTA is used as a transcriptional activator.

Three different approaches have been undertaken to reduce leakiness of the tc-dependent expression systems. Most recently, Urlinger et al. (9) isolated new rtTA alleles yielding lower activation in the uninduced state. Forster et al. (10) and Imhof et al. (11) used rtTA to drive tc-inducible expression of a suitable target promoter which was at the same time repressed by tTA in the absence of tc. This sophisticated arrangement reduced background activity by a

factor of 6, but has the disadvantage of requiring the simultaneous expression of two trans factors. Hoffmann et al. (12) used a modified mouse mammary tumor virus promoter (Δ MTV) in which the steroid-responsive elements were replaced by tetO sequences. However, as access of tTA depends critically on chromatin (13), induction levels are in average 10-fold lower than in CMV based target promoter.

In this work we constructed a new target promoter with reduced leakiness, by exchanging the viral cytomegalovirus core promoter by a plant viral promoter and by avoiding identical spacer sequences between the multimerized operators. Promoter constructs were tested for basal activity either with tTA or with rtTA in different mammalian cell lines. As our major goal is to ablate neuronal cell types within the mouse CNS, we included in our analyses cell lines representing the rodent nervous system. To assess the usefulness of the optimised promoter in cell ablation experiments, we combined it with the lethal RNase gene from *B. amyloliquefaciens* (Barnase, cf. [14]), thus demonstrating a stringent cell ablation strategy for mammalian cells and tissues.

2. Materials and Methods

2.1 Plasmids and cloning

The promoters P_{TAX} and P_{TF} were from plasmids pBHTAx and pBHTF (15).

For cloning, the promoter sequences were amplified by PCR using primers with *Hind*III linkers. As control plasmids for tc-dependent luciferase expression, plasmids pXTC7C53Luc (P_{XTC}-Luc; [5]) and pMtetO₅Luc (P_{MtetO₅}-Luc; [12]) were used. The plasmids pTAX-Luc and pTF-Luc were obtained by digesting pMtetO₅Luc with *Hind*III, and ligation of the *Hind*III promoter fragments into the respective vector sites. For construction of an expression vector containing the tetracycline inducible cDNA for Barnase, P_{TF} was fused to the Barnase coding region (16). Addition of a mammalian polyadenylation signal was achieved by cloning it into the expression vector SBC-1 (17) using *Cla*I and *Hind*III. As regulator plasmid, we used pUHD15-1 (5) or pUHD17-1 (6) encoding the tetracycline-dependent transactivator (tTA or rtTA, respectively) under control of a human cytomegalovirus (hCMV) promoter (P_{CMV}-tTA or P_{CMV}-rtTA). For cell specific expression of tTA, the hCMV promoter was removed by cleaving with *Xho*I, filled-in with Klenow DNA Polymerase and digested with *Eco*RI. A 1.8 kb NSE (neuronal-specific enolase) promoter-fragment was excised from pCRTopo-cloning vector (Invitrogen, Heidelberg, Germany) with *Eco*RI and *Pvu*II and ligated into unique restriction sites of pUHD15 to construct the neuronal regulator plasmid P_{NSE}-tTA.

The plasmids pRSVLacZII and pEGFP-N3 (Clontech, Heidelberg), containing β -galactosidase-cDNA (*lacZ*) or GFP under control of constitutive promoters, respectively, were used as reporter plasmids.

2.2 Cell culture and transfections

HeLa (ATCC CCL 2), CHO*dhfr*⁻ (ATCC CRL 9096) hamster ovary fibroblasts, C6 rat glioma cells (ATCC CCL 107), 293T human embryonal kidney cells (provided from Dr. Jan Cornelis, DKFZ, Heidelberg, Germany), PC12 rat adrenal pheochromocytoma (ATCC CRL 1721), mouse motoneuron-like cell line NSC-19 (18), and Neuro-2A neuroblastoma cells (ATCC CCL 153) were maintained in Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) containing 10% (v/v) foetal calf serum (FCS; Biochrom KG, Berlin); CHO*dhfr*⁻ cells were cultured in the presence of Prolin (5 mM) and HT supplement (0.1 mM Hpoxanthin, 0.01 mM thymidine). The cell line CHOAA8 (Clontech, Heidelberg), stably expressing the tetracycline dependent regulator tTA (plasmid pUHD15-1neo), was cultured in α -MEM supplemented

with 10% FCS and 100 µg/ml G418 (Gibco BRL). Neuronal cell lines and C6 cells were transfected with Lipofectamine (Promega, Madison, WI, USA), CHO*dhfr*- and 293T cells by using the calcium phosphate method. The transfection efficiencies were usually > 20 %, as determined by control transfections with pEGFP. Depending on the cell type, $1 - 3,5 \times 10^5$ cells were seeded into 30 mm plates and constructs were added 24 h later in the absence or presence of doxycycline (dox; Sigma, Steinheim, Germany). The dishes with dox were preincubated with 1.0 µg/ml 24h before transfection. Transient cotransfections were performed with ratios of 5 :1 regulator plasmid to target plasmid (*luciferase* or *barnase*) and cells were analysed 48 to 72 hours after transfection. Luciferase constructs were stably integrated by electroporating 10µg *PvuI* linearised plasmid in a Bio-Rad electroporator with 200 V and 480 µF. For stable transfection of *barnase* constructs, cotransfections were done in 1 : 10 and 1 : 20 ratios of pBSΔpac (CHOAA8) or pEGFP-neo (Neuro-2A) to P_{TF}-*barnase*. Three days after transfection, transfectants were selected either with 3.5 µg/ml Puromycin or 400 µg/ml G418 (Luciferase plasmids and pEGFP-neo).

2.3 Luciferase and β-Galactosidase assays

48h after transfection, cells were lysed by the addition of 150µl lysis buffer (supplied with the Dual-Light kit). Activities of β-Galactosidase and luciferase were measured by the Dual-Light Chemieluminescent Reporter Gene Assay (Tropix, Bedford, MS) using a Lumat LB 9507 (EG&G Berthold, Bad Wildbad, Germany). Enzyme activities were adjusted to protein content of cell lysates, which were determined by the BCA method (Pierce, Rockford, IL, USA).

2.4 Quantification of GFP-positive cells

GFP, P_{TF}-*barnase* and P_{CMV}-tTA (or P_{NSE}-tTA) cotransfected cells, subsequently cultured in the absence or presence of doxycycline, were analysed 48 and 72 h after transfection by UV. GFP positive cells were counted in similar sections of a number of microscopic fields. Similarly, transfected cells were rinsed from the plates with 1 ml of phosphate buffered saline (PBS) containing 0.05 mM EDTA. Numbers of GFP positive cells were determined in a Fluorescence activating cell sorter (FACS; Beckton-Dickinson) using an argon ion laser at 488 nm excitation wavelength.

2.5 Isolation of RNA and RT-PCR

Total RNAs from cultured cells were isolated by the NucleoSpin RNA II preparation method (Macherey-Nagel, Düren, Germany) with an included DNaseI digest. Usually, 500 ng to 1 µg of total RNA in 20 µl reaction volume was subjected to reverse transcription (RT) using superscript reverse transcriptase (Life Technologies GmbH, Eggenstein, Germany). After RT, 2 µl of a 1:5 dilution was used for PCR amplification in a total volume of 20 µl, containing MasterMix-Taq (Qiagen, Hilden, Germany).

For the bacterial RNase *barnase* the primers were: bar_s (5'-AGGTCTGATAATGGTCCGT-3') and bar_{as} (5'-AAGGGAACC TGGCAGACGTC-3'); for ribosomal protein L7 mRNA: L7_s (5'-AGATGTACCGCACTGAGATTC-3') and L7_{as} (5'-ACTTACCAAGAGACCGAGCAA-3').

Primers were obtained from TIB MolBiol (Berlin, Germany). PCR conditions for *barnase*: 4 min initial denaturation at 94°C, 20–25 cycles with 1 min denaturation at 92°C, 1 min annealing at 60°C, 45 sec elongation at 72°C and finally 10 min extension at 72°C; For *L7* amplification: 4 min initial denaturation at 94°C, 18–22 cycles with 1 min denaturation at 94°C, 45 sec annealing at 62°C, 45 sec elongation at 72°C, 10 min extension at 72°C. The resulting amplification products (*barnase*: 210 bp; *L7*: 352 bp) were separated by electrophoresis on 2% agarose gels and visualised by ethidium bromide staining.

2.6 Dot blot analysis

PCR products were diluted by 20× standard saline citrat buffer (SSC), boiled and transferred via Slot blot (Minifold^RII, Schleicher&Schuell, Dassel, Germany) to nylon membranes (Pall Biotyne B, Pall, Dreieich, Germany). The DNA were fixed by baking. The blots were hybridised with [α -³²P]dATP random labeled PCR amplifications of *barnase* and *L7*. After exposition (Bio-Imager, Bio-Rad, Göttingen), the signals were quantified by Bio-Rad Multi-AnalystTM, version 1.1.

2.7 Documentation

Photodocumentation was done on a Zeiss Axiophot fluorescence microscope with phase contrast and UV microscopy. Images were processed by Adobe Photoshop, version 6.0.

Results and Discussion

Optimisation of a tc-dependent target promoter

In order to reduce the background activity of the target promoter P_{XTC} (5), two new promoters - both of them containing multiple *tet* operator sites upstream of a minimal promoter - were constructed and fused to *luciferase* as a reporter gene. The sequences of both domains of the target promoter P_{XTC} (5) - the minimal promoter as well as the region encoding the operators - were altered (Figure 1). The minimal promoter, which is in the original P_{hCMV*1} the region -53 to +75 of the human cytomegalovirus (CMV) was exchanged against the region -45 to +1 of the plant viral cauliflower mosaic virus 35S promoter (15,19). In P_{TAX} , the „enhancer region“ consists of 4 operators and 3 identical spacer regions, which are different from those in P_{hCMV*1} . In P_{TF} the „enhancer region“ was exchanged against a fragment encoding 6 *tet* operators. The difference to P_{TAX} is, that the sequences between the operators are not multimerized, but each spacer encodes a different sequence. The rationale for this alteration is, that weak binding sites between operator sites might lead to background activity due to synergistic effects. These promoters were tested by transient transfection assays with tTA and rtTA in different cell lines and in stable cell clones of CHO cells (Figure 2). As control promoters, we used P_{XTC} , the original target promoter described by Gossen and Bujard, and a mouse mammary tumor virus (MMTV) LTR derived promoter (P_{MtetO5}), developed as tc-dependent promoter with reduced basal activity (12).

In all cell lines tested, P_{TF} and P_{MtetO5} revealed the lowest basal Luc activities in the uninduced state, which is at least 4- to 10-fold, depending on the cell line. P_{TAX} yielded higher background activities than P_{TF} , indicating that avoiding the multimerisation of identical spacer sequences indeed helps to reduce background activity. In the induced state, P_{TF} reaches at least 60 % of the expression levels of P_{XTC} in cell lines HeLa, CHO, PC12, and C6. In all these cell lines, P_{TF} activity was higher than in $pMtetO5$, this effect being most pronounced in HeLa cells.

In stable cell clones of CHO cells containing $P_{CMV-tTA}$ and a single copy integration of respective promoters, the reduction in basal activity is 12-fold with P_{TF} whereas induction is only reduced by 25 % compared to P_{XTC} . Thus, with this simple approach, basal activity of the target promoter was drastically reduced whereas induced activities were only reduced by 50%. This resulted in an increase of the activation of gene expression upon withdrawal of tetracycline from 16-fold to 140-fold. Also in combination with rtTA, these promoters yielded lower background activities in different cell lines, which was between 8- and 12-fold.

Analysis of conditional *barnase* expression

The optimised tc-dependent target promoter P_{TF} was used for conditional suicide gene expression. P_{TF} was fused to the *barnase* gene to give P_{TF} -*barnase*. The *barnase* gene contains the coding region for a *Bacillus amyloliquefaciens* RNase, a small extracellular RNase protein of 110 amino acid residues, which is *in vivo* inhibited by barstar (14). The *barnase* gene has been used in transgenic plants for cell-ablation studies (20).

The constructs P_{TF} -*barnase*, P_{CMV} -*tTA* (ratio 1:5), and a GFP (pEGFP) vector were co-transfected and numbers of surviving cells were determined by counting GFP positive cells (Figure 3). Usually, 48-72 hours after transfection, cell numbers were reduced by 80 % after tc withdrawal in all cell lines used. The observed residual cell survival might be due to the lack of simultaneous presence of all three constructs in one single cell.

Analysis of conditional gene expression in neuronal cells

To assess the regulated expression of *barnase* in neuronal cells, we generated stable Neuro2A cell clones comprising a low copy number of P_{TF} -*barnase* integrates. We received *barnase*-positive Neuro2A clones (70 % of all G418 resistant cell clones) that survived the selection procedure and exerted a conditional *barnase* expression after transient transfection with P_{CMV} -*tTA*, P_{CMV} -*rtTA*, P_{NSE} -*tTA* (Figure 3), which led to cell reduction of at least 70% after 48 hours. As a comparable induction rate would be achieved with a number of weak, cell-specific promoters, demonstrated by the neuronal-specific enolase (P_{NSE}) promoter, we argue that even a low induction of the *barnase* gene *in vivo* is sufficient to ablate specific cell types in transgenic mice.

To analyse the kinetics of conditional *barnase* expression, we generated individual CHO-AA8 (contains a stable integrate of P_{CMV} -*tTA*) cell clones containing stable integrates of P_{TF} -*barnase*. Out of twelve CHO cell clones positive for *barnase*, seven cell clones survived for a longer time period and *barnase* expression was tc-inducible; in these cells, *barnase* expression was inducible by tetracycline. From this calculation, > 60 % of all cell clones obtained revealed conditional cell ablation by the *barnase* gene. A representative induction experiment with a double-stable CHO cell clone is shown in Figure 5. The mRNA levels of *barnase* were determined by semiquantitative RT-PCR (Figure 5A). Induction of *barnase* is maximal 7 days after tc withdrawal and drops to lower levels later on (Figure 5C). At this time point, cell morphology appeared normal whereas 9 days after tc withdrawal, a clear-cut

change in cell morphology was detectable (Figure 5B and C). and no cell showed normal morphology compared to the uninduced state, demonstrating a complete cell ablation. The reason for the delayed kinetics of Barnase accumulation or toxicity compared to maximal levels of mRNA induction is unknown. However, a similar kinetic of luciferase accumulation has been observed with this promoter in transgenic plants (19). Similar ablation results were obtained with irradiated CHO cells. These cells were also completely ablated 11 days after withdrawal demonstrating that even under non-proliferative conditions, Barnase can act as a suicide gene (data not shown).

We also injected the P_{TF} -*barnase* construct in pronuclei to generate transgenic mice. So far, similarly to the observations in cell lines, we got high frequencies of *barnase* positive offsprings: from 10 born mice, 2 founder mice arose, which were viable and had a normal phenotype. These results imply that conditional *barnase* expression with P_{TF} resulted in higher frequencies of viable littermates as observed with a P_{XTC} -DTA construct, for which a ~ 1% rate of viable offsprings (3 per 317 born offsprings; [4]) was obtained.

In conclusion, we have presented a conditional suicide system based on a modified tetracycline-dependent expression system and combined with a prokaryotic RNase. We found that the low basal activity of P_{TF} allows a high percentage of transgenic propagation in cell lines and mice. In combination with *barnase*, even low induction levels of the target promoter, usually achieved by tTA expression under cell-specific promoters, are sufficient to exert conditional cell ablation. Thus, our novel cell ablation strategy might have an impact on the molecular analysis of pathological processes in transgenic animals, in particular in the CNS.

Acknowledgment:

We thank Drs. M.Gossen and H.Bujard, Heidelberg, for providing plasmids pXTCLuc and pUHD 15-1, pUHD 15-2, Dr. D. Spengler, Munich, for the plasmid pMtetO₅-Luc. The kind gifts of cell lines by Dr. H. Hauser, Braunschweig, Dr. J. Cornelis, Heidelberg, C. Spilker, Magdeburg, and Dr. K. Bluezstajjn, Boston are gratefully acknowledged. We thank Dr. P. Budde, Bielefeld, for help with FACS analyses. Work was supported by the VolkswagenStiftung to C.G. and J.W.B. S.L. is a fellow of the DFG, Graduate Program „Cellular Basics of biotechnical processes“. Details on the construction of plasmids are available on request.

References

1. Delaney, C., Brenner, M., Messing, A. (1996) Conditional ablation of cerebellar astrocytes in postnatal transgenic mice. *J. Neurosci.* **16**, 6908-6918.
2. Bush, T.G., Savidge, T.C., Freeman, T.C., Cox, H.J., Campbell, E.A., Mucke, L., Johnson, M.H., Sovroniew, M.V. (1998). Fulminant Jejuno-Ileitis following ablation of enteric glia in adult transgenic mice. *Cell* **93**, 189-201.
3. Keyvani, K., Baur, I., Paulus, W. (1999) Tetracycline-controlled expression but not toxicity of an attenuated diphtheria toxin mutant. *Life Sci.* **64**, 1719-1724.
4. Lee, P., Morley, G., Huang, Q., Fischer, A., Seiler, S., Horner, J.W., Factor, S., Vaidya, D., Jalife, J., Fishman, G.I. (1998). Conditional lineage ablation to model human disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 11371-11376.
5. Gossen, M., Bujard, H. (1992). Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 5547-5551.
6. Gossen, M., Freundlieb, S., Bender, G., Müller, G., Hillen, W., Bujard, H. (1995). Transcriptional activation by tetracyclines in mammalian cells. *Science* **268**, 1766-1769.
7. Furth P.A., Onge, L.St., Böger, H., Gruss, P., Gossen, M., Kistner, A., Bujard, H., Henninghausen, L. (1994). Temporal control of gene expression in transgenic mice by a tetracycline responsive promoter. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 9302-9306.
8. Kistner, A., Gossen, M., Zimmermann, F., Jerecic, J., Ulmer, C, Lübbert, H., Bujard, H. (1996). Doxycycline-mediated quantitative and tissue-specific control of gene expression in transgenic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 10933-10938.
9. Urlinger, S., Baron, U., Thellmann, M., Hasan, M.T., Bujard, H., Hillen, W. (2000) Exploring the sequence space for tetracycline-dependent transcriptional activators: novel mutations yield expanded range and sensitivity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 7963-7968.
10. Forster, K., Helbl, V., Lederer, T., Urlinger, S., Wittenburg, N., Hillen, W. (1999). Tetracycline-inducible expression systems with reduced basal activity in mammalian cells. *Nucleic Acid Research* **27**, 708-710.
11. Imhof, M.O., Chatellard, P., Mermod, N. (2000) A regulatory network for the efficient control of transgene expression. *J Gene Med.* **2**, 107-116.
12. Hoffmann, A., Villalba, M., Journot, L., Spengler, D. (1997). A novel tetracycline-dependent expression vector with low basal expression and potent regulatory properties in various mammalian cell lines. *Nucleic Acid Res.* **25**, 1078-1079.

13. Truss, M., Bartsch, J., Schelbert, A., Haché, R.J., Beato, M. (1995) Hormone induces binding of receptors and transcription factors to a rearranged nucleosome on the MMTV promoter *in vivo*. *EMBO J* **14**, 1737-1751.
14. Hartley, R.W. (1989). Barnase and Barstar: Two small small proteins to fold and fit together. *Trends Biochem. Sci.* **14**, 450-454.
15. Böhner, S., Lenk, I., Rieping, M., Herold, M., Gatz, C. (1999) Transcriptional activator TGV mediates dexamethasone-inducible and tetracycline-inactivatable gene expression. *Plant J.* **19**, 87-95.
16. Strittmatter, G., Janssens, J., Opsomer, C., Botterman, J. (1995) Inhibition of fungal disease development in plants by engineering controlled cell death. *Biotech.* **13**, 1085-1089.
17. Dirks, W., Wirth, M., Hauser, H. (1993) Dicistronic transcription units for gene expression in mammalian cells. *Gene* **128**, 247-249.
18. Cashman, N.R., Durham, H.D., Blusztajn, J.K., Oda, K., Tabira, T., Shaw, I.T., Dahrouge, S., Antel, J.P. (1992) Neuroblastoma x spinal cord (NSC) hybrid cell lines resemble developing motor neurons. *Dev Dyn.* **194**, 209-221.
19. Böhner, S., Gatz, C. (2001) Characterisation of novel target promoters for the dexamethasone-inducible/tetracycline-inactivatable regulator TGV using luciferase and isopentenyl transferase as sensitive reporter genes. *Mol. Gen. Gen.*, in press.
20. Beals, T.P., Goldberg, R.B. (1997). A novel cell ablation strategy blocks tobacco anther dehiscence. *The Plant Cell* **9**, 1527-1545.
21. Forss-Petter, S., Danielson, P.E., Catsicas, S., Battenberg, E., Price, J., Nerenberg, M., Sutcliffe, J.G. (1990) Transgenic mice expressing beta-galactosidase in mature neurons under neuron-specific enolase promoter control. *Neuron* **5**, 187-197.

Legend to Figures:

Figure 1:

Target promoter constructions (P_{XTC} , P_{MtetO} , P_{TAX} , P_{TF}) linked to *luciferase* or *barnase* used for analyses. Transcription start sites are indicated by arrows. Note that in P_{TF} , the spacer sequences between *tet* operators differ from each other.

Figure 2:

Comparative transactivation measurements of promoter-*luciferase* constructs in cell lines HeLa, HEK293, CHO, PC12, and C6 cells with either rtTA (left part) or tTA (right part); (+ dox, 1 μ g/ml dox, or - dox). Mean values of 5 independent experiments 48 hours after transient transfection of 100 ng target promoter construct and 500 ng P_{CMV} -rtTA or P_{CMV} -tTA. The mean values of promoter activity from 6 different CHOAA8 (P_{CMV} -tTA) cell clones comprising low copy integrations of promoter-*luciferase* constructs in the uninduced state and 48 hours after dox withdrawal are shown to the right.

Figure 3:

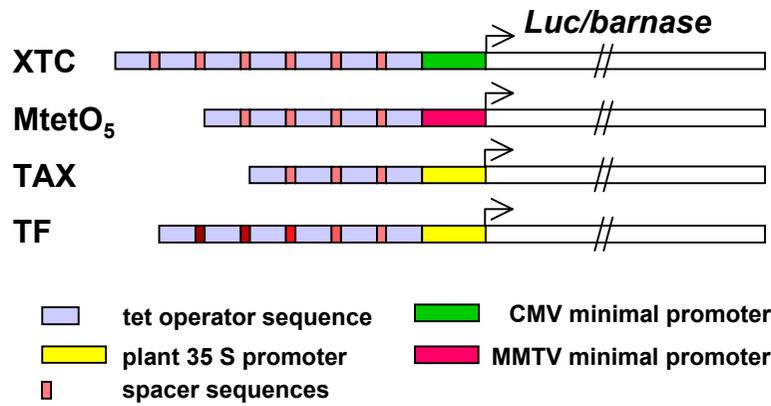
Tetracycline (dox) induced cell ablation by *barnase* in cell lines CHO, PC12, C6, and HEK with the P_{TF} -*barnase* construct. Cells were cotransfected with P_{TF} -*barnase* (100 ng), P_{CMV} -tTA (500 ng) and with 100 ng pEGFP with or without dox; 48 hours after transfection, cell numbers were determined as mean values by counting GFP⁺ cells in 10 independent fields of vision under the UV microscope (magnification 100x). Right diagram, for comparison, the number of HEK cells transfected as above were determined by fluorescence activated cell sorter (FACS) analysis.

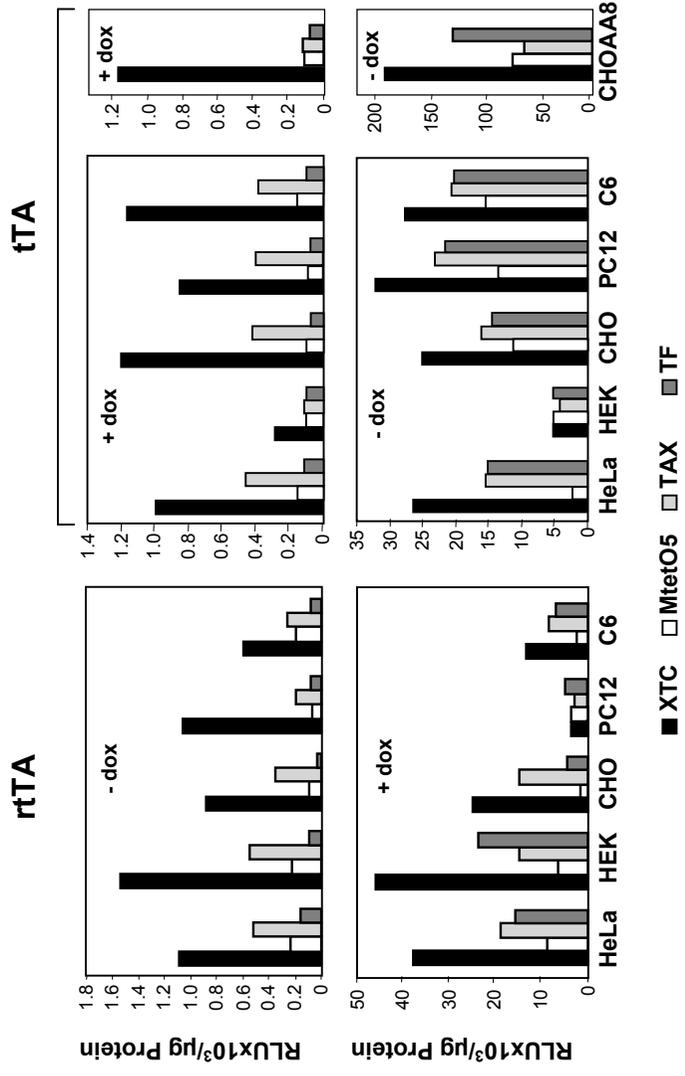
Figure 4:

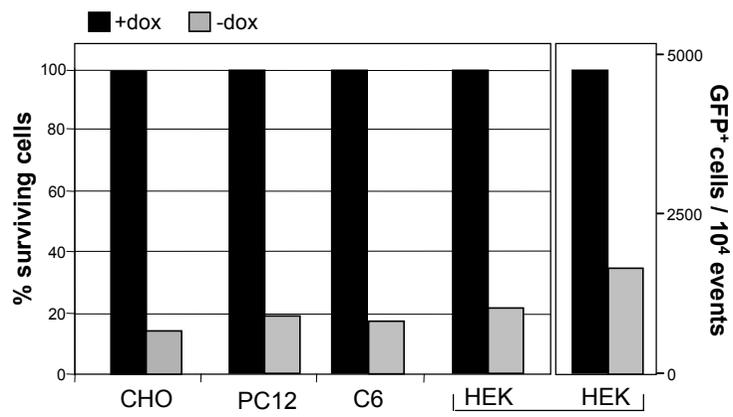
Tetracycline-dependent ablation of two stable *barnase* containing Neuro2A cell clones by P_{CMV} -rtTA, P_{CMV} -tTA and P_{NSE} -tTA. Neuro2A clones A1 and D3 were transfected with 500 ng of regulator construct. 48 hours after transfection either in the presence (+dox) or in the absence (- dox) of inducer, cell numbers were determined by counting 10 independent fields of vision. Cells transfected with the regulator constructs in the uninduced state were taken as 100 % control by definition.

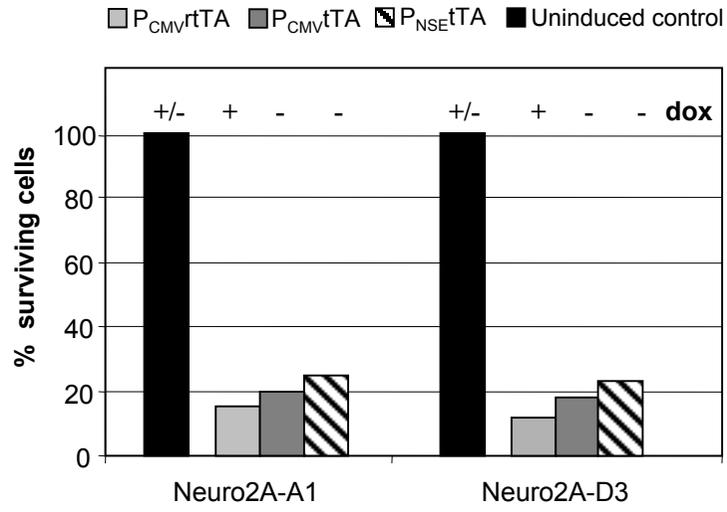
Figure 5:

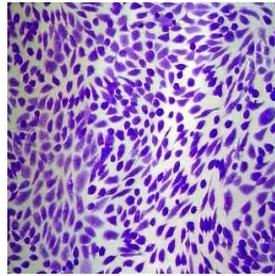
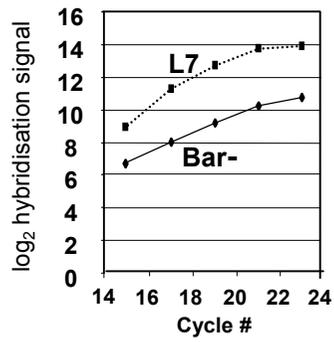
Tetracycline-dependent cell ablation in a CHO cell clone double transgenic for P_{CMV} -tTA and P_{TF} -*barnase*. **A**, Increment of *barnase* and L7 RT-PCR products from RNA of *barnase* expressing CHO cells with total cycle number, quantified as Bio-Imager units. Values are given as binary logarithms. From these data, 18 cycles were chosen for subsequent experiments to ensure maximal sensitivity and linearity of the PCR reaction. **B**, time dependent induction of *barnase* mRNA levels, determined by RT-PCR. Mean values of three independent samples are given as fold-induction of *barnase* (*bar*) mRNA at respective days [d] after dox withdrawal; **C and D**, morphology of a CHO cell clone with stable integrates of P_{TF} -*barnase* and P_{CMV} -tTA cultured either in the presence (+ dox, C), or after withdrawal of dox (-dox, D). showing cells with rounded morphology 11 days after dox withdrawal; Cells were stained with crystal violet. Whereas cells in the presence of dox (C) show normal fibroblast morphology, only some remaining dead cells or cell debris can be seen in D. Scale bar in D, 5 μ m; **E**, Time-dependent cell survival of CHO cells at respective days after tc withdrawal. Note that the drop in cell number is delayed towards maximal *barnase* mRNA induction by 2 days.



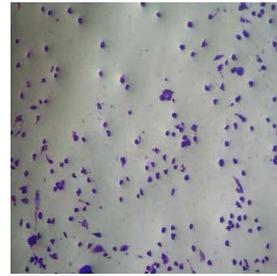




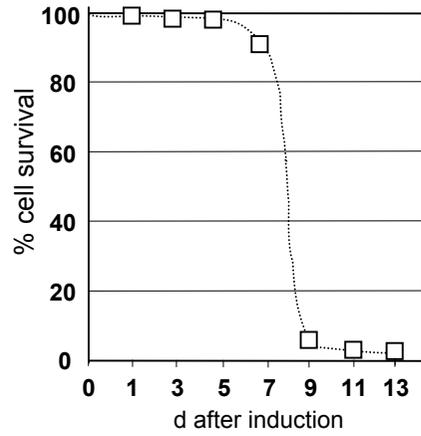
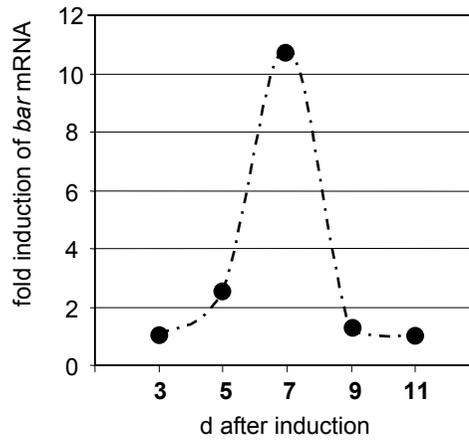




+ dox



- dox



3.2 Untersuchungen zum Barnase-abhängigen Zelltod in Zellkultur

Eine regulierte *barnase*-Expression durch das Tet-abhängige Expressionssystem konnte in Zellkultur erreicht werden (Leuchtenberger et al., 2001).

Auch durch einen neuronenspezifischen Aktivator, dem NSE-tTA (NSE = Neuron Specific Enolase), war eine Induktion und Transkription des *barnase*-Gens in einer doppelt-stabilen neuronalen Neuro2A-Zelllinie nachweisbar (Abb. 3.1, A). Die geringe „Leck-Expression“ der *barnase* im uninduzierten Zustand (tTA = + Dox) konnte durch Induktion (Dox-Entzug) und daraus folgende tTA-Aktivierung um das 2 bis 6-fache gesteigert werden, was für einen Zelltod der CMV-tTA/bar-stabilen Zellen (Klon D7) ausreichte (3.1, B).

Auffallend ist die langsame Kinetik des Zelltods. Die Transkription des *barnase*-Gens erfolgte nach 3 – 5, der Zelltod nach 12 – 21 Tagen Dox-Entzug. Obwohl das Induktionsmuster des Toxins bei NSE-tTA/bar-stabilen Klonen ungefähr dem der CMV-tTA/bar-Klonen entspricht (3.1, A), sterben diese nicht vollständig ab. Interessant und ungeklärt ist der Mechanismus des Zelltods, der durch die Barnase in diesen Zellklonen ausgelöst wird. Die Zellen vertragen scheinbar bis sie absterben einen gewissen Schwellenwert oder eine bestimmte Zeit einen gewissen Schwellenwert der bakteriellen RNase. Um den Mechanismus des Zelltods näher zu charakterisieren wurde die Reaktion der Zellen auf die induzierte Expression des Toxingens durch verschiedene Methoden dargestellt.

3.2.1 Veränderungen der Zellmorphologie in Abhängigkeit der *barnase*-Induktion

Sowohl in NSE-tTA/bar-stabilen Neuro2A-Zellen als auch D7-Zellen wurde durch Dox-Entzug eine *barnase*-Expression induziert und die Zellen an verschiedenen Zeitpunkten morphologisch untersucht. In Hellfeld-Aufnahmen des Neuro2A-Klons (Abb. 3.2, A, B) und des Klons D7 (Abb. 3.2, C, D, F) wurde jeweils 5-10 Tage nach Dox-Entzug eine ähnliche Veränderung der Morphologie bei beiden Zelltypen beobachtet: Intrazellulär befanden sich viele bläschenartige Strukturen, Vakuolen, die verstärkt um den Zellkern lokalisiert waren. Der Zellkern war in einigen Stadien stark aufgebläht (Abb. 3.2, B, F), während er in anderen klein, pyknotisch und das Chromatin stark kondensiert war, wie durch eine Bisbenzimid-Färbung dargestellt (Abb. 3.2, F). Eine Acridinorange-Färbung sollte Aufschluss darüber geben, ob sich die Verteilung und/oder die Menge der RNA durch Wirkung der bakterielle RNase verändern. Die Anfärbung von Ribonukleinsäuren durch Acridinorange (Abb. 3.2, E) zeigte, dass sich in lichtdichten Strukturen im Zytoplasmama der dargestellten Zelle RNA-Ansammlungen befanden (Abb. 3.2, E, E'). Diese Strukturen ließen sich von den ebenfalls gefärbten Nucleoli abgrenzen. Es war

auffällig, dass sich die Zellen eines Klons nach zeitgleicher Induktion in unterschiedlichen Stadien der morphologischen Veränderung befanden (Abb. 3.2, B, F).

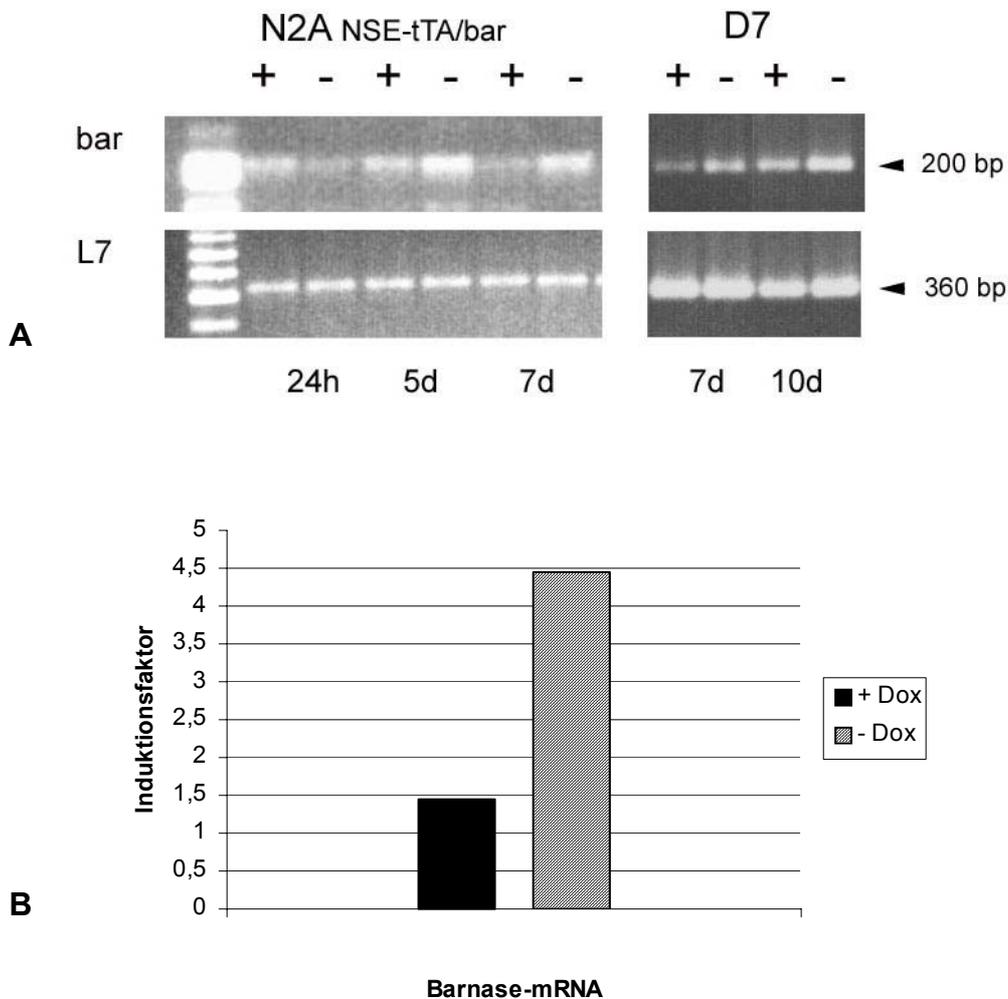


Abb. 3.1: *Barnase*-Expressionsanalysen doppelt-stabiler Zelllinien.

(A), RT-PCR-Analyse von neuronalen Neuro2A NSE-tTA/*bar*- und CHO CMV-tTA/*bar*-stabilen Zellen (Klon D7) nach verschiedenen Induktions-Zeiten. Der doppelt-stabile Neuro2A-Klon zeigte 5 d nach Induktion (- Dox) eine erhöhte *bar*-Expression. Zum Vergleich ist die induktionsabhängige *bar*-Expression der D7-Zellen an Tag 7 und 10 dargestellt. In beiden Zelllinien wurde auch im uninduzierten Zustand (+ Dox) eine basale *bar*-Expression festgestellt. Als Mengenreferenz diente das ubiquitär exprimierte ribosomale Protein L7.

(B), Realtime-PCR induzierter (- Dox) und nicht induzierter (+ Dox) D7-Zellen. Eine 3-fache Induktion im Vergleich zur basalen *bar*-Expression uninduzierter Zellen konnte gemessen werden und führte zum Zelltod. Die induzierte *bar*-Expression wird als Induktionsfaktor im Vergleich zur Basalexpression (= 1) angegeben (Berechnung s. Kap. 2.5.7).

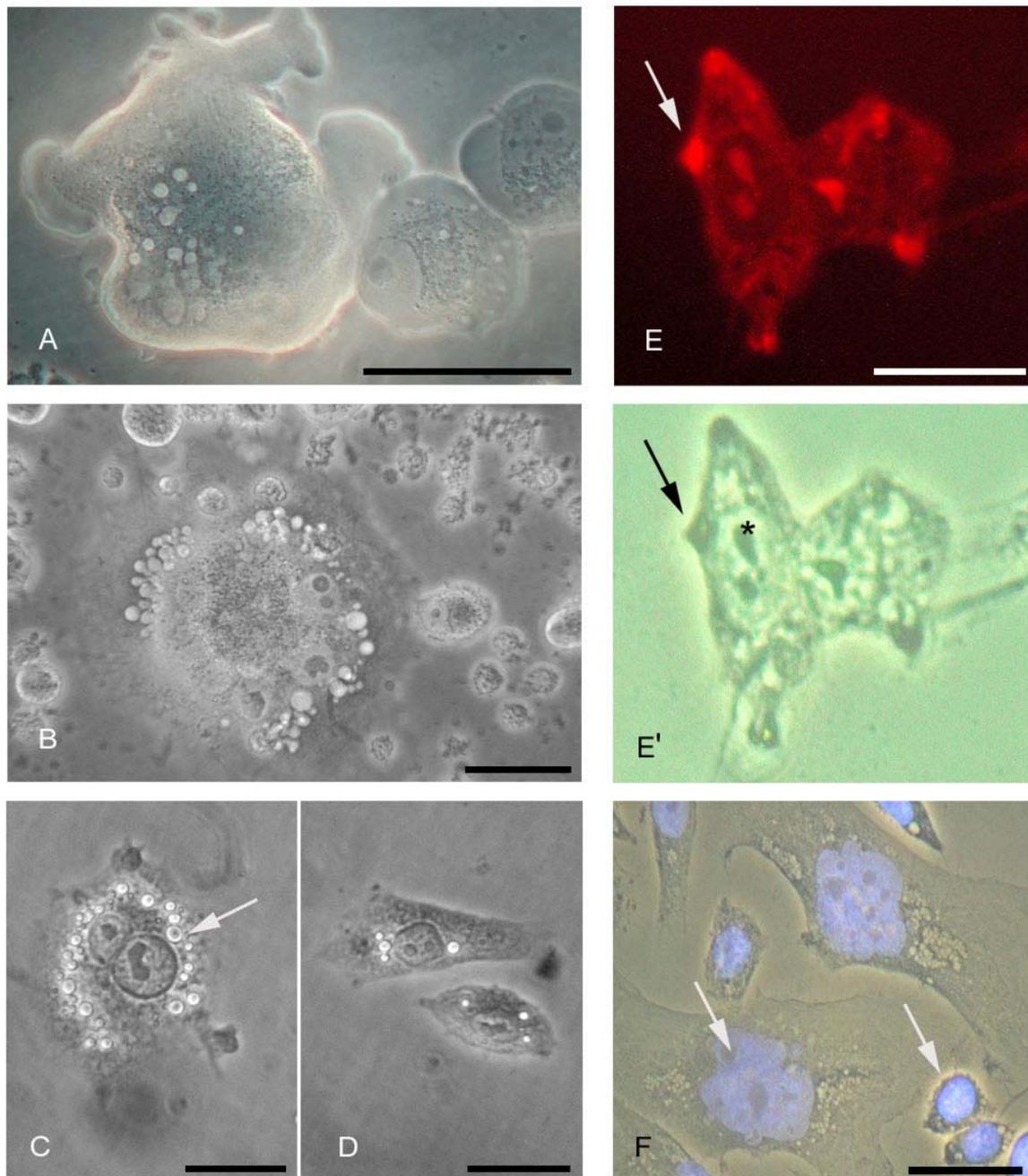


Abb. 3.2: Darstellung morphologischer Veränderungen von D7- und neuronalen NSE-tTA/bar-stabilen Zellen nach *barnase*-Induktion.

Die Hellfeld-Aufnahmen induzierter stabiler neuronaler Neuro2A- (A, B) und D7-Zellen (C, D) zeigten 5–10 d nach Induktion (- Dox) deutliche zytoplasmatische Vakuolisierungen. Durch Bisbenzimid-Färbung wurden zusätzlich Zellkerne dargestellt, wobei vergrößerte sowie pyknotische, kondensierte Kerne beobachtet wurden (F). Durch Acridinorange-Färbung wurde RNA von induzierten D7-Zellen dargestellt (E), der Hellfeld-Vergleich ist in (E') gezeigt. Es waren RNA-Akkumulationen zu erkennen, die nicht den Nucleoli entsprachen (* = Nucleoli). Maßstab: 20 μm (A – F).

3.2.2 Ultrastrukturelle Veränderungen der Zelle nach *barnase*-Induktion

Nach den mikroskopisch sichtbaren Veränderungen der induzierten Zellen wurden diese zusätzlich elektronenmikroskopisch untersucht. Nicht induzierte und durch Dox-Entzug induzierte Zellen des Klons D7 wurden nach 6 Tagen für die Darstellung im Elektronenmikroskop fixiert und kontrastiert. Als Kontrolle wurden *barnase*-freie aber tTA - exprimierende Zellen, die mit Dox behandelte wurden, mitgeführt. Die den Aktivator konstitutiv exprimierenden Zellen zeigten keine veränderte Ultrastruktur (Abb. 3.3, A), die nicht induzierten doppelt-stabilen D7-Zellen geringe ultrastrukturelle Veränderungen (Abb. 3.3, B). Hier wurden einzelne elektronendichte Strukturen im Zytoplasma beobachtet.

Nach Dox-Entzug und folgender Induktion der bakteriellen RNase zeigten Zellen des Klons D7 eine große Anzahl elektronendichter Strukturen (Abb. 3.3, C). Eine höhere Vergrößerung zeigte, dass diese Strukturen lammelenartig aufgerollt waren, was auf Membranstapel hindeutet (Abb. 3.3, C'). Das Erscheinungsbild dieser Strukturen und das Bestehen aus Membranschichten deuten darauf hin, dass es sich um Autophagosomen, eine bestimmte Form von Lysosomen, handelt. Es wird angenommen, dass Autophagosomen (defekte, störende) zelluläre Strukturen verdauen und so aus der Zelle entfernen. Autophagosomen sind an Vorgängen des programmierten Zelltod von Zellen beteiligt und sind in degenerierenden Zellen zu beobachten (Larsen und Sulzer, 2002). Die einzelnen elektronendichten Strukturen der nicht induzierten Zellen (Abb., 3.3, B) können auf die „Leck-Expression“ der *barnase* zurückzuführen sein, die auf Transkriptionsebene beobachtet wurde.

3.2.3 Induktion des *barnase*-Gens führt zu Stressreaktionen der Zellen

Hinweise auf Stressreaktionen der *barnase*-induzierten Zellen durch veränderte Expression von Hsp70 und Ubiquitin

Um die Reaktionen der induzierten Zellen auf die *barnase*-Expression näher zu untersuchen, wurden Expressionsanalysen mit ausgewählten „Stress-Markern“ durchgeführt. Die Veränderung der Hsp70- und der Ubiquitin-Expression auf Transkriptionsebene von induzierten (Dox-Entzug) und nicht induzierten D7-Zellen wurde an verschiedenen Zeitpunkten untersucht (Abb. 3.4). Mit Staurosporin behandelte apoptotische Hela-Zellen wurden als Stresskontrolle verwendet.

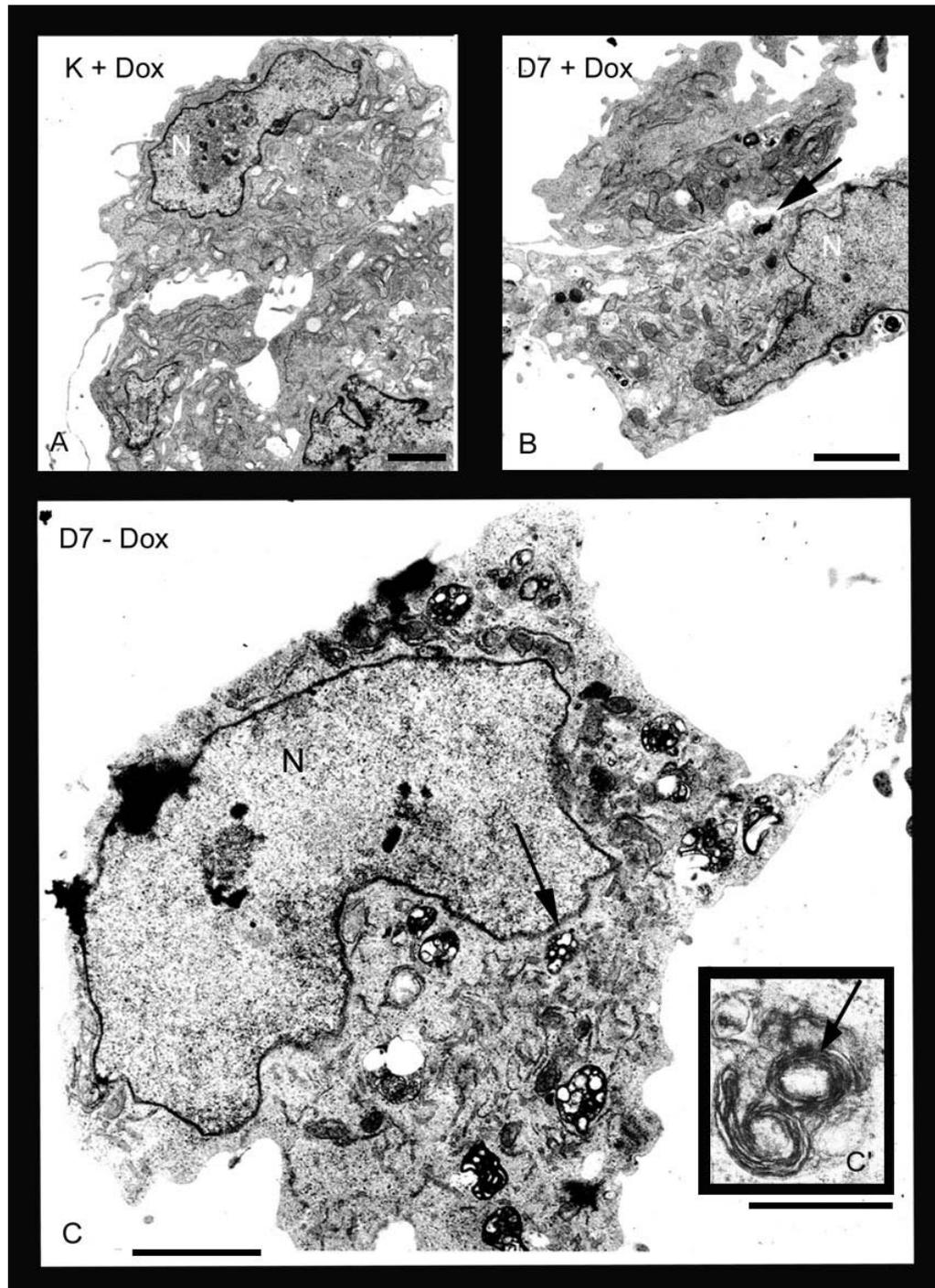


Abb. 3.3: Elektronenmikroskopische Aufnahmen von induzierten D7-Zellen.

Die Kontrollen, unter Dox kultivierte einfach rtTA-stabile Zellen und nicht induzierte D7-Zellen, sind in (A) und (B) dargestellt. Die durch Dox-Entzug induzierten Zellen (6d; C) zeigten deutliche ultrastrukturelle Veränderungen im Zytoplasma; in der Vergrößerung (C') werden die lamellenartigen Membran-Stapel der auffälligen Strukturen sichtbar. Diese Lamellenstruktur ist charakteristisch für Autophagosomen, spezielle Lysosomen. Die Aufnahmen am Elektronenmikroskop (EM) wurden freundlicherweise von Dr. Peter Heimann und Renate Piwek, Universität Bielefeld, erstellt. Maßstab: 2,2 μm (A); 1,6 μm (B); 2,3 μm (C), 0,5 μm (C').

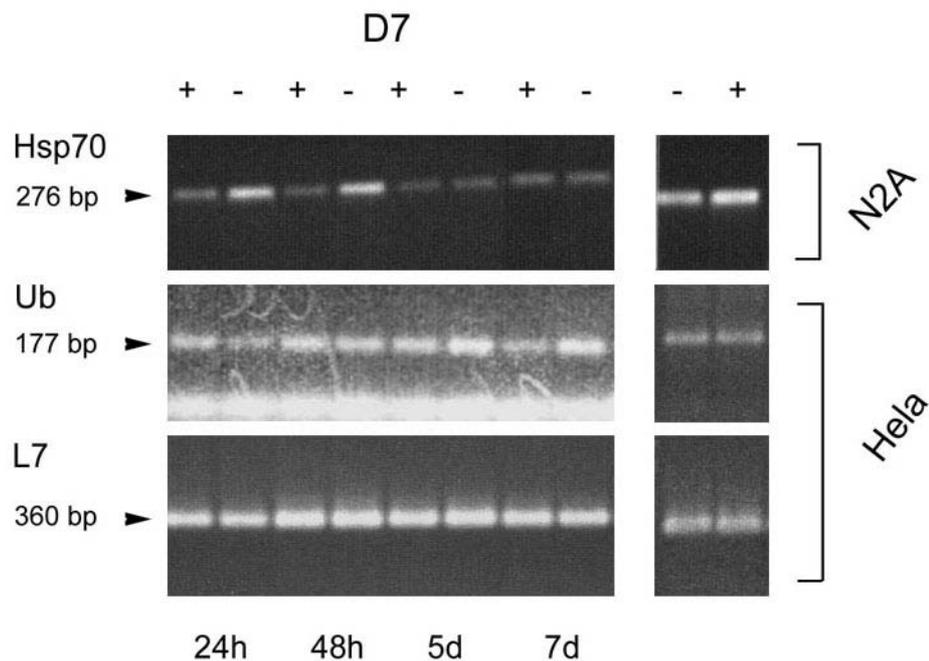


Abb. 3.4: Hsp70- und Ubiquitin-Expression als „Stressindikatoren“ induzierter D7-Zellen.

Die Hsp70- und Ubiquitin-Expressionsunterschiede induzierter (- Dox) und nicht induzierter (+ Dox) D7-Zellen wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten durch spezifische RT-PCR dargestellt. Neuro2A-Zellen nach Hitzeschock (1 h, 42 °C) wurden als Positiv-Kontrolle für Hsp-Primer verwendet (+). Staurosporin-induzierte HeLa-Zellen (+), 24 h nach Stimulation lysiert, sollten als „Stress-Vergleich“ dienen. Eine Steigerung der Hsp70-Expression 24 h und 48 h nach Induktion wurde beobachtet, ebenso eine zeitlich verzögerte Steigerung der Ubiquitin-Expression induzierter D7-Zellen. Die Amplifikation der cDNA erfolgte bei Hsp70 mit 22, bei Ubiquitin mit 30 Zyklen. Als Mengen-Referenz wurde das ribosomale Protein L7 verwendet.

Staurosporin ist ein Proteinase-C-Hemmer und führt direkt zum apoptotischen Zelltod (Yamamoto et al., 1992). Die Zellen wurden nach der angegebene Zeit lysiert, die RNA isoliert und eine reverse Transkription durchgeführt. Da Zellen Hsp70 und Ubiquitin konstitutiv exprimieren, wurden auf Expressionsveränderungen im Zusammenhang mit der *barnase*-Induktion geachtet.

24 Stunden nachdem den D7-Zellen Dox entzogen wurde, ist eine Erhöhung der Hsp70-Expression im Gegensatz zu den weiterhin unter Dox kultivierten Zellen des Klons zu erkennen (Abb. 3.4). Nach 5 Tagen wurde zwischen beiden Zuständen kein Unterschied mehr beobachtet. Als Positiv-Kontrolle wurden Neuro2A-Zellen einem Hitzeschock ausgesetzt (1 h, 42 °C). Der Hitzeschock führte zu einer gesteigerten Hsp70-Expression, so wie auch der Dox-Entzug der *barnase*/Aktivator-stabilen Zellen.

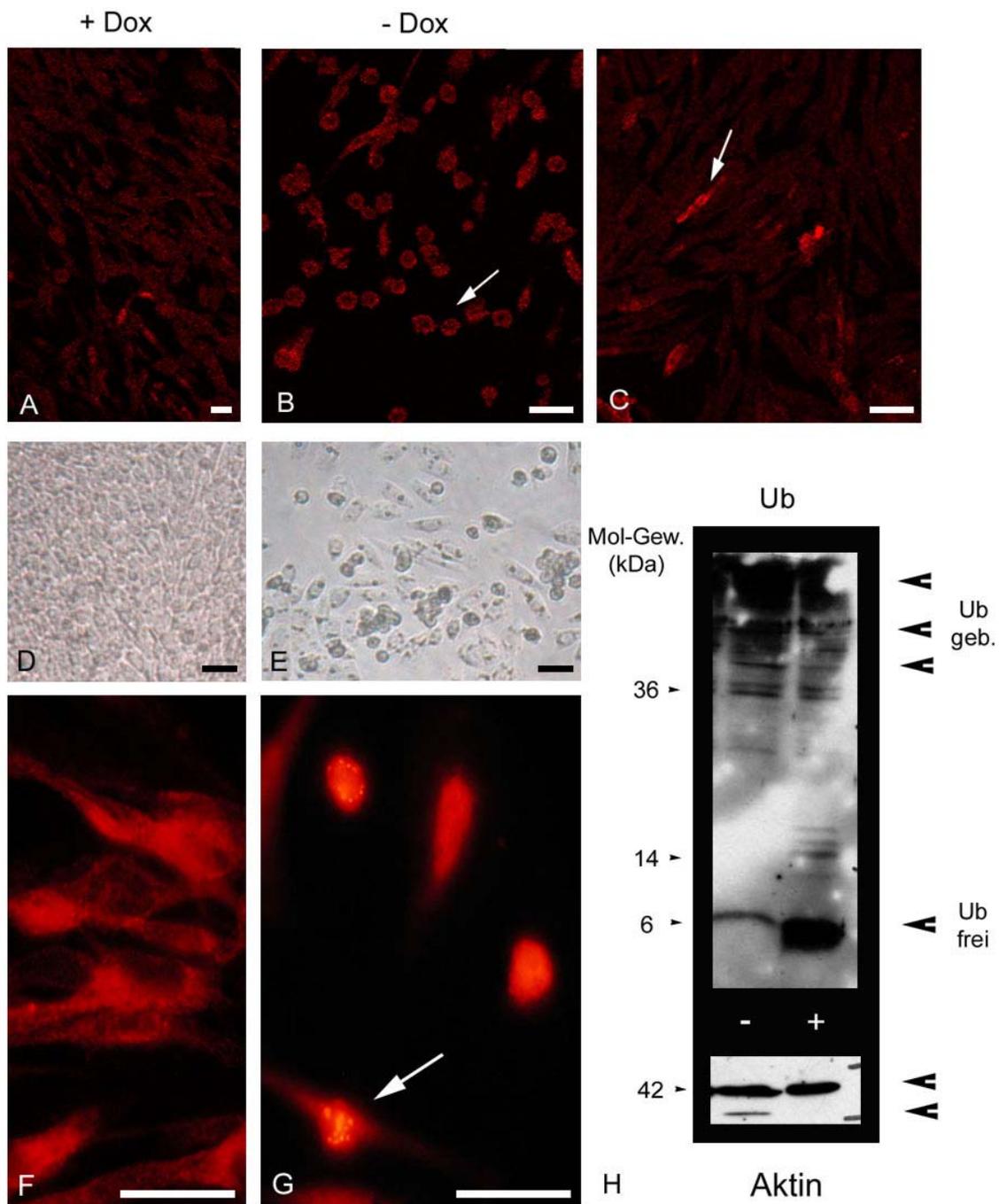


Abb. 3.5: Hsp70- und Ubiquitin-Veränderungen induzierter D7-Zellen auf Proteinebene.

Hsp70-Immunfärbungen nicht induzierter (A) und 10 d induzierter Zellen (B) sind im Vergleich dargestellt. Um eine Stresssituation und darauf folgende Reaktion darzustellen, wurden nicht induzierte Zellen einem Hitzeschock (1 h, 42 °C) ausgesetzt (C). Parallele Hellfeld-Aufnahmen zeigten die unterschiedliche Vitalität und Proliferation der Zellen in Abhängigkeit von der Induktion (D, E). Die Ubiquitin-Immunfärbung von Zellen beider Zustände (+ Dox; - Dox) zeigte eine Verlagerung des Ubiquitins in den Zellkern induzierter Zellen (F, G); es waren stark markierte Regionen im Zellkern zu erkennen. Als 2. Antikörper wurden Cy3-gekoppelte anti-maus (Hsp70)- und anti-rabbit (Ub)-IgG verwendet. Der Westernblot von D7-

Zellextrakten (H), zeigte eine deutliche Verringerung des Anteils an freien und eine Zunahme an gebundenem Ubiquitin induzierter Zellen. D7-Zellextrakte wurden nach 17 d Dox-Entzug hergestellt; es wurden jeweils 3 µg Protein auf das 15 % SDS-Gel aufgetragen. Als Mengenreferenz diente eine G-Aktin-Antikörper-Färbung desselben Blots. Maßstab: 20 µm (A – G).

Auch die Ubiquitin-Expression der D7-Zellen wird durch Induktion verändert. Erst 5 Tage nach Dox-Entzug und so fast parallel mit der ersten gesteigerten Erhöhung der *barnase*-Expression (s. Abb. 3.1, A), wurde vermehrt Ubiquitin exprimiert (Abb. 3.4). Es wurde deutlich, dass die Zellen schnell auf die Induktion durch erhöhte Hsp70-Expression reagierten, die Stressreaktion später von einer verstärkten Ubiquitin-Expression gekennzeichnet war. Die Staurosporin-stimulierten Hela-Zellen zeigten nach 24 h keine gesteigerte Hsp70-Expression; der gut untersuchte apoptotische Zelltod durch Staurosporin zeigte im Hinblick auf diesen Stress-Indikator keine Ähnlichkeit zu *barnase*-induzierten Zellen.

Weiterhin wurde untersucht, ob die mRNA-Expressionsunterschiede von Hsp70 und Ubiquitin auch zu immunzytochemisch detektierbaren Unterschieden führte. Untersucht wurden induzierte und nicht induzierte *barnase*/Aktivator-stabile Zellen. 10 Tage nach *barnase*-Induktion durch Dox-Entzug wurden die Zellen fixiert, permeabilisiert und mit den entsprechenden Antikörpern inkubiert. Als Vergleich dienten immer unter Dox kultivierte D7-Zellen.

In uninduzierten Zellen war Hsp70 gleichmäßig im Zytoplasma verteilt (Abb. 3.5, A). Nach Induktion war die Intensität der Hsp70-Immunfärbung nicht eindeutig erhöht, aber eine Lokalisation des Hsp70 in der Nähe des Zellkerns wurde beobachtet (Abb. 3.5, B). Diese Beobachtung kann mit den allgemeinen morphologischen Veränderungen der gestressten Zellen in Zusammenhang gebracht werden (Abb. 3.5, E). Als Positiv-Kontrolle für die Veränderung des Hsp70 unter Stress wurden D7-Zellen einem Hitzeschock ausgesetzt (1 h, 42 °C) und ebenfalls eine Hsp70-Antikörperfärbung durchgeführt (Abb. 3.5, C). Hier waren einige stärker Hsp70-markierte Zellen zu erkennen, wobei das Hsp70 zytoplasmatisch lokalisiert und die Zellmorphologie nicht verändert war.

Die Ubiquitin-Markierung zeigte einen deutlichen Unterschied zwischen den beiden Zuständen + Dox und – Dox (Abb. 3.5, F, G). Während Ubiquitin in den uninduzierten Zellen gleichmäßig über die Zelle verteilt war (Abb. 3.5, F), akkumulierte es in den induzierten Zellen stark im Kern. Dort ließen sich außerdem stärker angefärbte Regionen erkennen.

Der Western-Blot (Abb. 3.5, H) zeigte eine deutliche Veränderung der Ubiquitin-Bandenmuster in Abhängigkeit der Induktion. In dem Zellextrakt der induzierten D7-Zellen war 17 Tage nach Dox-Entzug weniger freies Ubiquitin vorhanden, die entsprechende Bande hatte im Blot stark

abgenommen. Im Vergleich zu den nicht induzierten D7-Zellen war eine Zunahme der oberen Banden, die konjugiertes Ubiquitin darstellen, zu erkennen. Ein weiterer Hinweis auf einen degenerativen Zustand der induzierten D7-Zellen ist die beginnende Degradation des Aktins. In dem langsamen Prozess der zum Zelltod führt scheinen Veränderungen in Ubiquitin-abhängigen Mechanismen eine große Rolle zu spielen. Die Akkumulation von Ubiquitin im Zellkern und die gleichzeitige Verringerung des freien Ubiquitin deuten auf verstärkte Ubiquitin-Markierung von Proteinen im Zellkern hin.

3.2.4 Apoptosenachweis induzierter D7-Zellen

Um den Mechanismus des Zelltods näher zu charakterisieren wurde untersucht, ob es sich um apoptotische oder nekrotische Vorgänge handelt. Ein experimenteller Nachweis für Apoptose ist die Darstellung aktiver Caspase 3. Der verwendete Antikörper erkennt nur die gespaltene, proteolytisch aktive Form der Caspase 3, die eine Effektor-Protease am Ende der Hierarchie apoptotischer Prozesse darstellt.

D7-Zellen wurden 7 Tage nach Dox-Entzug fixiert, permeabilisiert und ü.N. bei 4 °C mit dem Caspase 3-Antikörper inkubiert. Zusätzlich wurden die Kerne der Zellen mit Bisbenzimid dargestellt (Abb. 3.6).

Die induzierten D7-Zellen zeigten apoptotische Kerne und Caspase 3-positive Anfärbungen (Abb. 3.6, A). In Übersichten waren mehrere Ansammlungen apoptotischer Zellen zu finden. Die zytoplasmatische Lokalisation der aktiven Caspase 3 ist in (B) dargestellt. Hela-Zellen, die durch Staurosporin induziert apoptotisch sterben, dienten als Positiv-Kontrolle des Antikörpers. Die stimulierten Hela-Zellen zeigten nach 24 h sowohl apoptotische, fragmentierte Kerne, als auch Caspase 3-Aktivität (Abb. 3.6, C). Das Auftreten der apoptotischen Kernmorphologie führte jedoch nicht zwangsläufig zu einer zusätzlichen Caspase 3-Markierung, wodurch deutlich wurde, dass die aktivierte Caspase 3 nur eine Momentaufnahme innerhalb der Apoptosemechanismen darstellt.

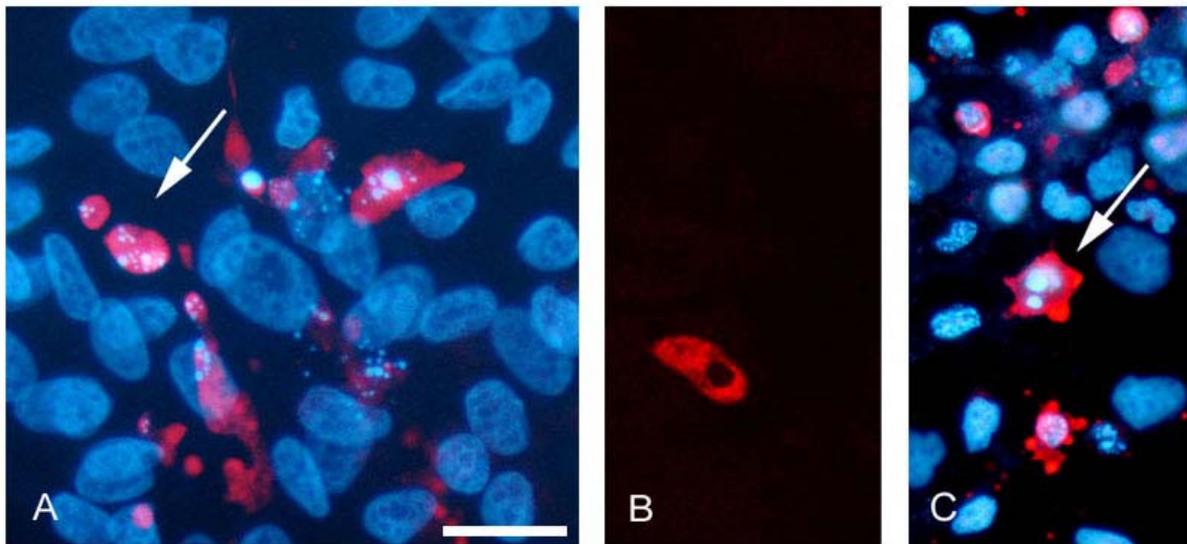


Abb. 3.6: Nachweis von Apoptose durch Caspase-3-Immunfluoreszenzfärbung induzierter D7-Zellen.

7 d nach *bar*-Induktion durch Dox-Entzug wurden apoptotische Zellen durch Caspase-3-Immunfluoreszenzfärbung nachgewiesen (A). Auch in der Zellkern-Darstellung durch Bisbenzimid wurde eine apoptotische Kernmorphologie deutlich; die zytoplasmatische Lokalisation der aktivierten Caspase 3 wird in (B) dargestellt. Als Positiv-Kontrolle des Antikörpers dienten Staurosporin behandelte apoptotische Hela-Zellen (C). Als 2. Antikörper wurden Cy3-gekoppelte anti-rabbit-IgG verwendet.

Maßstab: 20 μm (A – C).

3.3 Analyse von Aktivator- und *barnase*-transgenen Mäusen

Um die Anwendbarkeit der *barnase* unter der Kontrolle des Tet-Expressionssystem im Organismus (*in-situ*) zu testen, wurden *barnase*-transgene Tiere hergestellt. Diese wurden mit Aktivator-transgenen Tieren verpaart, um doppelt-transgene Mäuse zu züchten, die beide Komponenten des Expressionssystems in ihrem Genom beinhalten. Durch Dox-Applikation sollte der konstitutiv exprimierte Aktivator aktiviert und eine Expression der *barnase* induziert werden.

3.3.1 *Barnase*-transgene Tiere sind vital

Barnase-transgene Mäuse wurden durch Pronukleus-Injektion des TF-*barnase*-Konstruktes (Sequenz s. Anhang) in CD 1-Mäuse, durchgeführt von Sandra Heising, Universität Bielefeld, erzeugt. Zwei Founder-Tiere (1* und 33*) wurden für die Weiterzucht verwendet, um mögliche Integrationseffekte ausschließen zu können. Beide Linien zeigten keine offensichtliche Beeinträchtigung durch das Transgen und züchten unproblematisch. Trotz einer vorhandene „Leckexpression“ der *barnase*, in einigen Geweben durch RT-PCR schwach detektierbar, zeigen die Mäuse zunächst keine offensichtlichen, gesundheitlichen Beeinträchtigungen. In höherem Lebensalter (> 1 Jahr) kommt es im Vergleich zu nicht transgenen Tieren vermehrt zu Erkrankungen und Todesfällen.

Transgen	Anzahl (n)	≤ 1Jahr	≥ 1 Jahr
Bar (1*/33*)	48	100 %	71 %
CMV/ <i>bar</i> (1*/33*)	20	95 %	80 %
GFAP/ <i>bar</i> (1*/33*)	17	100 %	77 %

Tab. 3.1: Vergleich der Überlebensrate von verschiedenen *barnase*-transgenen Mauslinien.

Bei allen *barnase*-transgenen Linien wurden erst bei einjährigen und etwas älteren Tieren gehäuft Erkrankungen und spontane Todesfälle beobachtet.

3.3.2 Doppelt-transgene Mäuse: *CMV-rtTA/bar* und *GFAP-rtTA/bar*

Doppelt-transgene Tiere (Aktivator- und *barnase*) wurden durch Verpaarung mit zwei unterschiedlichen Aktivator-Linien erhalten (*CMV-rtTA*; *GFAP-rtTA*).

Die Aktivator-Expression der *CMV-rtTA*-transgenen Mäuse wurde bereits durch Reporterstudien charakterisiert (Kistner et al., 1996). Durch den viralen Promotor wird der Aktivator in vielen Geweben unterschiedlich stark exprimiert. Durch Kreuzung dieser Aktivator-Tiere mit *barnase*-transgenen Mäusen sollte die Anwendbarkeit der Barnase innerhalb des Tet-Expressionssystems *in-situ* getestet werden.

Ferner wurden auch *GFAP-rtTA-transgene* Mäuse mit *barnase*-transgenen Tieren verpaart. Die *GFAP-rtTA*-Tiere exprimieren den rtTA unter der Kontrolle eines humanen GFAP-Promotors (hGFAP = Glia Fibrillar Acidic Protein), dessen Astrozyten-Spezifität in Reporterstudien gut charakterisiert (Besnard et al., 1991; Masood et al., 1993; Brenner et al. 1994) und seine selektive, fast ausschließlich astrozytenspezifische Aktivität in Promotor-Studien gezeigt wurde (Brenner und Messing, 1996; Nolte et al., 2001). In Vergleichen von Antikörperfärbungen des astrozytären Intermediärfilamentes und GFP-Markierungen (*Green Fluorescent Protein*) hGFAP-GFP-transgener Mäuse, wurde, bis auf einige Ausnahmen, ein Ko-Lokalisation der Proteine und eine astrozytenspezifische Repräsentation festgestellt (Nolte et al., 2001).

In dieser Studie sollte herausgefunden werden, ob die Expression eines astrozytenspezifischen Aktivators für eine Induktion der Barnase ausreicht und welche Auswirkungen die Expression der bakterielle RNase auf Astrozytenpopulation und die vernetzten Zellen haben kann.

Aktivator- und *barnase*-transgene Tiere zeigten in den meisten Fällen im Vergleich zu den *barnase*-transgenen Mäusen keine Veränderung bezüglich der Lebenszeit und Zucht.

3.3.3 Induktion von Primärfibroblasten *CMV-rtTA/bar*-transgener Mäuse führt zur *barnase*-Expression und zum Absterben der Primärzellen

Um die Aktivierbarkeit der Barnase in Zellen *CMV-rtTA/bar*-transgener Mäuse (im weiteren Verlauf: *CMV/bar*) zu testen, wurden Primärfibroblasten aus dem Bauchfell isoliert und kultiviert. Die Induktion erfolgte, da es sich um den reversen Aktivator handelte, durch Hinzufügen von Dox in das Kulturmedium. Eine vorher an nicht transgenen Primärfibroblasten durchgeführte Doxizylin-Toxizitätsreihe zeigte, dass Dosierungen über 4 µg/ml die Zellen in ihrer Proliferation und Vitalität beeinträchtigten. Nach Zugabe von 4 µg/ml Dox zu Transgen- sowie Wildtyp-Primärkulturen wurden diese nach 6 und 48 Stunden lysiert, die RNA isoliert und die cDNA nach reverser Transkription auf *barnase*-Transkript mittels spezifischer PCR untersucht.

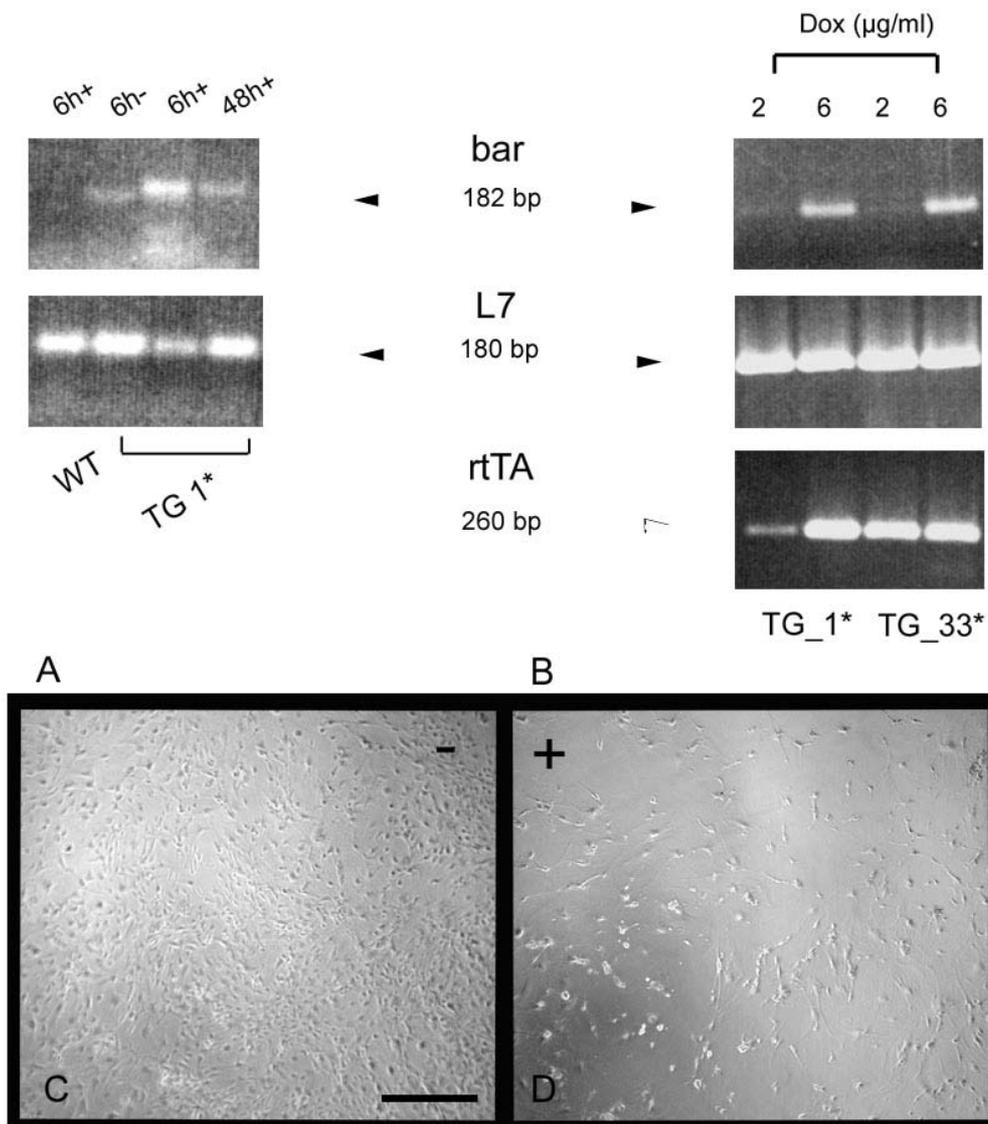


Abb. 3.7: *Barnase*-Expression und induziertes Absterben *CMV/bar*-transgener Primärfibroblasten.

(A), RT-PCR-Analyse der *bar*-Expression von *CMV/bar*-transgenen Primärfibroblasten, 6 bzw. 48 h nach Dox-Zugabe (4 µg/ml). (B), Durch Erhöhung der Dox-Konzentration konnte die *bar*-Expression bei gleichbleibender Expression des konstitutiv exprimierten Transaktivators (rtTA) noch gesteigert werden, obwohl Konzentrationen > 4 µg/ml die Vitalität der Primärzellen beeinträchtigten. Als Mengenreferenz diente die L7-Amplifikation der jeweils gleichen Menge cDNA. Die Hellfeld-Aufnahmen (C, D) zeigen den induzierten Zelltod durch Dox-Zugabe (4 µg/ml) nach 7d. Maßstab: 100 µm (A, B).

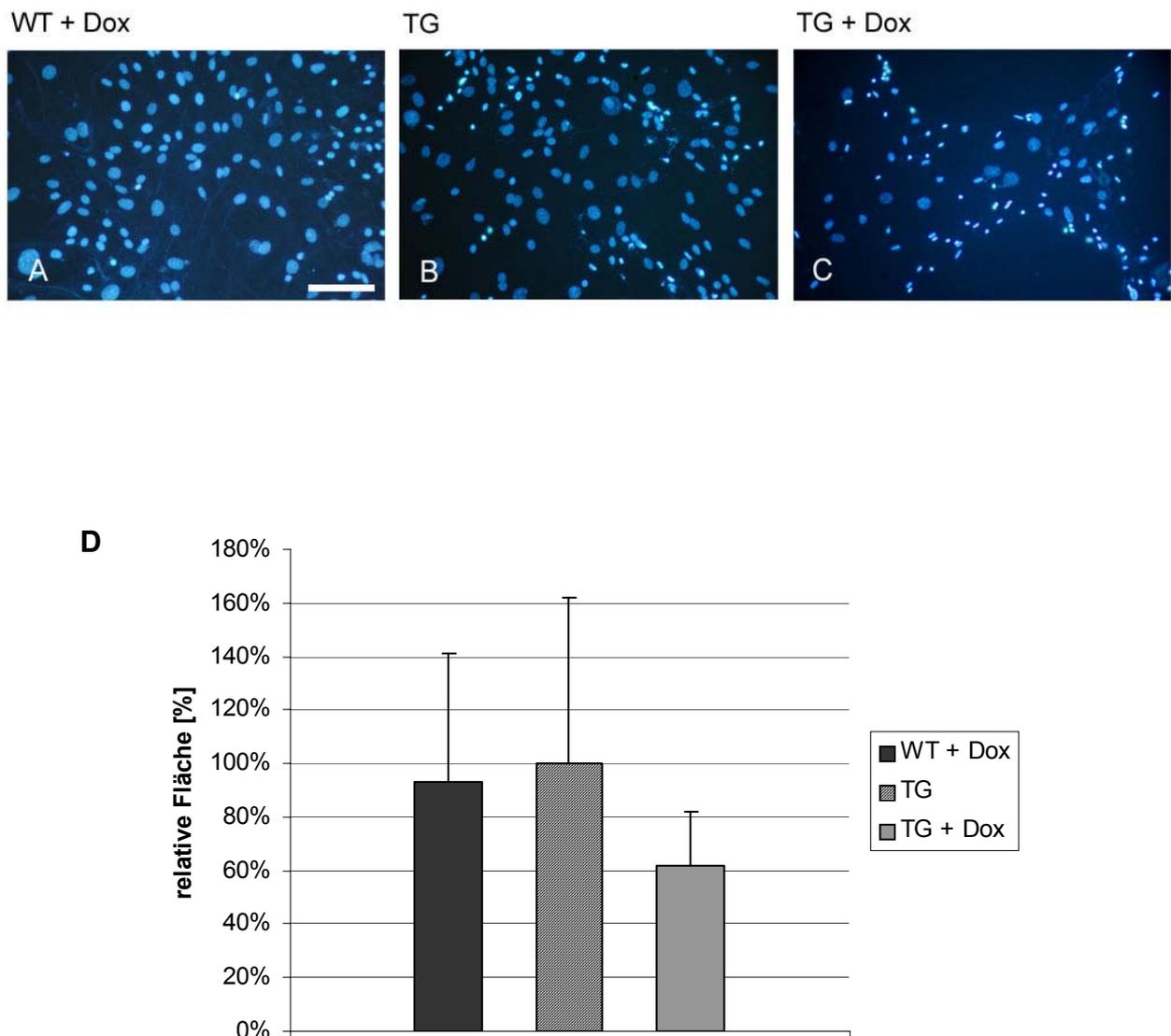


Abb. 3.8: Veränderte Kernmorphologie induzierter *CMV/bar*-transgener Primärzellen.

Bisbenzimid-Färbung von Wildtyp (A), transgenen (B) und transgenen induzierten Zellen (C). Zur Kontrolle wurden WT-Fibroblasten mit Dox (4 $\mu\text{g/ml}$) kultiviert, es wurde keine Veränderung der Zellkerne beobachtet (A). 7 d nach Induktion transgener Primärzellen durch Dox (4 $\mu\text{g/ml}$) waren kleine, pyknotische Kerne und kondensiertes Chromatin (C) zu erkennen, bei nicht induzierten (- Dox) transgenen Primärzellenzellen dagegen nur vereinzelt (B). (D), graphische Darstellung der Abhängigkeit zwischen veränderter Kernmorphologie und *bar*-Induktion. Dazu wurde die Fläche von 800 – 1000 Kernen je Bildausschnitt bestimmt (Software: Image G) und die Mittelwerte von Wildtyp-, transgenen- und induzierten transgenen Zellkernen verglichen. Der höchste Wert wurde als 100 % definiert; die Standardabweichung ist angegeben. Maßstab: 50 μm (A – C).

Während die Wildtyp-Primärzellen erwartungsgemäß keine Expression zeigten, war eine schwache *barnase*-Expression in den nicht induzierten transgenen Primärzellen zu erkennen (Abb. 3.7, A), was auf eine niedrige „Leck-Expression“ zurückzuführen ist. Die Induktion durch Dox-Gabe führt nach 6 Stunden zu einer gesteigerten *barnase*-Expression (Abb. 3.7, A). Die Expression wird nach 48 Stunden schwächer. Eine Steigerung der *barnase*-Expression ist durch erhöhte Dox-Gabe bei *CMV/bar*-Primärfibroblasten beider Founder-Linien möglich (Abb. 3.7, B). Im Gegensatz zur Induktion mit 4 µg/ml zeigten die Zellen bei 6 µg/ml früher Beeinträchtigungen ihrer Vitalität. Dieser Effekt wurde bei höheren Dox-Dosierungen auch bei Wildtyp-Primärzellen beobachtet und kann auf eine zytotoxische Wirkung des Dox zurückgeführt werden. Der kurze Zeitraum zwischen Induktion und *barnase*-Transkription der Primärzellen im Vergleich zu den stabilen Klonen ergibt sich durch die schnellere Kinetik des rtTA. Bei der Aktivierung des tTA durch Dox-Entzug muss die Latenzzeit bis zum Entfernen des Dox aus der Zelle berücksichtigt werden.

Die induzierten *CMV/bar*-Primärzellen sterben in einem Zeitraum von 5 - 7 Tagen; auch hier ist die Reaktion auf die *barnase*-Expression heterogen, denn selbst nach der genannten Zeitspanne bleiben noch vitale Zellen zurück. Im Vergleich der Zustände – Dox und + Dox (Abb. 3.7, C, D) wird deutlich, dass nach Induktion der Barnase durch Dox-Gabe ein Grossteil (80 - 90 %) der transgenen Zellen abstarben und dass ein regulierter Zelltod der transgenen Primärzellen durch die induzierte Expression der bakteriellen RNase durch das Tet-Expressionssystem möglich war.

3.3.4 Das Absterben induzierter transgener Primärzellen korreliert mit Veränderungen der Kernmorphologie

Zur Beobachtung der Kernmorphologie wurden *CMV/bar*-Primärfibroblasten nach 7-tägiger Inkubation in 4 µg/ml Dox-haltigem Medium fixiert und die Kerne durch Bisbenzimid dargestellt. Um eine Zytotoxizität des Dox auszuschließen, wurden Wildtyp-Primärfibroblasten unter Dox kultiviert; als Kontrolle dienten zusätzlich transgene Primärzellen die ohne Dox kultiviert wurden. Trotz des antibiotikahaltigen Mediums waren Wildtyp-Zellen nicht in ihrer Vitalität beeinträchtigt und die Kerne unauffällig (Abb. 3.8, A). Die nicht induzierten transgenen Primärzellen zeigten größtenteils runde Zellkerne wie der Wildtyp, aber im Vergleich zu nicht transgenen Zellen war eine höhere Anzahl kleiner Kerne zu erkennen (Abb. 3.8, B). Die induzierten transgenen Primärzellen zeigten dagegen eine große Anzahl kleiner, pyknotischer, stark kondensierter Zellkerne, allerdings waren nicht allen Kerne betroffen (Abb. 3.8, C). Der Unterschied der Zellkerngrößen in Abhängigkeit der Induktion wurde auch quantitativ erfasst und graphisch dargestellt (Abb. 3.8, D). Dafür wurde die Fläche von 800 - 1000 Kernen je Bildausschnitt

bestimmt (Software: Image J). Auch hier wurde deutlich, dass die Zugabe von Dox eine Veränderung der Zellkerne transgener Primärzellen bewirkte, nicht aber der Wildtyp-Kerne. Die Summe der Kernfläche der induzierten transgenen Primärzellen nahm durch die große Anzahl pyknotischer Kerne (Abb. 3.8, C) im Vergleich zu Wildtyp- und transgenen Zellen um 30-40 % ab. Die Veränderungen der Zellkerne konnten daher direkt auf die *barnase*-Induktion zurückgeführt werden. Der geringe Anteil kleiner Kerne nicht induzierter transgener Primärzellen deutete auf die bereits durch RT-PCR nachgewiesene *barnase*-„Leckexpression“ hin. Wie die graphische Darstellung (Abb. 3.8, D) zeigt, war der Unterschied zwischen Wildtyp- und den nicht induzierten transgenen Zellen gering.

3.3.5 Ultrastrukturelle Veränderungen der CMV/bar-Primärfibroblasten nach Induktion

Nachdem die Induktion der *barnase* in transgenen Primärzellen zum Zelltod führte, wurden die Auswirkungen der Induktion elektronenmikroskopisch untersucht. 5 Tage nach Induktion durch Dox-Gabe (4 µg/ml) wurden die Zellen der CMV/bar-Mäuse fixiert und kontrastiert. Als Kontrollen wurden Wildtyp-Primärfibroblasten mit Dox und transgene Primärzellen ohne Dox kultiviert. Wie auch in den induzierten Zellen des Klons D7 (Abb. 3.3, C) konnte eine deutliche strukturelle Veränderungen der Dox-induzierten transgenen Primärzellen im Vergleich zu den Wildtyp- und den nicht induzierten transgenen Zellen beobachtet werden (Abb. 3.9, A – C). Die unter Dox kultivierten Wildtyp-Primärzellen (Abb. 3.9, A) zeigten ebenso wie die nicht induzierten CMV/bar-Primärzellen (Abb. 3.9, B) keine ultrastrukturellen Auffälligkeiten. Im Zytoplasma der induzierten transgenen Primärzellen (Abb. 3.9, C) konnten viele elektronendichte Strukturen beobachtet werden. Ferner waren an den Rändern der Zellkerne elektronendichte Regionen, ein Hinweis auf Chromatinkondensation, zu erkennen. In einer stärkeren Vergrößerung der elektronendichten Strukturen (Abb. 3.9, D) waren membranartige Schichten zu sehen. Ausgelöst durch die Induktion der *barnase* kam es zum vermehrten Auftreten von Autophagosomen und Vakuolen in den Zellen und zur Chromatinkondensation. In den transgenen Primärkulturen wurden ähnlich Phänomene beobachtet wie in den stabilen D7-Zellen.

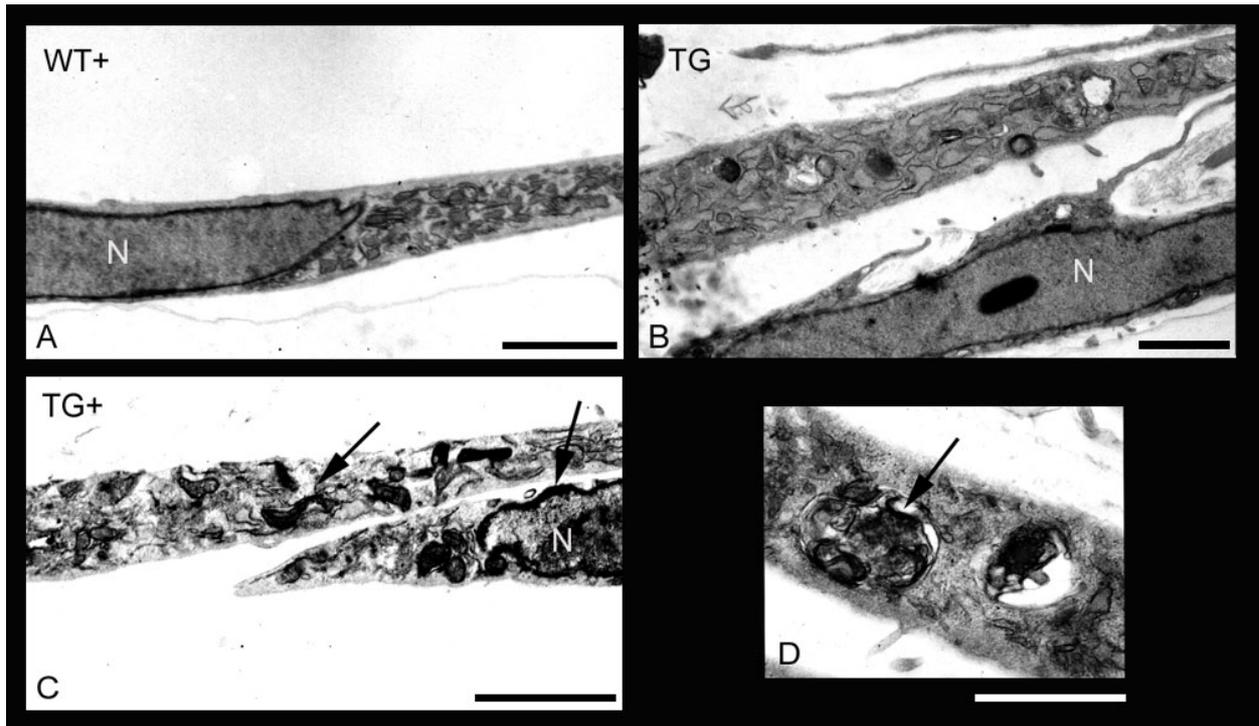


Abb. 3.9: Ultrastrukturelle Veränderungen induzierter *CMV/bar*-Primärfibroblasten.

Wildtyp- (A) und nicht induzierte transgene Zellen (B) zeigten keine ultrastrukturellen Auffälligkeiten, während transgene Primärzellen 5 d nach *bar*-Induktion Dox-Zugabe (+) eine veränderte Ultrastruktur zeigten (C, D). Elektronendichte Strukturen im Zytoplasma und Chromatinkondensation am Rand des Zellkerns wurden beobachtet. Die EM-Aufnahmen wurden freundlicherweise von Dr. Peter Heimann und Renate Piwek, Universität Bielefeld, erstellt. Maßstab: 2,6 μm (A); 3,5 μm (B); 2,14 μm (C); 0,5 μm (D).

3.3.6 Induktion *CMV/bar*-Primärfibroblasten führt zu Veränderungen von Hsp-70 und Ubiquitin

Analog zu den Untersuchungen an stabilen D7-Zellen wurden Stressreaktionen transgener Primärzellen durch *barnase*-Induktion anhand von Hsp70- und Ubiquitin-Veränderungen analysiert.

Nach 7-tägiger Dox-Gabe wurden die transgenen Zellen fixiert, permeabilisiert und eine Hsp70-Immunfluoreszenzfärbung durchgeführt. Die Zellkerne wurden zusätzlich durch Bisbenzimid dargestellt (Abb. 3.10). Als Kontrollen wurden in Dox kultivierte Wildtyp-, sowie nicht induzierte *CMV/bar*-Primärfibroblasten mitbehandelt. Die Wildtyp-Primärzellen zeigten keine deutliche Hsp70-Immunfärbung (A) während Hsp70 in nicht induzierter transgenen Zellen trotz einiger positiver Zellen kaum zu erkennen war (Abb 3.10, B). Die induzierten transgenen Zellen zeigten eine stärkere Immunfluoreszenz für Hsp70 (Abb. 3.10, C). Ferner korreliert die Intensität der Hsp70-Anfärbung mit dem Auftreten pyknotischer Kerne. Die *barnase*-Expression führte zu einer Stressreaktion der Zellen mit veränderter Hsp70-Immunfluoreszenz.

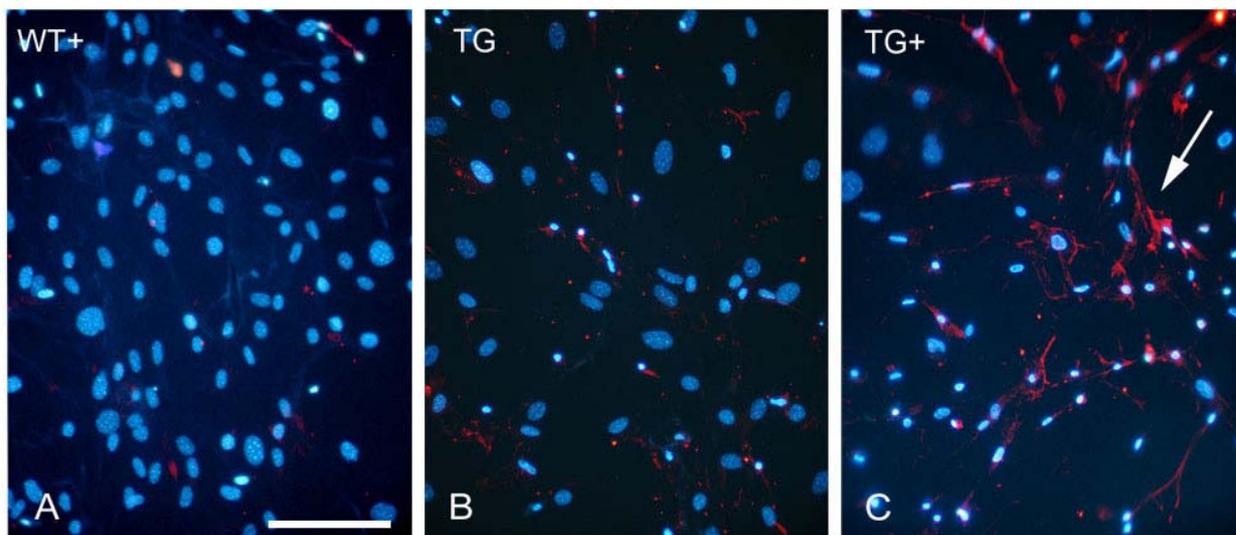


Abb.3.10: Verstärkte Hsp70-Immunfluoreszenz induzierter *CMV/bar*-transgener Primärfibroblasten.

Hsp70-Immunfluoreszenz von Wildtyp- (A) transgenen (B) und induzierten *CMV/bar*-transgenen Primärzellen (C). Die Kontrolle (A) wurde mit Dox (4 µg/ml) behandelt. 7 d nach Induktion (4 µg/ml Dox) von transgenen Primärzellen wurde eine Zunahme von Hsp70-positiven Zellen im Vergleich zu nicht induzierten Primärzellen beobachtet (B, C). Die zusätzliche Bisbenzimid-Färbung zeigte, dass Hsp70-positiven Zellen mit dem Auftreten pyknotischer Kerne korrelierten (C). Als 2. AK wurde Cy3-gekoppeltes anti-maus-IgG verwendet. Maßstab: 50 µm (A – C).

Es wurden außerdem Ubiquitin-Immun- und Kernfärbungen transgener Primärzellen nach 7-tägiger Dox-Gabe, sowie ohne Induktion durchgeführt. Die Induktion der *barnase* führte zu einer Veränderung der Ubiquitin-Lokalisation (Abb. 3.11). Die Überlagerungen der Ubiquitin- und Bisbenzimid-Färbung (Abb. 3.11, A, B) zeigten, dass die Ubiquitin-Immunfluoreszenz nicht induzierter Zellen (A) nicht mit der Lokalisation des Kerns übereinstimmte. Es zeigten wenige Zellen eine Anfärbung. Bei mehreren induzierten Zellen wurde eine Ubiquitin-Immunfluoreszenz im Kern beobachtet (B). Deutlicher war die Kern-Lokalisation in den Detailaufnahmen (Abb. 3.11, C – C'') zu erkennen. Hier waren Ubiquitin-Akkumulationen im Chromatin zu finden (C), die nicht mit den durch die Bisbenzimid-Färbung deutlich sichtbaren heterochromatischen Regionen ko-lokalisieren (C''). Aufnahmen am Konfokalen-Laser-Scanning-Mikroskop zeigten eine punktförmige Akkumulation und Lokalisation im Kern (Abb. 3.11, D). Nach 7 Tagen *barnase*-Induktion waren auch vereinzelt Zellen zu finden, deren Ubiquitin-Anhäufungen oder -Ablagerungen sich ausschließlich im Zytoplasma befanden (Abb. 3.11, E).

Die *barnase*-Induktion und die darauf folgenden intrazellulären Vorgänge waren an eine Lokalisation von Ubiquitin im Kern gekoppelt, was auf eine verstärkte Ubiquitinierung von Proteinen, z.B. Transkriptionsfaktoren hindeutet. Diese Beobachtungen stimmen mit der Ubiquitin-Lokalisation induzierter CMV-tTA/bar-stabiler D7-Zellen überein (s. Abb. 3.5) und sind daher Indikatoren für den induzierten Zelltod.

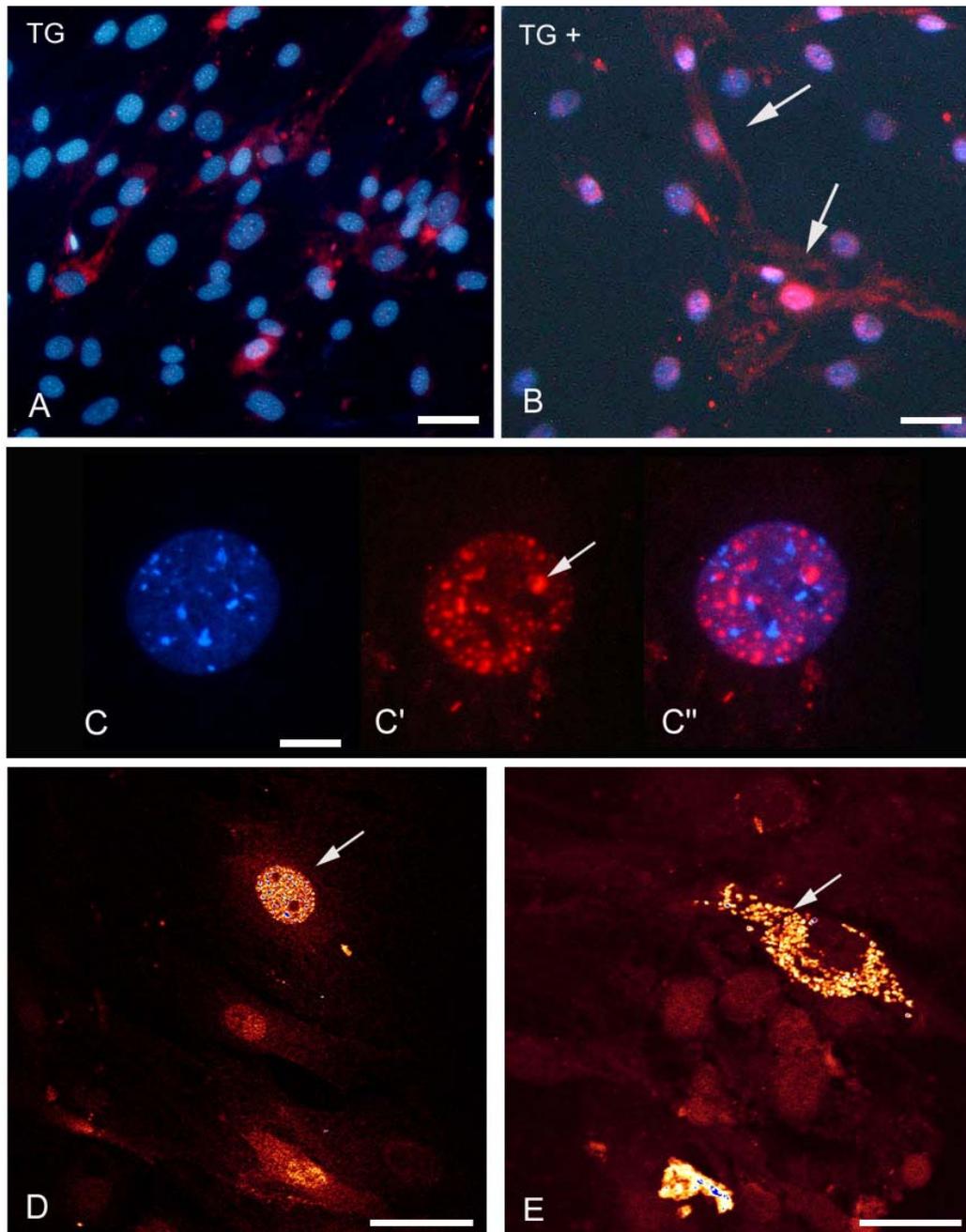


Abb. 3.11: Veränderung der Ubiquitin-Lokalisation in *CMV/bar*-Primärfibroblasten nach Dox-Induktion.

Im Vergleich zu uninduzierten transgenen Primärzellen (A) wurde 7 d nach Dox-Zugabe (4 µg/ml) eine verstärkte Ubiquitin-Immunfluoreszenz in induzierten Primärzellen beobachtet (B). Durch die Bisbenzimid-Anfärbung wurde die Kernlokalisierung des Ubiquitin deutlich. Die vergrößerte Darstellung eines Zellkerns induzierter transgener Zellen (C – C'') zeigte die Akkumulation von Ubiquitin im Kern (C'); eine Ko-Lokalisation mit kondensierten heterochromatischen Regionen im Zellkern war nicht zu erkennen (C''). Die punktartige Erscheinung der Ubiquitin-Akkumulationen im Zellkern wurde durch konfokale Laser-Mikroskop-Aufnahmen bestätigt (D); einige Zellen zeigten Akkumulationen ausschließlich im Zytoplasma (E). Maßstab: 20 µm (A, B, D, E); 5 µm (C – C'').

3.3.7 Apoptose-Nachweis durch Caspase 3-Immunfluoreszenz

Um zu untersuchen, ob Apoptose bei dem *barnase*-induzierten Zelltod der transgenen Primärzellen eine Rolle spielt, wurde eine Caspase3-Immunfärbung durchgeführt. Der verwendete Antikörper (AK) bindet spezifisch an die gespaltene, aktivierte Form der Caspase. Die Fixierung und anschließende Immun- und Kernfärbung erfolgte 5 Tage nach Induktion durch Dox-Zugabe in das Medium der transgenen Primärzellen. In Übereinstimmung mit kernmorphologischen Veränderungen konnte durch Immunfluoreszenz eine Aktivierung der Caspase 3 beobachtet werden (Abb. 3.12, A, B). Die Inkubation mit Cy3-gekoppelten 2. AK bei fehlendem 1. AK führte nicht zu nicht Anfärbung kernmorphologisch auffälliger Zellen (Abb. 3.12, C). Die Zellen reagierten nicht konsistent auf die Dox-Gabe. Es ist ungeklärt, ob alle induzierten transgenen Primärzellen durch die Wirkung der bakteriellen RNAse apoptotisch absterben. Bei vielen Zellen wurde weder eine apoptotische Kernmorphologie beobachtet, noch waren sie Caspase-positiv. Der Grund dafür könnte die Koexistenz unterschiedlicher Stadien sein.

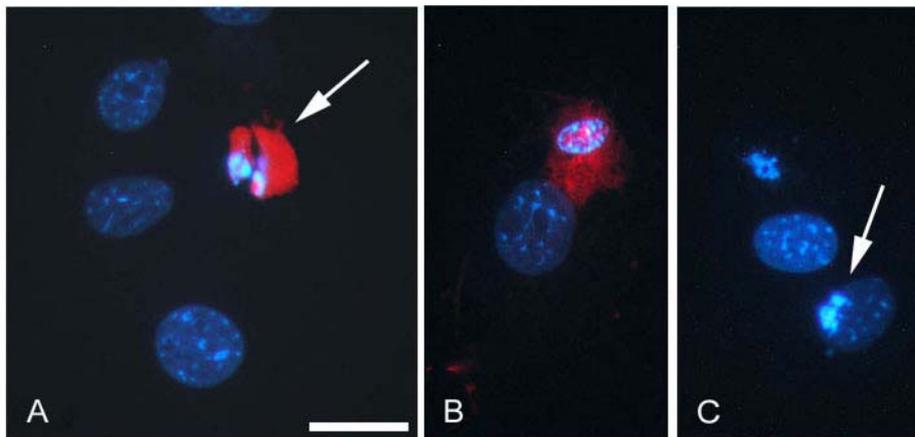


Abb. 3.12: Apoptose-Nachweis durch Caspase 3-Immunfluoreszenz induzierter *CMV/bar*-Primärfibroblasten.

Caspase 3-Nachweis 5 d nach *bar*-Induktion (+ Dox) *CMV/bar*-transgener Primärzellen (A, B). Die zusätzliche Kernfärbung zeigte eine Korrelation Caspase-markierter Zellen und abnormal veränderter Zellkerne. Der Cy3-gekoppelte 2. AK zeigte keine unspezifische Färbung (C).

Maßstab: 15 μ m (A – C).

3.4 Konditionale *barnase*-Expression in transgenen Mäusen

3.4.1 Analyse der *barnase*-Induktion in Geweben induzierter transgener Mäuse

Doppelt-transgenen Mäusen (CMV-rtTA/bar und GFAP-rtTA/bar) gleichen Alters wurde 21 Tage lang 0,6 % Dox in feuchtes Futter beigemischt. Die Dauer der Induktion wurde aufgrund der in Zellkulturstudien beobachteten langsamen Kinetik des Zelltods durch Barnase gewählt. Jeden dritten Tag wurde neues Dox-versetztes Futter gegeben. Nach einer Eingewöhnungsphase von ca. 5 Tagen wurde die Futter-Zubereitung angenommen, was durch das gleich bleibende Gewicht der Mäuse belegt wurde. Während der dreiwöchigen Induktion zeigten die Mäuse keine offensichtlichen phänotypischen Veränderungen. Die jeweils interessanten Gewebe wurden präpariert, die RNA isoliert und durch RT-PCR die Expression der *barnase* untersucht.

3.4.2 *Barnase*-mRNA ist nach Induktion in Geweben CMV-rtTA/bar-transgener Mäuse nachweisbar

Die Induktion der *barnase* wurde durch Expressionsanalysen untersucht und die RT-PCR von einigen Geweben im Vergleich zur Aktivator-Expression exemplarisch dargestellt (Abb. 3.13, A). Für eine quantitative Annäherung der *barnase*-Expression in den unterschiedlichen Geweben wurden Real-Time-PCRs durchgeführt (n = 2 Tiere) (B). Durch den viralen CMV-Promotor ist die Expression des Aktivators in allen untersuchten Geweben vorhanden (Abb.3.13, A). Die schwächere Expression in einigen Geweben, wie z.B. im ZNS wurde schon in der Literatur beschrieben (Kistner et al., 1996, Schultze et al., 1996). *Barnase*-Transkript war in allen präparierten Geweben nachweisbar (A). Dabei war auffällig, dass das Expressionsniveau des induzierten Transgens nicht nur mit der Expressionsstärke des Aktivators in dem jeweiligen Gewebe in Zusammenhang stand. Trotz einer schwächeren Expression des Aktivators in Großhirn (Großhirn: *Cbr*; Cerebellum: *Cbl*) ergab sich relativ zum *Herz*-Gewebe eine ähnlich hohe *barnase*-Expression. In den untersuchten induzierten Tieren (n = 4) gab es Unterschiede in der Ausprägung der *barnase*-Expression. In Skelettmuskel (*Skm*), *Cbr*, *Herz* und *Milz* war immer *barnase*-Transkript vorhanden.

Für die Real-Time-PCR-Analyse wurden drei verschiedene Läufe mit Duplikaten der unterschiedlichen Gewebe durchgeführt. Als Referenz wurde außer der *barnase* auch L7 (Referenz-Gen) amplifiziert. In (Abb. 3.13, B) ist eine graphische Darstellung errechneter Induktionsfaktoren (s. Formel Kap. 2.4.7) der verschiedenen Gewebe abgebildet. Im Abgleich mit der L7-Transkriptmenge der einzelnen Gewebe ist mit einem Induktionsfaktor von 13,05 die stärkste *barnase*-Induktion im *Skm* zu beobachten, gefolgt von *Cbr* (10,15) und *Milz* (3,1).

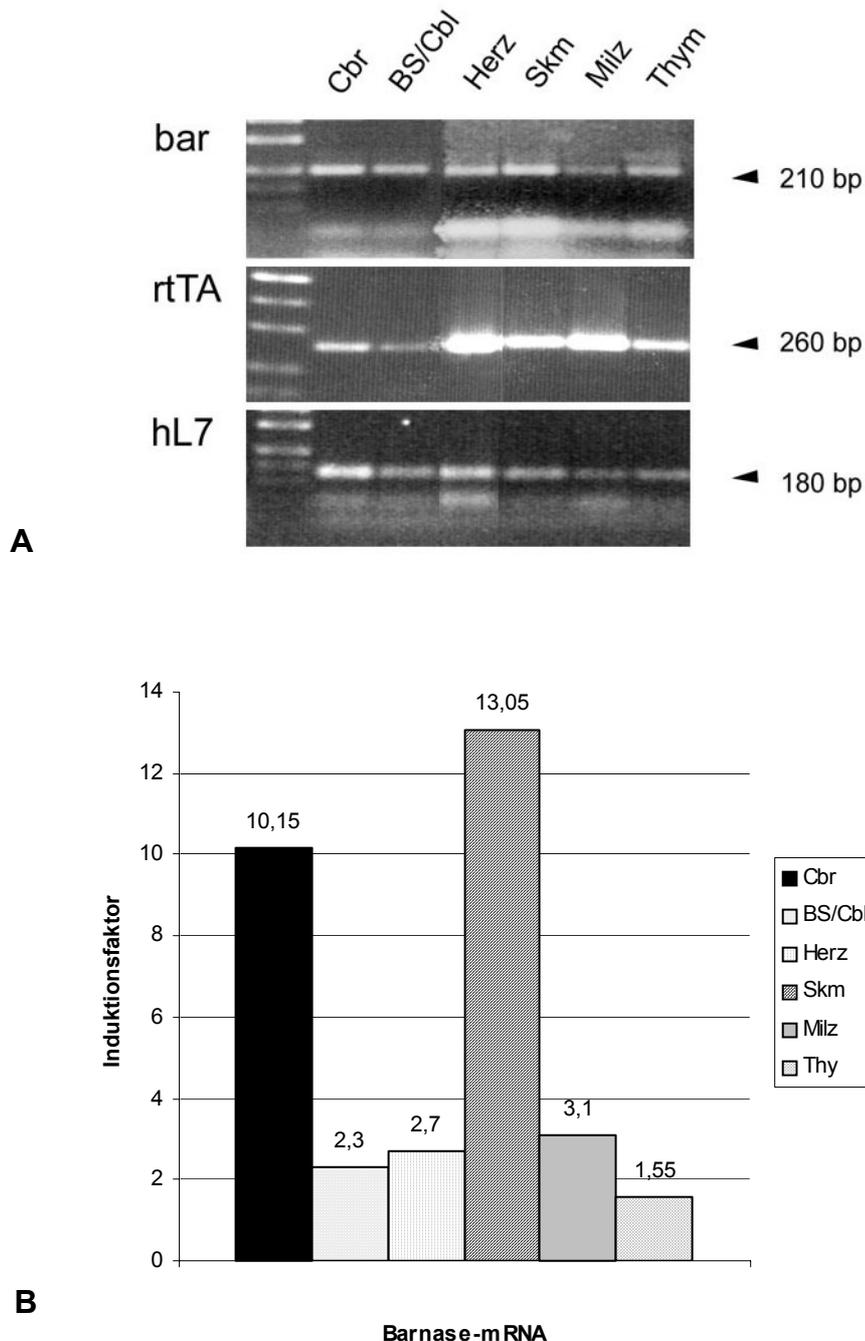


Abb. 3.13: rtTA- und *barnase*-Expression in Geweben induzierter *CMV/bar*-Mäuse.

(A), Repräsentative RT-PCR-Analyse von Großhirn (*Cbr*), Hirnstamm und Cerebellum (*BS/Cbl*), Herz, Skelettmuskel (*Skm*), Milz und Thymus einer *CMV/bar*-transgenen Maus. (B), *barnase*-Realtime-PCR der gleichen Gewebe (n = 2 Tiere). Die Menge des *bar*-Transkriptes wird als Induktionsfaktor in Bezug zum niedrigsten Wert angegeben (Berechnung: s. Kap. 2.4.7). Sowohl durch die RT-PCR (A) als auch durch die Real-Time-PCR (B) wurde eine Expression der *barnase* nachgewiesen. Die höchste Induktion wurde in *Skm*, *Cbr* und *Herz* beobachtet (B). Der CMV-rtTA wird in den untersuchten Geweben unterschiedlich exprimiert (A). Als Mengen-Referenz wurde für beide Analysen das ribosomale Protein L7 verwendet. Die Gewebe wurden 21 d nach Induktion (0,6% Dox/Futter) für die RNA-Isolierung präpariert.

Die anderen Gewebe weisen eine Induktion von 2,7, 2,3 und 1,55 auf (*Herz*, *Bs/Cbl*, *Thymus*). Die als Negativ-Kontrolle untersuchten Wildtyp-Gewebe (WT) zeigten keine Fluoreszenz-Detektion durch Real-Time-PCR. In Geweben von uninduzierten *CMV/bar*-Mäusen waren *barnase*-Amplifikate in geringem Maße in *Cbr* und *Milz* detektierbar, was auf eine gewisse „Leck-Expression“ in diesen Geweben hindeutet (nicht gezeigt).

Vergleiche von Gewebe eines doppelt-transgenen nicht induzierten (1) und induzierten *CMV/bar*-Tieres (2) zeigen die, wenn auch geringe, Dox-abhängige Expression der *barnase* in *Skm*, *Cbr*, *Herz* und *Milz*, während im Lungen-Gewebe keine Induktion der *barnase* durch RT-PCR-Analyse beobachtet werden konnte (Abb. 3.14).

Die *barnase* war folglich durch Dox-Gabe in Geweben von *CMV/bar*-Mäusen auf Transkriptionsebene reguliert induzierbar. Die quantitativen Real-Time-PCR-Daten weisen auf eine gute Induktionfähigkeit der *barnase* im *Skm*, in *Cbr* und *Milz* hin.

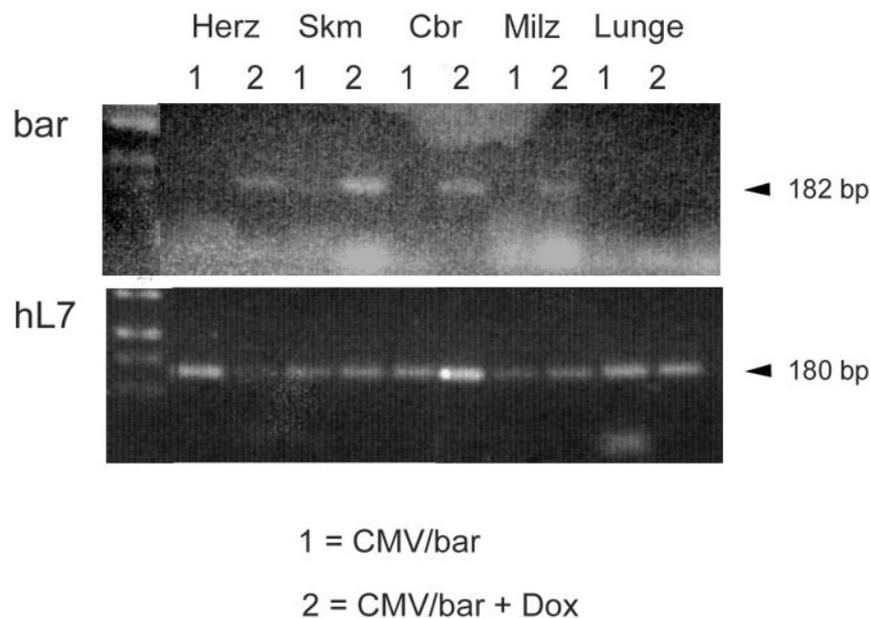


Abb. 3.14: *Barnase*-Expression durch Induktion in Geweben von *CMV/bar*-Mäusen.

Vergleichende RT-PCR-Analyse unterschiedlicher Gewebe uninduzierter und induzierter *CMV/bar*-Mäuse (21 d, + 0,6% Dox/Futter). Im Vergleich zu korrespondierenden Geweben uninduzierter Mäuse wurde eine Erhöhung der *bar*-Expression in *Herz*, *Skm*, *Cbr* und *Milz* des induzierten Tieres beobachtet. Die Lunge zeigte keine *bar*-Induktion. Als Mengenreferenz diente die Amplifikation der gleichen Menge cDNA durch L7-Primer. Abkürzungen s. Abb. 3.13.

3.4.3 Nachweis von *barnase*-mRNA im ZNS von induzierten *GFAP-rtTA/bar*-transgenen Mäusen

Die Expression der *barnase* durch das modifizierte Tet-abhängige Expressionssystem ist in *CMV/bar*-Mäusen möglich. Für eine zelltypspezifische Expression der *barnase* wurde die Möglichkeit getestet, den *rtTA* unter der Kontrolle des astrozytenspezifischen humanen *GFAP*-Promotors zu exprimieren.

Die Induktionsfähigkeit der *barnase* in doppelt-transgenen induzierten *GFAP-rtTA/bar*-Mäusen (im Folgenden: *GFAP/bar*) wurde analysiert. Die Hirngewebe induzierter *GFAP/bar*-Mäuse wurden auf die Expression des gewebsspezifischen Aktivators und der induzierten *barnase*-Expression mittels RT- und Real-Time-PCR untersucht (Abb. 3.15). Die RT-PCR-Ergebnisse eines induzierten *GFAP/bar*-Tieres sind stellvertretend dargestellt (Abb. 3.15, A). Die Expression des Aktivators, der durch den h*GFAP*-Promotor kontrolliert wird, ist in den Hirnregionen schwach. Im Vergleich zur Kontrolle (Niere) ist sie aber deutlich zu erkennen, was die Gewebsspezifität des h*GFAP*-Promotors verdeutlicht (Abb. 3.15, A). Die Expression des in allen Zellen vorhandenen *barnase*-Konstruktes war, im Gegensatz zur Niere, im ZNS deutlicher zu beobachten (A). Dieser Befund korreliert mit der gewebsspezifischen Expression des Aktivators. Die höchste *barnase*-Expression wurde ebenso wie die höchste Expression des Aktivators im Cerebellum beobachtet

Durch Real-Time-PCR (B) wurde die Induktionsfähigkeit der *barnase* durch Dox-Gabe quantitativ untersucht (n = 2 Tiere). Die quantitative Auswertung erfolgte wie in Kap. 2.4.7 beschrieben. Die höchste Expression der *Barnase* mit einem Induktionsfaktor von 23,38 ist im Cerebellum zu finden und ist konform mit den Ergebnissen der RT-PCR. In den anderen Gehirnregionen ist eine Induktionsfähigkeit von 3,41 (*BS* = Hirnstamm) und 2,58 (*Cbr*) vorhanden. Eine Expression des astrozytenspezifischen Aktivators ist in Großhirn, Cerebellum und Hirnstamm von *GFAP/bar*-Mäusen nachweisbar, ebenso wie die induzierte Expression der *barnase*.

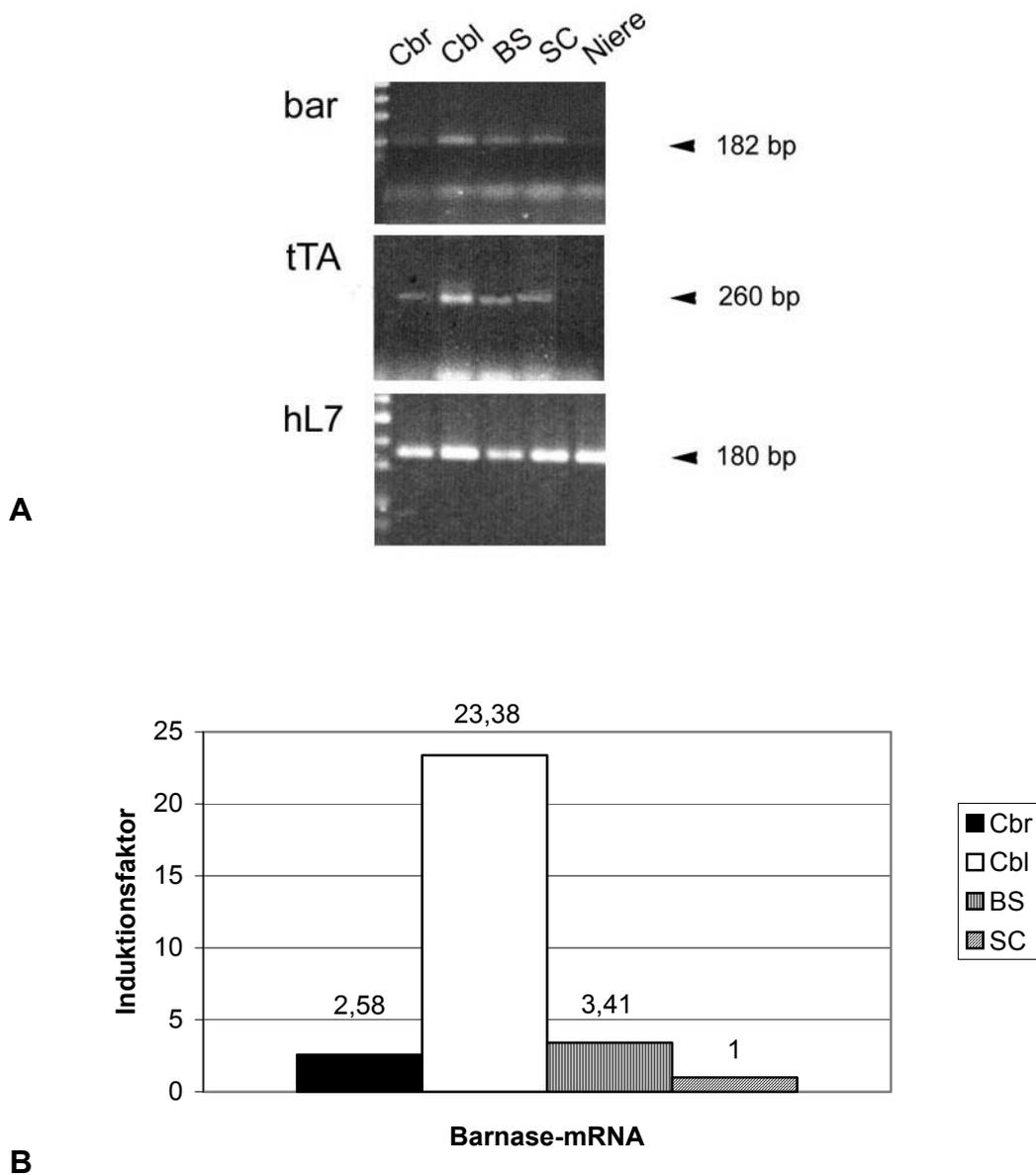


Abb. 3.15: rtTA- und *barnase* -Expression im ZNS induzierter *GFAP/bar*-Mäuse.

(A), Repräsentante RT-PCR-Analyse von *Cbr*, *Cbl*, *BS*, *SC* (*Rückenmark*) und *Niere* einer *GFAP/bar*-transgenen Maus nach Induktion. (B), Real-Time-PCR der gleichen Gewebe ($n = 2$ Tiere). Die Menge des *bar*-Transkriptes wird als Induktionsfaktor im Vergleich zum niedrigsten Wert (hier: *SC*) angegeben (Berechnung: s. Kap. 2.4.7). In allen Geweben wurde eine *bar*-Expression nachgewiesen, wobei das *Cbl* die stärkste Expression zeigte (A, B). Eine schwache „Leck-Expression“ in dem Kontrollgewebe (*Niere*) wurde beobachtet. Die Expression des astrozytenspezifischen Aktivators war in den Geweben des ZNS vorhanden, nicht in der *Niere* (A). Die L7-Amplifikation gleicher Mengen cDNA diente in beiden Analysen als Referenz. Die Gewebe wurden 21 d nach Induktion (0,6% Dox/Futter) für die RNA-Isolierung präpariert. Weitere Abkürzungen s. Abb. 3.13.

3.5 Untersuchungen histologischer Veränderungen im ZNS induzierter transgener Mäuse

Wie in Kap. 3.4.2 und 3.4.3 dargestellt, zeigten induzierte *CMV/bar*- und *GFAP/bar*-Mäuse eine induzierte *barnase*-mRNA-Expression. Aufgrund eines fehlenden Barnase-Antikörpers war keine direkte Detektion des Toxins auf Proteinebene möglich. Daher wurden die Gewebe mittelst histologischer Methoden auf mögliche zytotoxische Effekte der Barnase untersucht. Der Schwerpunkt der Untersuchungen beider, hinsichtlich der Aktivator-Eigenschaften unterschiedlichen transgenen Linien, lag auf Regionen im ZNS.

3.5.1 Histologische Veränderungen im ZNS von *CMV/bar*-Mäusen nach Induktion

Obwohl die Induktion der Barnase in *CMV/bar*-Mäusen im *Skh* stärker war, wurden auch hier die Auswirkungen auf das ZNS untersucht. Diese sind hinsichtlich der generellen Anwendbarkeit der regulierten *barnase*-Induktion im ZNS von besonderem Interesse. Die Induktion des Toxins im ZNS von *CMV/bar*-Mäusen wäre für mögliche Auswirkungen hinreichend, wenn man die Ergebnisse der Zellkultur-Experimente auf die *in-situ*-Situation übertragen kann. Regionen des ZNS wurden daraufhin mittels unterschiedlicher Neuronen- und Gliadarstellungen auf zytologische Veränderungen untersucht (n = 4 Tiere).

3.5.2 Darstellung veränderter Neurone im Großhirn durch Nissl-Färbung

Coronal-Schnitte des Großhirns induzierter *CMV/bar*-Mäuse wurden fixiert und mit Kresylviolett gefärbt. Die Objekte wurden im Vergleich zum WT auf pathologische Veränderungen untersucht. Zur Orientierung im Mausgehirn wurde ein anatomischer Atlas (Sidman et al., 1971) sowie die Internet-Datenbank der *Mouse Brain Library* (www.mbl.org) verwendet. Eine Coronal-Schnittebene des Atlas wird in Abb. 3.16 zur Übersicht gezeigt. Durch Sternchen sind die Regionen markiert, die in A–C dargestellt werden und die erkennbare neuronale Veränderungen zeigten. Im Cortex-Bereich des Großhirns wurden Ansammlungen von Neuronen beobachtet, deren Somata weiße vakuolige Einnschlüsse zeigten und die „aufgebläht“ („balooned neuron“) wirkten (Abb. 3.16, A, Detail: B). Ferner waren stark Kresylviolett angefärbte kleine Kerne, Kernfragmente oder Ablagerungen zu erkennen, die sich in oder auf Neuronen befanden und so nicht im WT zu beobachtet wurden (Abb. 3.16, C).

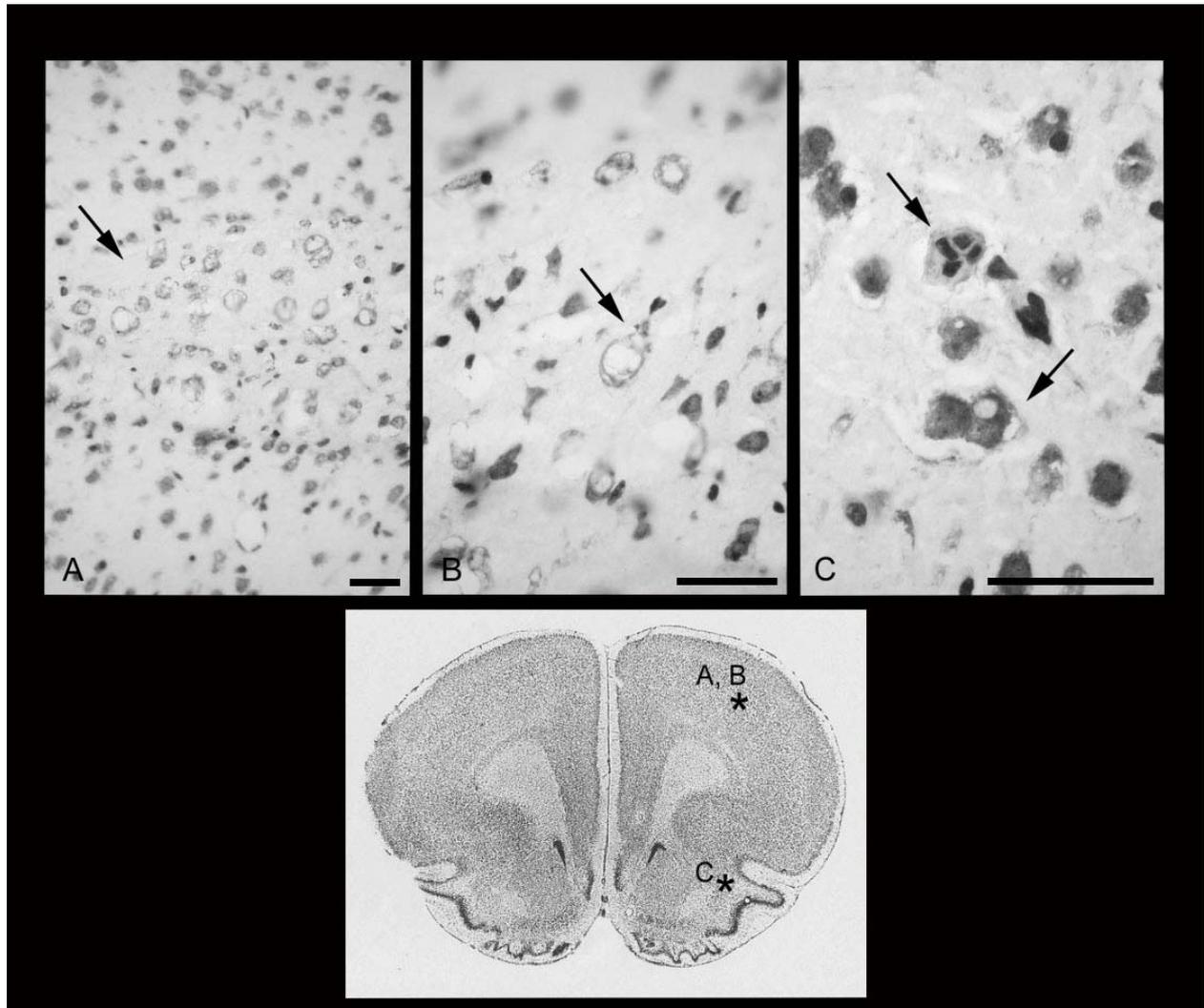


Abb. 3.16: Darstellung von Neuronen der *CMV/bar*-Mäuse durch Nissl-Färbung.

Im Cortex-Bereich des Großhirns induzierter *CMV/bar*-Mäuse wurden Ansammlungen von Neuronen mit vakuoligen, nach Kresylviolett-Färbung weiß erscheinenden Strukturen beobachtet (A, B). In anderen Bereichen waren stark violett-angefärbte Kerne, Kernfragmente oder Ablagerungen zu erkennen, die sich auf oder in Zellen befanden. Lokalisationen beobachteter Zellen sind in einer Coronal-Schnittebene des Mausgehirns (Sidman et al., 1971) markiert (*). Maßstab: 50 µm (A – C).

3.5.3 Zytologische Veränderungen durch *barnase*-Induktion im Großhirn und Cerebellum von *CMV/bar*-Mäusen

Um die durch Wirkung der bakteriellen RNase erwarteten zytotoxischen Effekte und Zeldenerationen zu untersuchen, wurde eine astrozytenspezifische GFAP-Immunfluoreszenzfärbung durchgeführt. Degenerationen von Neuronen führen oft zu einer Aktivierung von Astrozyten (Kettenmann and Ransom, 1995). Coronal-Schnitte von Cortex und Cerebellum WT- und induzierter *CMV/bar*-Mäuse wurden fixiert und parallel GFAP-Immun- und Kernfärbungen durchgeführt. In (Abb. 3.17, A) ist der Ausschnitt eines WT-Großhirns dargestellt, die Kerne sind Bisbenzimid gefärbt. (Abb. 3.17, A') zeigt die GFAP-Immunfluoreszenz desselben Schnittes. Im Vergleich dazu ist eine ähnliche Schnittebene eines induzierten transgenen Tieres abgebildet (Abb. 3.17, B, B'). Im Cortex der transgenen Tiere waren vermehrt von GFAP-positiven Astrozyten-Ausläufern umschlossene Zellkerne und auffällige Blutgefäße zu erkennen (Abb. 3.17, B'). Deutlich Bisbenzimid-angefärbte Zellkerne wurden durch GFAP-positive Fortsätze umrandet (Abb. 3.17, C, D), was auf vereinzelte degenerierende oder proliferierende Zellen hindeuten kann. Eine flächige Astroglieose wurde nicht beobachtet, nur einzelne, chromatinauffällige Zellen wurden selektiv durch aktivierte Astrozyten umgeben. Blutgefäße sind im Vergleich zum Wildtyp häufig stärker GFAP-positiv (Abb. 3.17, E).

Auch im Cerebellum wurde eine Veränderung der GFAP-Immunfluoreszenz transgener im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen beobachtet (Abb. 3.18). Die Übersichten von WT (Abb. 3.18, A) und induzierter, transgener Maus (Abb. 3.18, B) zeigen einen ähnlichen Ausschnitt, in dem deutlich die charakteristische Molekular- und Körnerschicht, sowie die Zellkerne der Bergmann-Glia zu erkennen sind. Die GFAP-Färbung der derselben Schnitte zeigte einen Unterschied in der Lokalisation der GFAP-Immunfluoreszenz zwischen WT (Abb. 3.18, A') und transgenem Tier (B'). Während in der Körnerschicht des WT-Cerebellums keine deutliche Anfärbung zu erkennen war (Abb. 3.18, A', Detail: C), war die Körnerschicht des transgenen Tieres durch GFAP-Immunfluoreszenz gekennzeichnet (B', Detail: D). Die normalerweise GFAP-positiv Bergmann-Glia ist bei beiden Tieren markiert. Auffällig war die nicht typische, mit den Zellkernen von Neuronen korrelierte GFAP-Markierung, die eine ungewöhnliche Astrozyten-Stimulierung repräsentierte (B, B'). Im transgenen Tier wurden die Neurone der Körnerschicht verstärkt von aktivierten Astrozyten und ihren Fortsätzen umgeben (D), was auf degenerierende Zellen hindeutet. Die allgemeine GFAP-Aktivierung der Körnerschicht des Cerebellums weist auf *barnase*-abhängige zytologische Veränderungen und nachfolgende Astroglieose hin.

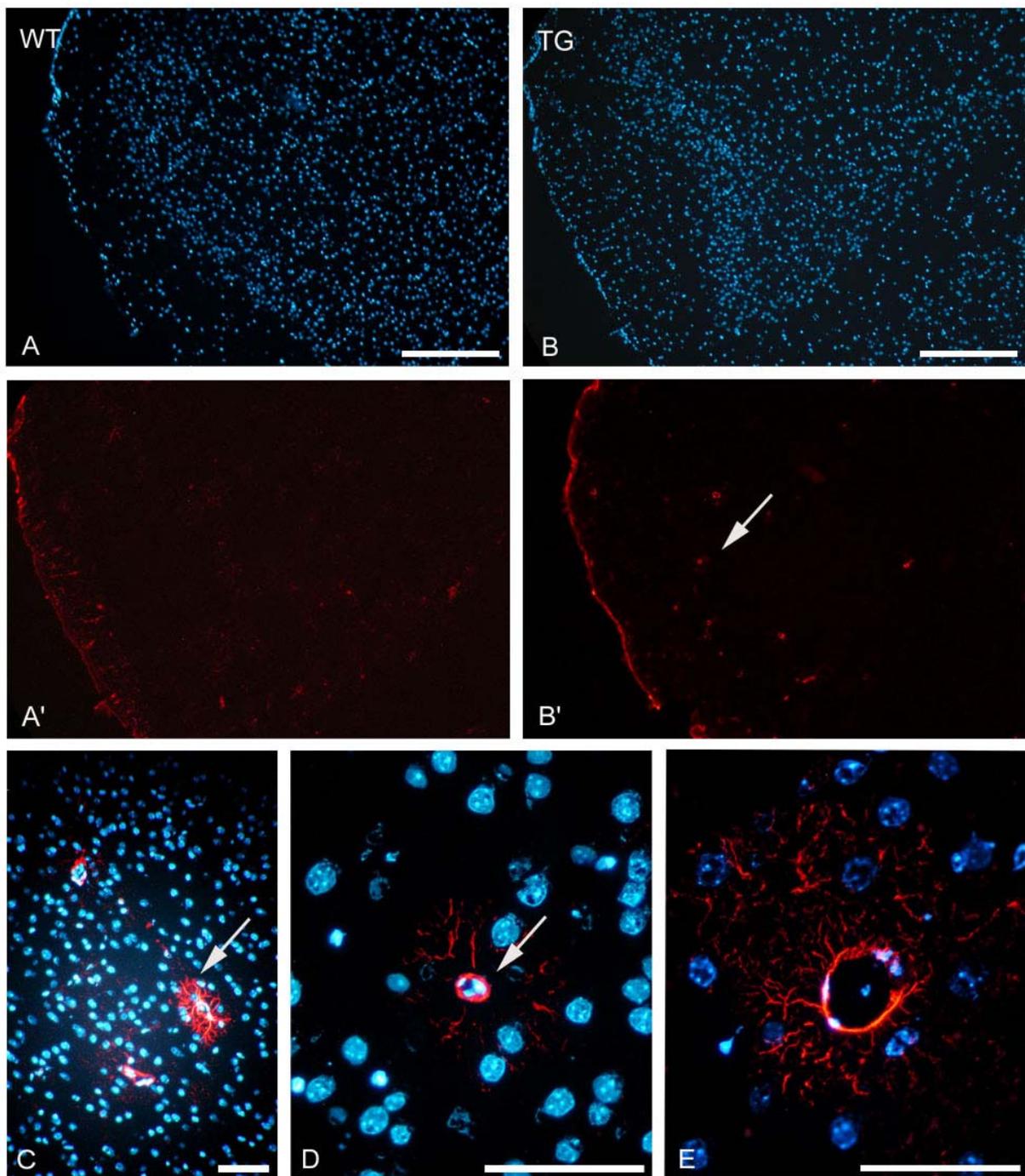


Abb. 3.17: Darstellung von Astrozyten im Großhirn induzierter *CMV/bar*-transgener Tiere. Großhirn-Coronal-Schnitte für Wildtyp (A) und induziertes transgenes Tier (B) dargestellt durch Bisbenzimid-Färbung. Der Vergleich der GFAP-Immunfluoreszenzfärbungen derselben Schnitte (A', B') zeigte, dass sich im transgenen Tier vermehrt einzelne GFAP-positive Strukturen befanden (B'). Durch Überlagerung der Zellkern- und GFAP-Färbung waren hypertrophierte Astrozyten (C) und von Astrozytenfortsätzen umgebene kondensierte Zellkerne zu erkennen (C, E), ferner im Vergleich zum Wildtyp stärker GFAP-markierte Blutgefäße oder Kapillaren. Eine flächige Astrogliose wurde nicht beobachtet. Maßstab: 350 μm (A – B'); 50 μm (C – E).

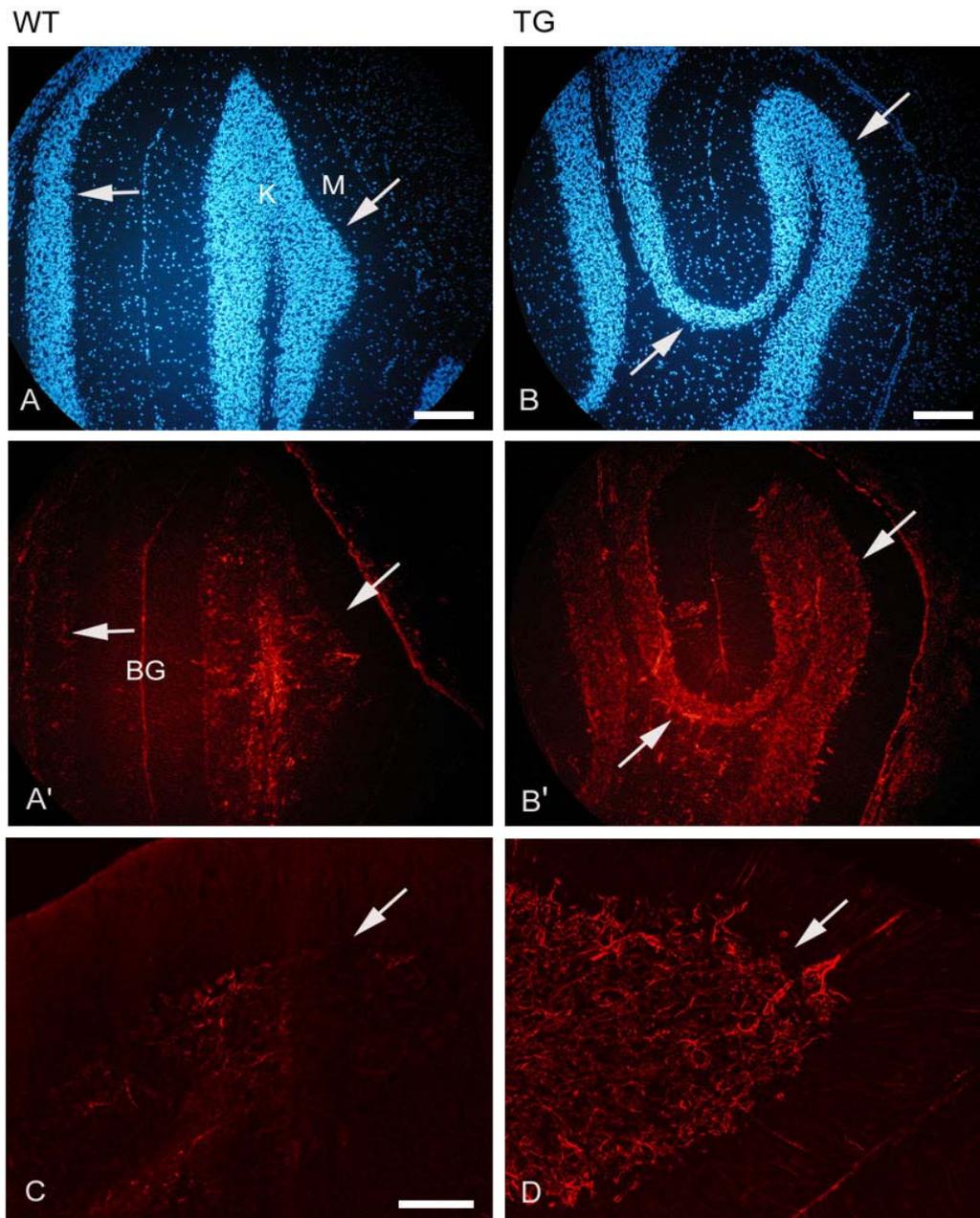


Abb. 3.18: Darstellung von Astrozyten im Cerebellum induzierter *CMV/bar*-transgener Mäuse.

Übersicht des Cerebellums für Wildtyp (A) und für das induzierte transgene Tier (B) durch Bisbenzimid-Färbung. Der Vergleich der GFAP-Immunfluoreszenz in Schnitten von Wildtyp- und transgenen Mäusen zeigte eine erhöhte Intensität in den zellkernreichen Regionen der Körnerschicht (K) des transgenen Tieres (A', B'). Die GFAP-positive Bergmann-Glia (BG) ist in Wildtyp und transgenem Tier zu erkennen (A-B'). Eine Ausschnittsvergrößerung des Cerebellums zeigte keine deutliche GFAP-Markierung der Körnerzellschicht des Wildtyps (C), während Zellkerne der Körnerschicht des transgenen Tieres von GFAP-positiven Astrozytenfortsätzen umgeben waren (D). M: Molekularschicht. Maßstab: 200 μm (A – B'); 50 μm (C, D).

3.5.4 Nachweis apoptotischer Zellen im Großhirn und Hirnstamm

Immunfluoreszenzfärbungen von aktivierter Caspase 3 sollten im ZNS mögliche apoptotische Zellen darstellen. Im WT-Großhirn wurden keine Caspase-positiven Zellen beobachtet, ein Ausschnitt ist in (A) dargestellt. Sowohl im Großhirn (Abb. 3.19, C), als auch im Hirnstamm (Abb. 3.19, B, Detail: D) von induzierten *CMV/bar*-Mäusen waren Caspase-3 positive Zellen zu erkennen. Die Immunfluoreszenz erschien in Teilen der Zellen intensiver, Caspase 3-positive Zellen waren nicht über die gesamte beobachtete Gehirn-Region verstreut, sondern befanden sich in wenigen „Clustern“.

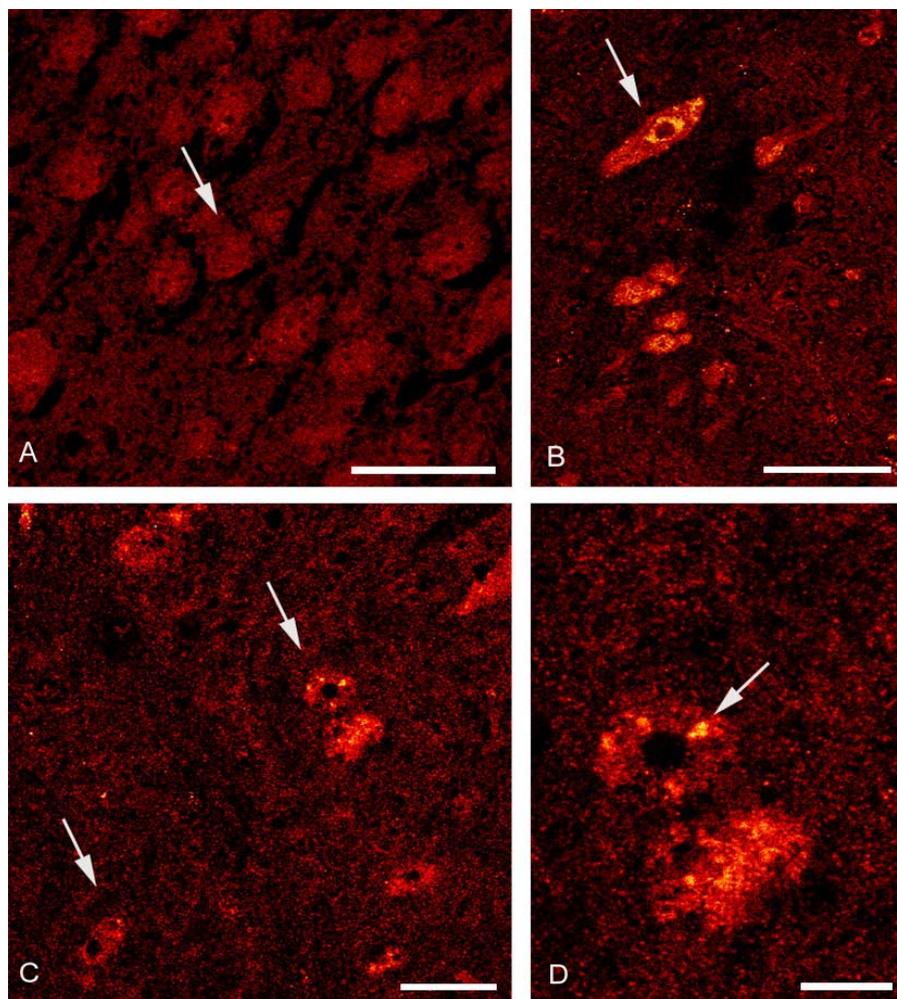


Abb. 3.19: Caspase 3-Nachweis im Gehirn von induzierten *CMV/bar*-transgenen Mäusen.

Im Großhirn des Wildtyps wurden keine apoptotischen Zellen durch Caspase 3-Immunfluoreszenz nachgewiesen (A). Dagegen wurden in induzierten transgenen Tieren Caspase-3-positive Zellen in Regionen des Hirnstamm (B) und des Großhirns (C, Detail: D) beobachtet. Im Zytoplasma der positiven Zellen befanden sich häufig stärker markierte Bereiche (B-D). Immunfluoreszenzaufnahmen durch konfokale Mikroskopie. Maßstab: 50 μ m.

3.5.5 Histopathologische Veränderungen im ZNS von *GFAP/bar*-Mäusen nach Induktion

Die mRNA-Analyse von *GFAP/bar*-Mäusen zeigte eine schwache Expression des astrozytenspezifische Aktivators in Großhirn, Cerebellum, Hirnstamm und Rückenmark (SC: Spinal Cord). Eine Expression der Toxin-mRNA durch Induktion konnte in diesen Geweben ebenfalls festgestellt werden (s. Kap. 3.4.3). Die Tiere zeigten keine offensichtlichen Verhaltens-Auffälligkeiten. Die möglichen Auswirkungen der in den Astrozyten exprimierten *barnase* wurden durch unterschiedliche (immun-)histologische Darstellungen des Großhirns untersucht (n = 2 Tiere).

3.5.6 Darstellung von Neuronen und Glia durch Nisslfärbung im Großhirn

Die Nissl-Färbungen unterschiedlicher Großhirn-Regionen von induzierten *GFAP/bar*-Mäusen zeigten im Cortex (Abb. 3.20, A, B, Detail: C), sowie im Hippocampus (D) stark Kresylviolett angefärbte, kleine Zellen. Weiterhin waren in Cortex-Bereichen Zellkörper mit weißen Einschlüssen zu finden (Abb. 3.20, E, F). Diese waren, ähnlich wie bei Neuronen von induzierten *CMV/bar*-Mäusen, nicht einheitlich verteilt, sondern in Ansammlungen im Cortex zu finden. Die kleinen, stark Kresylviolett gefärbten Zellen, sowie die durch weiße Einschlüsse gekennzeichneten Neurone waren in dieser Ausprägung im Wildtyp nicht zu beobachten.

3.5.7 Hinweise auf pathologische Veränderungen von Blutgefäßen im Großhirn von *GFAP/bar*-Mäusen durch GFAP-Darstellung

Wenn das Toxin in Astrozyten synthetisiert werden würde, wären Veränderungen oder Zellverluste dieser Glia-Zellen und Reaktionen angrenzender Zellen wahrscheinlich. Zur Untersuchung der Morphologie und des Aktivierungszustandes von Astrozyten wurden GFAP-Immunfluoreszenz-Färbungen durchgeführt. Im gesamten Großhirn, besonders in der Region des Corpus Callosum (CC), waren stark markierte, von Astrozytenfortsätzen umgebene Bereiche unterschiedlicher Größe zu finden (Abb. 3.21, A – F). Die zusätzliche Kernfärbung zeigte, dass es die Erweiterungen oder Läsionen in den meisten Fällen von Zellen umgeben waren (Abb. 3.21, A, D – F). Der Lateralventrikel (LV) war in WT-Schnitten GFAP-positiv, aber nicht so prägnant wie in (B) dargestellt. Durch konfokale Laser-Scanning Mikroskopie war eine feine Verästelung der Astrozyten-Ausläufer deutlich zu erkennen (Abb. 3.21, C). Manche Zellkerne die sich am Rand dieser Erweiterungen befanden waren stark fluoreszent, was auf einen hohen Kondensationsgrad des Chromatins hindeutete (Abb. 3.21, D,

F). Im Zusammenhang mit der Blut Hirn-Schranke stehen Astrozyten mit ihren Fortsätzen immer mit Blutgefäßen in Kontakt.

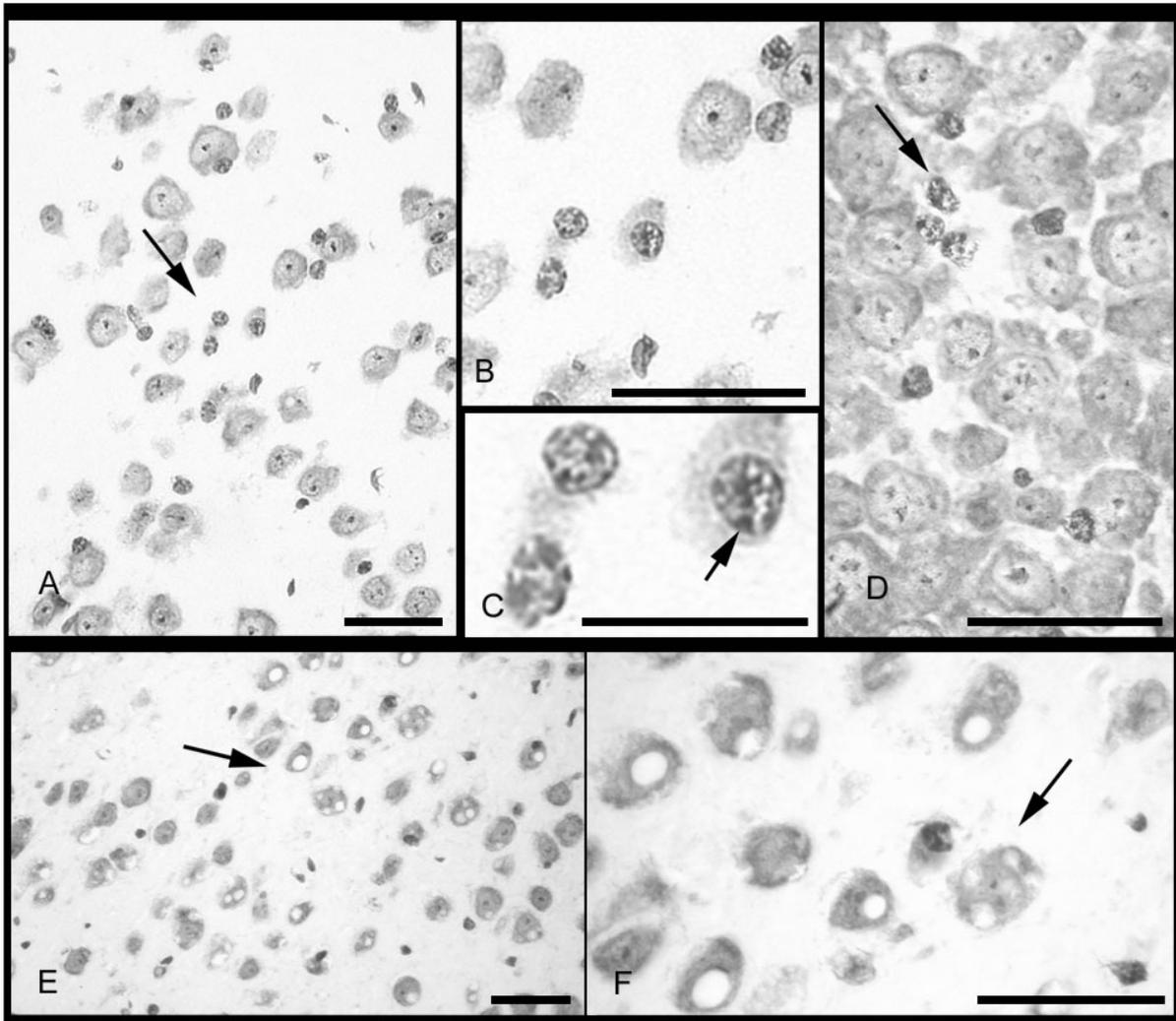


Abb. 3.20: Darstellung von Neuronen und Glia im Großhirn induzierter *GFAP/bar*-transgener Tiere durch Nissl-Färbung.

In der Übersicht des Cortex induzierter transgener Mäuse waren viele kleine Zellen zu erkennen, vermutlich Glia (A), die stark Kresylviolett-angefärbte Bereiche im Zellkern zeigten (B, Detail: C). Auch im Hippocampus wurden solche Zellen beobachtet (D). Ferner wurden in Cortex-Regionen Zellen gefunden, die bläschenartige, nach Kresylviolett-Anfärbung weiß erscheinende Strukturen zeigten (E, Detail: F). Maßstab: 50 μ m (A, B, D – F); 20 μ m (C).

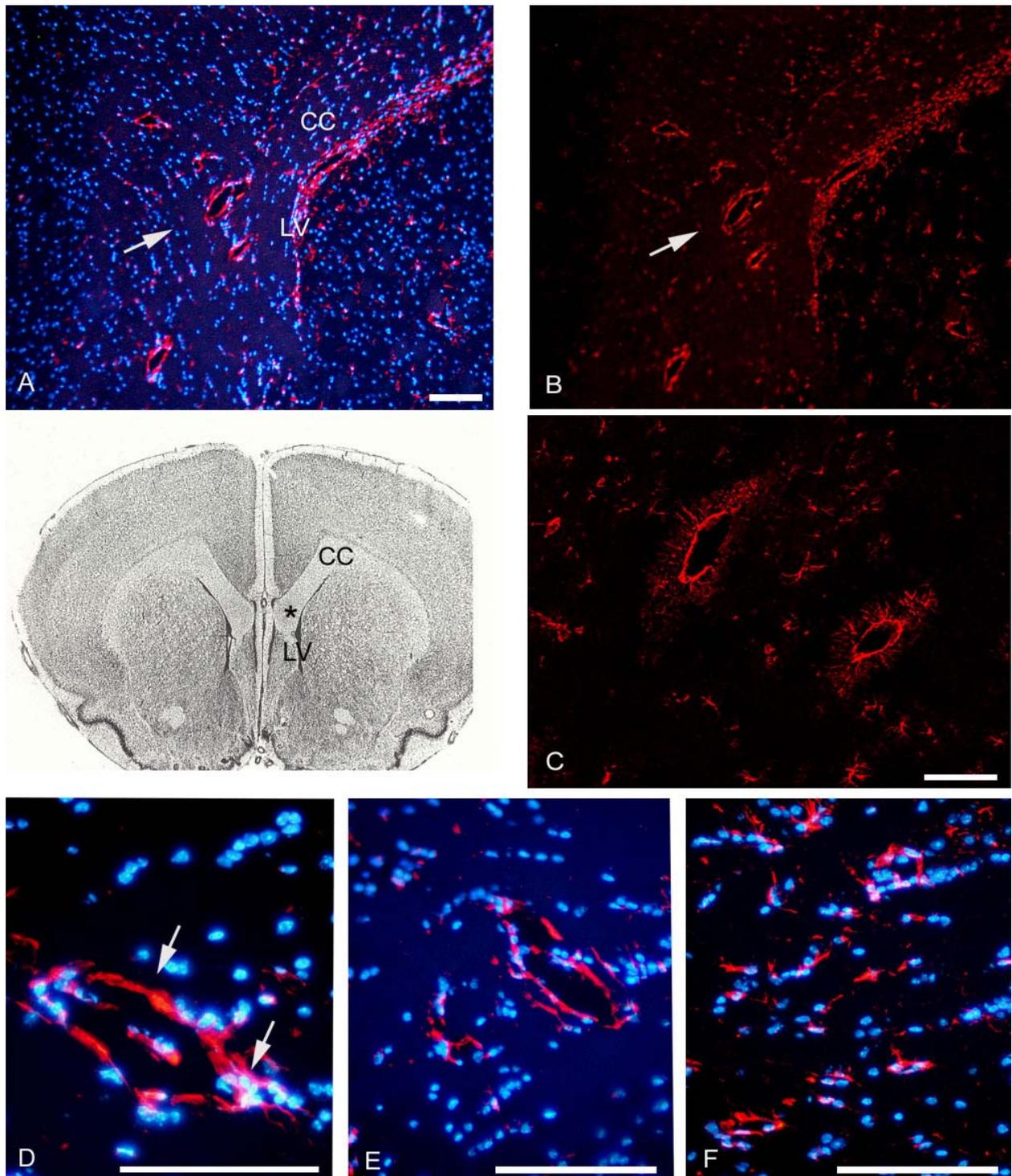


Abb. 3.21: Hinweise auf pathologische Veränderungen im Großhirn von induzierten *GFAP/bar*-transgenen Mäusen durch immunhistologische Darstellung von Astrozyten.

Eine Coronal-Schnittebene des Mausgehirns ist zur Orientierung abgebildet (Sidman et al., 1971). Ein Ausschnitt des Großhirns einer induzierten *GFAP/bar*-transgenen Maus (*) ist durch Bisbenzimid- und GFAP-Immunfluoreszenzfärbung gezeigt (A, B). In der Überlagerung waren zellkernfreie Bereiche zu erkennen, die von intensiven GFAP-Markierungen eingefasst waren (A). Auch der Lateralventrikel (LV) ist von Astrozyten umgeben. Durch konfokale Immunfluoreszenz-Aufnahmen wurden die feinen

Verästelungen der Astrozyten deutlich (C). Vergrößerungen zeigen die auffälligen Bereiche aus der Region des Corpus Callosum (CC) (D, E, F)). Zu den intensiven GFAP-Markierungen wurden kondensierte Zellkerne beobachtet (C). Maßstab: 100 μm (A – F).

Um herauszufinden, ob sich bei den beobachteten Astrozyten-umringten Bereichen um erweiterte Blutgefäße handelt, wurde eine Doppelt-Immunfluoreszenzfärbung von Glattmuskel-Aktin und GFAP durchgeführt. Die Doppelt-Immunfluoreszenzfärbung zeigte, dass einige dieser zellkernfreien Bereiche von Glattmuskelzellen umgeben waren und somit Blutgefäße darstellten (Abb. 3.22, A). Die beobachtete Anzahl großer Blutgefäße im Vergleich zum WT war erhöht. Andere GFAP-positive Bereiche gleicher Größe waren aber trotz Doppel-Färbung Glattmuskel negativ, so dass es sich nicht Blutgefäße handelte (3.22, B, B'). In Cortex-Regionen von induzierten *GFAP/bar*-Mäusen wurden sowohl erweiterte, deutlich GFAP-positive Blutgefäße, als auch von Astrozyten-Fortsätzen erfüllte zellkernfreie Bereiche beobachtet, die auf Gliar Narben hinweisen könnten.

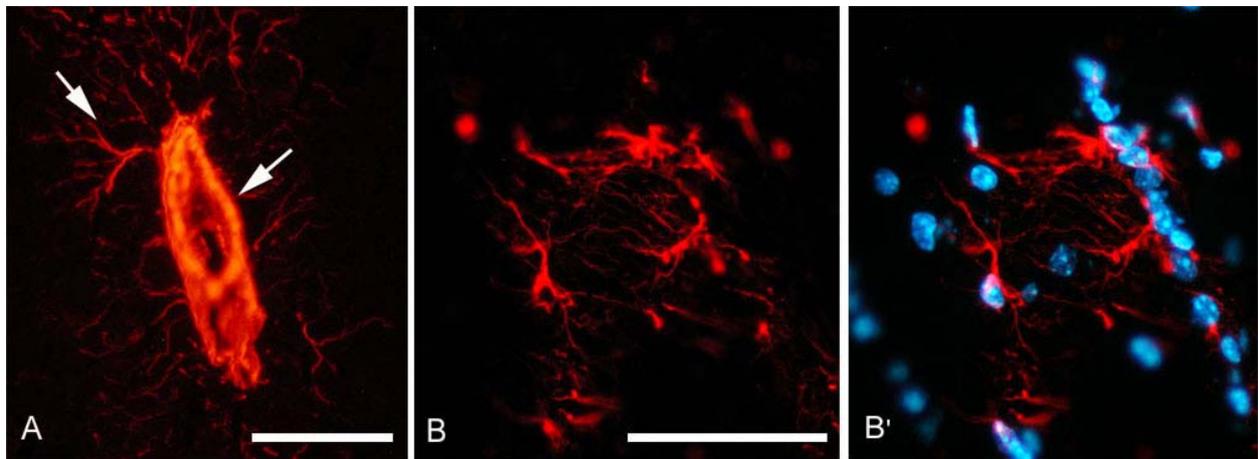


Abb. 3.22: Darstellung von Blutgefäßen durch GFAP-/Glattmuskel-Aktin-Immunfluoreszenz-Doppelfärbung im Großhirn induzierter *GFAP/bar*-transgener Mäuse.

Die GFAP-/Glattmuskel-Aktin-Doppelfärbung im Großhirn induzierter transgener Tiere zeigte eine Ko-Lokalisation von Glattmuskel-Aktin und GFAP in den beobachteten zellkernfreien Bereichen (A), so dass es sich hierbei um vergrößerte Blutgefäße handelte. Parallel waren GFAP-positive Bereiche gleicher Größe zu erkennen die keine Glattmuskel-Färbung zeigten (B, B'). Maßstab: 50 μm (A – C).

3.5.8 Mikroglia-Aktivierung im Großhirn induzierter *GFAP/bar*-Mäuse

Im Großhirn induzierter *GFAP/bar*-Mäuse wurden CD45-Antikörperfärbungen zur Darstellung aktivierter Mikroglia durchgeführt. Durch pathologische Zustände ausgelöste Aktivierung und Proliferation der Mikroglia führt zu Veränderungen ihres molekularen Profils. Das Oberflächen-Glycoprotein CD45 wird hochreguliert und kann so als Marker für deren Aktivierung verwendet werden. Zellen in der weißen Substanz des Corpus Callosum, Zellen in „Clustern“ und Zellen am Rand von Blutgefäßen (Abb. 3.23, A - C) waren deutlich CD45-positiv. Auch der Lateralventrikel (LV) war von Mikroglia umrandet (A). In der Nähe der Kapillaren befanden sich zusätzlich einzelne, runde CD45-exprimierende Zellen (C). Hierbei könnte es sich um amöboide Formen der Mikroglia oder um monozytische Zellen handeln. Innerhalb der Blut-Hirnschranken-Funktion nimmt die perivaskuläre Mikroglia, die sich zwischen Basalmembran und Endothelzellen der Kapillaren befindet, eine wichtige immunmodulatorische Rolle ein. In den *GFAP/bar*-transgenen Mäusen wurde, im Gegensatz zum WT eine deutliche CD45-positive Markierung der Blutgefäßränder, der Umgebung des LV und von Zellen im CC beobachtet (Abb. 3.23, D, E).

3.5.9 Ubiquitin-Akkumulation im Großhirn von induzierten *GFAP/bar*-Mäusen

Im Verlauf der *barnase*-Induktion wurden in den stabilen Klonen und in *CMV/bar*-Primärfibroblasten deutliche Ubiquitin-Ansammlungen im Zellkern beobachtet. Um Zellen zu detektieren, die eine mögliche *barnase*-Expression und demzufolge eine Stressreaktionen zeigten, wurde eine Ubiquitin-Immunfluoreszenz-Färbung durchgeführt. Überraschenderweise fanden sich in einigen Neuronen-„Clustern“ des Großhirns ubiquitinierte, wahrscheinlich zytoplasmatische Ansammlungen (Abb. 3.24, A, Detail: B). Ferner sind im CC immunfluoreszente Zellen zu finden (Abb. 3.24, C). In den Somata dieser nicht klassifizierten Zellen, möglicherweise faszikuläre Astrozyten, erschien die Ubiquitin-Fluoreszenz gleichmäßig. Die Identität der Zellen kann durch Doppel-Immunfluoreszenz-Färbungen geklärt werden. Ubiquitinierte Ansammlungen in Neuronen werden in der Neuropathologie als Zeichen für Neurodegeneration gewertet (Übersicht: Mayer et al., 1996). Das Großhirn von induzierten *GFAP/bar*-Mäusen weist solche Ablagerungen in distinkten Neuronen-„Clustern“ auf, so dass es sich hierbei um degenerierende Neurone handeln könnte.

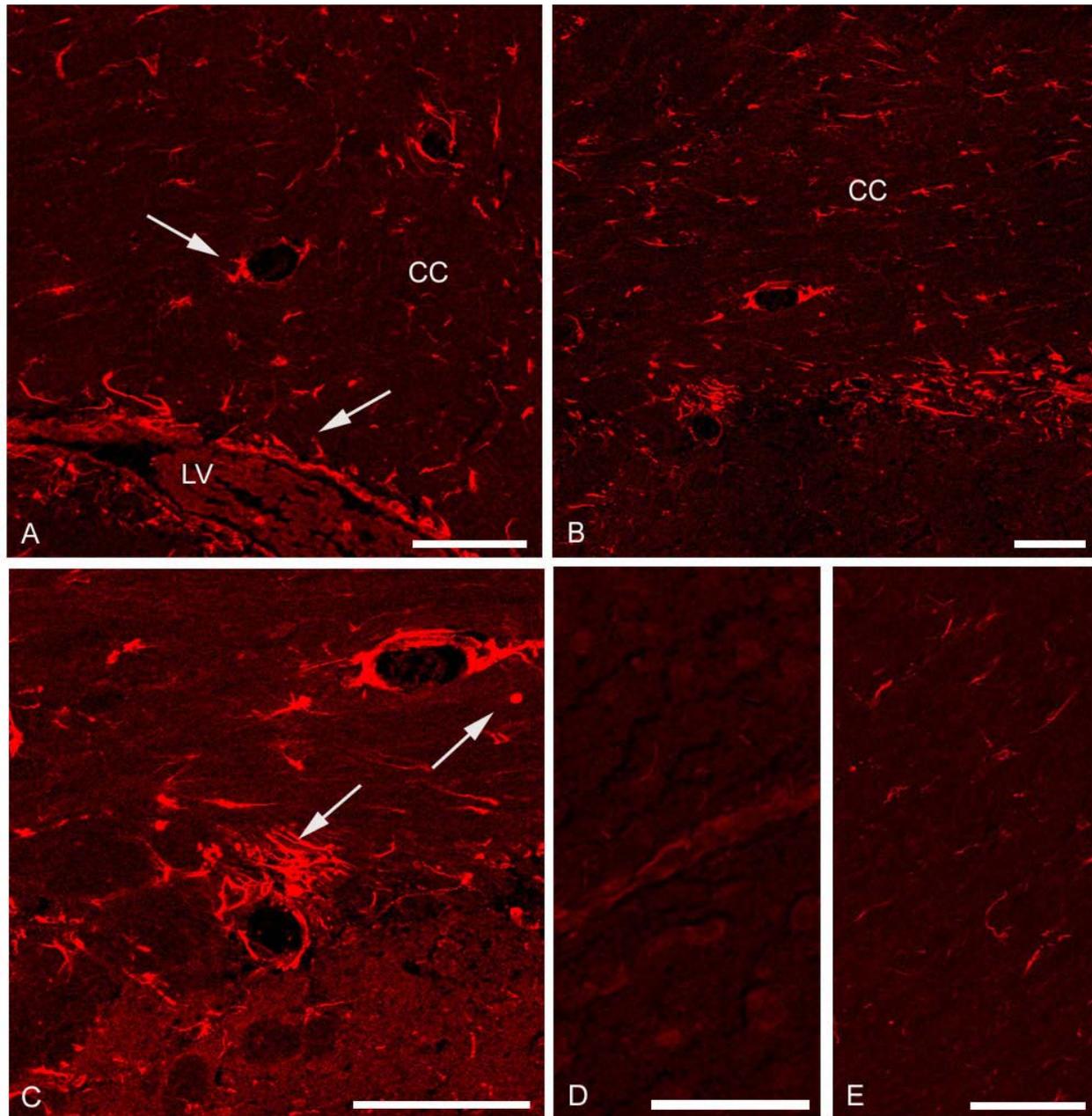


Abb. 3.23: Aktivierte Mikroglia im Großhirn induzierter *GFAP/bar*-transgener Mäuse.

Durch CD45-Immunfluoreszenzfärbungen wurde aktivierte Mikroglia dargestellt. Im Cortex induzierter transgener Tiere wurden CD45-positive Zellen in verschiedenen Bereichen beobachtet (A-C). Direkt am LV (A), an Blutgefäße/Kapillaren (A-C), aber auch in der weißen Substanz des CC (B) war aktivierte Mikroglia durch CD45-Markierung zu erkennen. In der Nähe von Blutgefäßen befanden sich einzelne, runde CD45-exprimierende Zellen (C). Im Gegensatz zu verschiedenen Bereichen des WT-Cortex (D, E), wurde eine deutliche Zunahme CD45-positiver Zellen im Cortex von induzierten transgenen Mäusen beobachtet, besonders in nächster Umgebung von Blutgefäßen (C). Abkürzungen s. Abb. 3.31.

Maßstab: 100 µm (A – E).

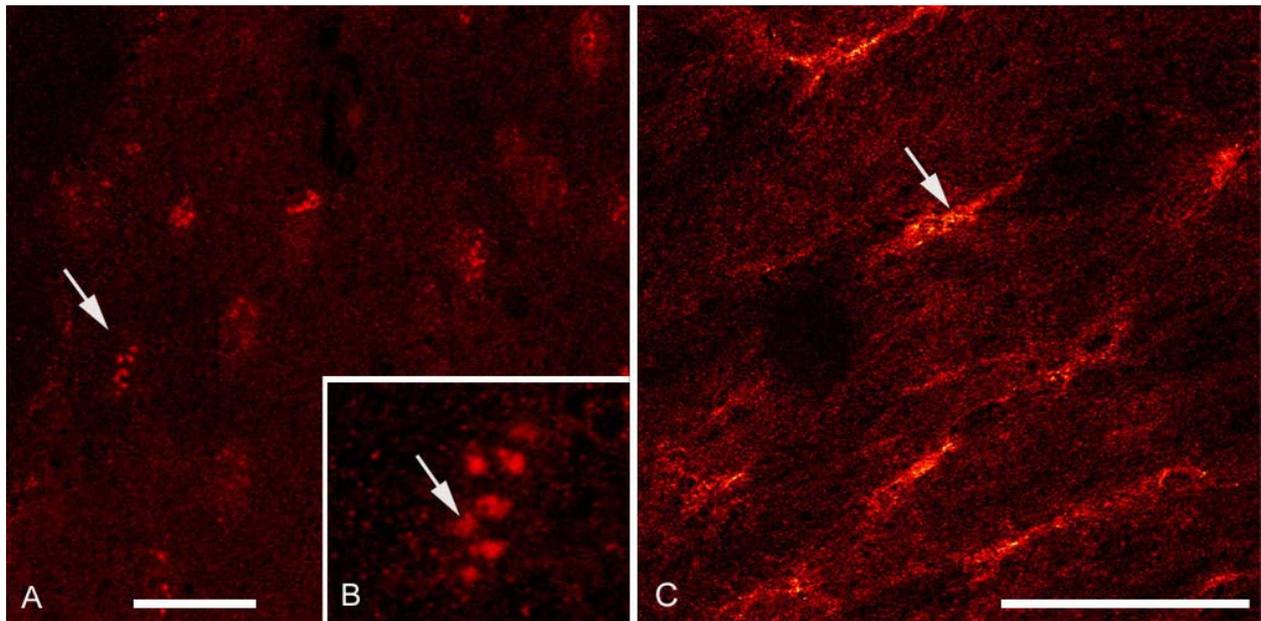


Abb. 3.24: Nachweis von Ubiquitin-Akkumulation im Großhirn induzierter *GFAP/bar*-Mäuse.

Durch Immunfluoreszenzfärbung wurden in wenigen begrenzten Bereichen des Großhirns induzierter *GFAP/bar*-transgener Mäuse runde Ubiquitin-Zusammenlagerungen/-Ablagerungen in Zellen beobachtet (A, Detail: B). Eine gleichmäßig zytoplasmatische Ubiquitin-Lokalisierung war in nicht klassifizierten Zelltypen der weißen Substanz des CC zu erkennen (C). Maßstab: 50 μm (A – D).

3.5.10 Nachweis apoptotischer Zellen im Großhirn von induzierten *GFAP/bar*-Mäusen

Da in Zusammenhang mit der *barnase*-Induktion in Zellkultur und in *CMV/bar*-Mäusen apoptotischer Zelltod durch den Nachweis aktivierter Caspase 3 beobachtet wurde, wurde auch an Großhirn-Schnitten von induzierten *GFAP/bar*-Mäusen eine Caspase 3-Immunfluoreszenzfärbung durchgeführt. Im WT-Cortex waren keine Caspase-positiven Zellen zu erkennen (Abb. 3.25, A). In dem Cortex der induzierten transgenen Tiere konnten einzelne markierte Zellen, der Form und Größe nach Neurone, beobachtet werden (Abb. 3.25, B).

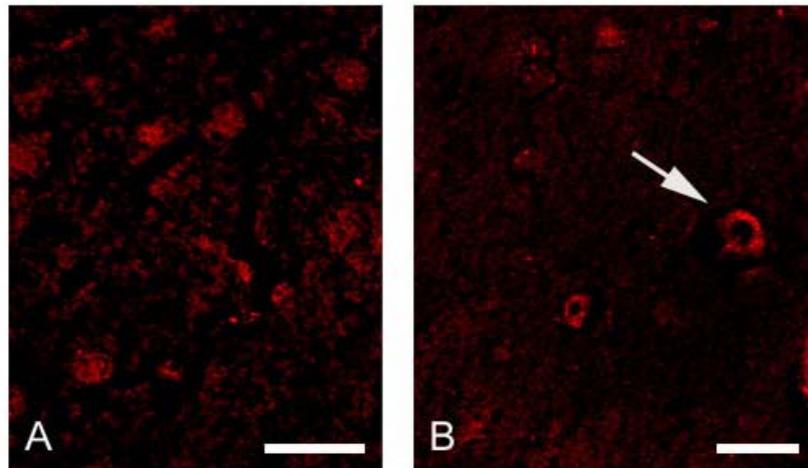


Abb. 3.25: Apoptose-Nachweis im Großhirn induzierter *GFAP/bar*-transgener Mäuse durch Caspase 3-Immunfluoreszenzfärbung.

In verschiedenen Bereichen des WT-Cortexes wurden keine Caspase 3-positiven Zellen beobachtet (A). Im Unterschied dazu wurden im Cortex der induzierten Tiere vereinzelt Markierungen in Somata von Neuronen gefunden (C). Maßstab: 50 μm (A, B).

4 Diskussion

In dem hier vorgestellten konditionalen genetischen Ansatz wurde ein stringentes Tet-abhängiges Expressionssystem in Kombination mit der bakteriellen RNase Barnase für eine Toxingenanwendung getestet. Die Anwendung dieses Systems ermöglicht die Analyse degenerativer Prozesse auch in postmitotischen und wenig proliferativen Zellen des ZNS ohne invasiven Eingriff. Die kontrollierte Toxingenanwendung in der Maus, die sich bisher durch fehlende Regulierbarkeit und hohe Toxizität des verwendeten Diphtheria Toxin-A als schwierig erwies (Lee et al., 1998), sollte durch das hier entwickelte System deutlich verbessert werden.

4.1 Regulation der *barnase*-Expression durch ein modifiziertes Tet-abhängiges-Expressionssystem in Zellkultur

Die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente zeigten, dass ein zeitlich kontrollierbarer Zelltod von doppelt-stabilen Zellen und Primärfibroblasten aus doppelt-transgenen *CMV/bar*-Mäusen durch induzierte *barnase*-Expression möglich ist. Eine Induktion der *barnase*-Expression wurde durch einen viral kontrollierten ebenso wie durch einen neuronenspezifischen Transaktivator erreicht.

Trotz der Verwendung des optimierten Targetpromotors TF, der im Gegensatz zum originalen CMVtet-Promotor (Gossen und Bujard, 1992), in Reporterstudien eine reduzierte Basalexpression der *barnase* zeigte (Leuchtenberger et al. 2001), ist sowohl in stabilen Klonen, als auch in den Primärzellen eine basale *barnase*-Expression im nicht induzierten Zustand durch RT-PCR feststellbar. Diese von den Zellen jedoch tolerierte Basalrate und eine deutliche Steigerung der *barnase*-Expression nach Induktion, die in beiden Zellkulturmodellen zum Zelltod führte, lässt vermuten, dass ein bestimmter Schwellenwert der Barnase für die zytotoxische Wirkung überschritten werden muss. Dafür spricht auch die langsame Kinetik: Systemabhängig dauert es 6 Stunden (rtTA) oder 5 Tage (tTA) bis zur Expressionssteigerung der *barnase* durch Induktion und insgesamt 7 (rtTA) bis 21 Tage (tTA) bis zum fast vollständigem Zelltod (ca. 80 %). Die Bakterienzelle sezerniert die Barnase in den Extrazellularraum, intrazellulär wird sie durch den Inhibitor Barstar geschützt. Das Genprodukt des *barnase*-Konstruktes verbleibt im Zytosol und kann so durch RNA-Abbau seine toxische Wirkung entfalten, wobei auch die eigene mRNA betroffen wäre. Es besteht die Möglichkeit, dass die zytosolische Barnase ihre eigene mRNA degradiert. Dadurch könnte es zu Schwankungen in der intrazellulären Barnase-Konzentration kommen, was einen langsamen und verzögerten Zelltod durch Barnase erklären würde. In einem solchen Fall wäre eine

variierende *barnase*-mRNA-Menge zu erwarten; dieses wurde auch in induzierten *CMV/bar*-Primärfibroblasten und D7-Zellen beobachtet.

Abgesehen von den Effekten der Barnase, könnten die Eigenschaften des TF-Promotors, sowie des Tet-Systems einen Einfluss auf den beobachteten Zelltod haben. Eine verzögerte Expression von Luciferase wurde in Reporterstudien des verwendeten TF-Promotors in Pflanzen beobachtet (Böhner et al., 1999).

Ferner ist in dem konditionalen Tet-Expressionssystem die Aktivierung des Transaktivators abhängig von Induktion (Doxizylin-Wegnahme oder -Zugabe). Durch Wegnahme des Induktors (tTA) wird eine graduelle Expression des Zielgens erreicht. In einer vergleichenden Zellkulturstudie wurde festgestellt, dass durch die lange Halbwertszeit des Doxizyklins die vollständige Aktivierung des Zielgens erst nach 216 Stunden erreicht wurde (im Vergleich: Tetrazyklin: 48 Stunden) (A-Mohammadi et al., 1997). Auch die Aktivierung des rtTA durch Dox-Gabe und Induktion des Zielgens kann durch eine entsprechende Dosierung graduell verlaufen (Kringstein et al., 1998; Blau und Rossi, 1999). Dafür spricht auch die Steigerung der *barnase*-Expression durch eine höhere Dox-Dosis in *CMV/bar*-transgenen Primärfibroblasten. Die zytotoxische Wirkung der Barnase führte erst nach einem langen Induktionszeitraum zum Zelltod, wobei nicht alle Zellen betroffen waren: In Zellkultur starben durch *barnase*-Expression etwa 80 – 90 % ab, 10 – 20 % bleiben vital. Außer einer Verschiebung des Zellzyklus und damit anderer zellulärer Voraussetzungen bei Induktion, besteht bei klonalen Zellen die Möglichkeit, das integrierte System oder die Regulation des Systems bei Proliferation zu verlieren (Gossen und Bujard, 1992; Blau und Rossi, 1999). Die gleiche Beobachtung bei doppelt-transgenen Primärzellen könnte auf „Mosaikexpression“ eines oder beider Transgene hinweisen. Eine „Mosaikexpression“ kann die Funktionalität des Tet-Systems auf eine bestimmte Anzahl Zellen in einem Gewebe reduzieren (Dobie et al., 1997). Durch Methylierung z.B. des transgenen Promotors exprimiert nur ein Teil von gleichartigen Zellen eines Gewebes das Transgen, so dass es auch in verschiedenen Geweben eines Tieres zu unterschiedlicher Mosaikexpression kommen kann. Auch in tTA-transgenen Mauslinien wurde durch Reporter-gen-Aktivierung eine starke Mosaikexpression im Gewebe beobachtet (Furth et al., 1994; Henninghausen et al., 1994, 1995). Die betroffenen Zellen haben prinzipiell die Möglichkeit, die Expression/Aktivität eines unerwünschten Proteins zu beeinträchtigen, z.B. durch Reduktion der Promotoraktivität (z.B. „Silencing“) oder Markierung und Abbau des schädigenden Proteins. Das Abfallen der *barnase*-Expression bei gleich bleibender Referenzgen-Expression in *CMV/bar*-Primärzellen 48 Stunden nach Induktion könnte ein Hinweis auf *cis*-Modifikationen sein. Das gleiche wurde auch bei den D7-Zellen beobachtet.

4.2 Mechanismen des Zelltods nach Induktion der Barnase

Der Mechanismus des Zelltods durch Barnase in eukaryotischen Zellen wurde in der vorliegenden Arbeit genauer analysiert. Die G-spezifische Endonuklease degradiert RNA und hat, wie ihr Homolog die Binase, vermutlich zusätzliche zytotoxische Effekte auf andere zelluläre Bestandteile, die gemeinsam zum Zelltod führen (Makarov et al., 2003).

Die Induktion der *barnase* durch tTA (Klone) und den rtTA (transgene Primärzellen) führte, trotz der unterschiedlichen Kinetik, zu vergleichbaren Stressreaktionen und zum Absterben der Zellen. 24 und 48 Stunden nach Induktion der *barnase* in D7-Zellen wurde eine dem Hitzeschock vergleichbare Reaktion mit Hochregulierung von Hsp70 beobachtet, sowie zeitlich versetzt eine erhöhte Ubiquitin-Expression. Die verstärkte Expression der Hsp70- und Ubiquitin-mRNA nach Induktion korrelierte mit dem immunzytochemischen Nachweis der Steigerung auf Proteinebene in D7-Zellen und den transgenen Primärzellen. Ubiquitin-Aggregate waren in beiden Fällen im Zellkern zu erkennen. Dieser Befund könnte auf Transkriptionsfaktor-Komplexe, ubiquitinierte Proteine oder Histone im Zellkern hinweisen. Ferner sankt die Verfügbarkeit an freiem Ubiquitin kurz vor dem Absterben induzierter Zellen, was als Marker oder sogar Auslöser der Apoptose angesehen werden kann: So wurde eine Verminderung des freien Ubiquitins in apoptotischen Hippocampus-Neuronen und innerhalb der zellulären Stressantwort auf DNA-schädigende Stimuli beobachtet (Tan et al., 2000; Ide et al., 1999). Ebenso beobachtete man eine Abnahme des freien Ubiquitins und eine Zunahme von ubiquitinierten hochmolekularen Proteinen in apoptose-induzierten Jurkat-Zellen (Mimnaugh et al., 2001). Die ausgelöste p53-Aktivierung und daraus folgende apoptotische Vorgänge konnten durch Inhibitoren blockiert werden, die zusätzlich das Tumor-Suppressor-Protein für die Degradation ubiquitinierten. War nicht genug freies Ubiquitin vorhanden, wurde die Apoptose eingeleitet (Tan et al., 2001). Daher könnte die Verminderung des freien Ubiquitins einen Mechanismus darstellen, der durch Stabilisierung von u.a. Transkriptionsfaktoren eine Kaskade des PCD einleitet.

In den doppelt-stabilen Zell-Klonen (CMV/*bar*, NSE/*bar*) war wenige Tage nach *barnase*-Induktion eine Vakuolisierung des Zytoplasmas zu erkennen. Auch ultrastrukturelle Untersuchungen deuteten auf eine bestimmte Form des programmierten Zelltods (PCD) hin, den autophagischen Zelltod. Dieser beginnt mit einer Vermehrung von Lysosomen, einer Vakuolisierung des Zytoplasmas, der Degradation von Organellen und führt erst später zu einer für die Apoptose typischen Kondensierung des Chromatins (Bursch et al., 2001). In elektronenmikroskopischen Aufnahmen induzierter D7-Zellen und CMV/*bar*-Primärzellen wurden elektronendichte Strukturen im Zytoplasma beobachtet, die Autophagosomen gleichen. Besonders charakteristisch sind die Membranstapel der Autophagosomen, die auch in induzierten Zellen dargestellt werden konnten. Autophagie ist ein physiologischer Prozess in

der Zellhomeostase. Es wird vermutet, dass Zellen durch Autophagie Apoptose verzögern können. Ferner wird diskutiert, ob diese Art des PCD besonders in zytoplasmareichen Zellen eine Rolle spielt, die zuerst durch autophagische Lysosomen das Zytoplasma degradieren, bevor Zellkerne betroffen werden. In einigen neuronalen Erkrankungen sind Lysosomen in degenerierten Neuronen zu finden, sie werden als frühe Marker degenerativer Prozesse gewertet (Barlow et al., 2000, Adamec et al., 2000; Kegel et al., 2000). Die *barnase*-induzierten Zellen, doppelt-stabile Klone und *CMV/bar*-transgene Primärzellen, zeigten früh eine Vakuolisierung des Zytoplasmas später auch pyknotische Kerne, apoptotische Körper und aktivierte Caspase 3, so dass aufgrund dieser Befunde von einem PCD durch autophagische Prozesse ausgegangen werden kann. Der Übergang zu apoptotischen Merkmalen in fortgeschrittenen Stadien, wie hier beobachtet, kann fließend sein (Ameisen et al., 2002).

Die langsame Kinetik des Zelltods kann, neben Promotoreigenschaften und Tet-System-abhängigen Gründen auch auf die durch die Barnase ausgelösten autophagischen Mechanismen zurückzuführen sein. So ließe sich auch erklären, dass die Zellen eine *barnase*-Leckexpression tolerieren: Sie könnten eine geringe *barnase*-Expression und die Schäden der Ribonuklease durch autophagische Prozesse kompensieren. Einige Autophagosomen waren auch in uninduzierten D7-Zellen zu erkennen (vgl. Abb. 3.3, B). Durch Induktion wird die Menge der RNase und die ihrer Schäden vergrößert, so dass der Zelltod eingeleitet wird. Die Toleranz der D7-Zellen und der *CMV/bar*-transgenen Primärfibroblasten gegenüber geringen Mengen des Toxins zeigte, dass die Barnase nicht die Toxizität des DT-A besitzt, welches in sehr geringen Mengen zum Zelltod führt und schwer regulierbar ist (Paulus et al., 1997, 1999).

Die Barnase führte durch Degradation von zellulärer und nukleärer RNA zu Modifikationen der Genexpression, zur Veränderung und Inhibition der Proteinsynthese und schließlich zum PCD, bei dem autophagische Mechanismen eine Rolle spielen.

4.3 Anwendung des Barnase/Tet-Systems in *CMV/bar*- und *GFAP/bar*-transgenen Mäusen

Barnase-transgene Mäuse sind lebensfähig, ebenso doppelt-transgene *CMV/bar*- und *GFAP/bar*-Tiere. Die erhöhte Letalität einiger uninduzierter transgener Mäuse (> 1 Jahr) kann auf die beobachtete geringe Leckexpression der *barnase* in einigen Geweben zurückgeführt werden. Man kann annehmen, dass die niedrige *barnase*-Expression dauerhaft in einigen Geweben zu degenerativen Veränderungen und zu unterschiedlichen Krankheitsbildern der älteren Tiere führt. Die Induktion von *CMV/bar*-Primärfibroblasten durch Dox-Gabe in Zellkultur führt zur Expression der *barnase* und zum Zelltod. Die beobachtete Leck-Expression wurde, ebenso wie in D7-Zellen, toleriert, was eine gute Voraussetzung für eine Anwendung *in-situ* darstellt.

Die Induktionszeit der Tiere von mindestens 21 Tagen, sollte, in Anlehnung an den verzögerten Zelltod durch *barnase*-Expression in Zellkultur, einen ausreichenden Zeitraum für die zytotoxische Barnase-Wirkung darstellen. Berücksichtigt werden mussten außerdem die Pharmakokinetik und die unterschiedliche Verfügbarkeit des oral applizierten Dox in den Geweben.

Die Induktion der *barnase*-Expression und somit eine Regulation durch das Tet-Expressionssystem auf transkriptioneller Ebene war auch *in-situ* sowohl durch den *CMV*-, als auch durch den astrozytenspezifischen *GFAP*-kontrollierten Transaktivator möglich. Dabei war die Induktion in den Geweben unterschiedlich, was zum Einen auf die Promotor-bedingten Expressionsunterschiede des Aktivators in Abhängigkeit der Gewebe zurückzuführen sein kann (Kistner et al. 1996; Schultze et al., 1996). Diese Beobachtung traf auf viele, aber nicht alle untersuchten Gewebe zu. Die Aktivatormenge kann ebenso limitierend für eine ausreichende Induktion des Zielgens sein, wie die unterschiedliche Zugänglichkeit und Pharmakokinetik des Induktors in den Geweben, besonders im ZNS (Kistner et al., 1996; Hennighausen et al., 1994). Doxizykline gelangen im Gegensatz zu Tetrazyklinen durch die Blut-Hirn-Schranke ins ZNS, wobei im Liquor nur zwischen 14 % und 30 % des Blutserum-Wertes gemessen werden konnten (Andersson et al. 1976). Durch HPLC-Analysen wurde festgestellt, dass 1 Woche nach oraler Gabe von 2 mg/ml Dox die Dox-Konzentration im Gehirn 1 µM betrug (Smith et al., 2003), weitere Messungen (nach oraler Gabe, sowie nach intraperitonealen Injektionen) zeigten eine für die Transaktivierung ausreichende Dox-Konzentration (Prof. Claus Willecke, pers. Mitteilung). Da in zahlreichen Anwendungen des Tet-Systems im ZNS (s. Kap. 1.4.1.3) eine ausreichende Transaktivierung erreicht werden konnte, kann davon ausgegangen werden, dass die Dox-Konzentration im ZNS in der Regel nicht der limitierende Faktor sein kann. Integrationseffekte der Transgene oder Promotoreigenschaften können zu einer niedrigen

Aktivatorexpression und einer nicht ausreichende Transaktivierung nach Induktion in den Geweben führen.

In Zellkultur war eine dreifache Induktion über der Basalrate ausreichend für einen Zelltod der D7-Zellen. Wäre dieser Wert auch für Gewebe ausreichend, so müsste die Induktion der *barnase*-Expression *in-situ*, im Skelettmuskel, im Großhirn und in der Milz von *CMV/bar*-Mäusen und im Cerebellum und Großhirn von *GFAP/bar*-Mäusen eine Auswirkung auf die betroffenen Zellen haben. Erstaunlicherweise zeigten die *GFAP/bar*- und selbst die *CMV/bar*-transgenen Tiere, bei denen eine allgemeine Morbidität durch die Anzahl der betroffenen Gewebe erwartet wurde, nach 21 Tagen Induktion keine äußeren Veränderungen und keine Krankheitsanzeichen.

Die Induktion der *barnase* könnte für einen Zelltod *in-situ* nicht ausreichend sein, wobei trotz anderer Beispiele die Konzentration von Dox in den Geweben eine Rolle spielen könnte. Ca. 80 % der Primärzellen *CMV/bar*-transgener Mäuse starben in Zellkultur nach 7-tägiger Induktion durch 4 µg/ml ab, so dass ein Zelltod durch *barnase*-Expression prinzipiell *in-situ* möglich sein kann. Eine Erhöhung der Dox-Konzentration führte zu einer Steigerung der *barnase*-Expression und weniger Dox führte zu weniger *barnase*-Transkript (Kringstein et al., 1998; Blau und Rossi, 1999), so dass die Dox-Verfügbarkeit in der *in-situ*-Situation einen Grund darstellen könnte, dass die *barnase*-Expression für einen massiven Zelltod nicht ausreicht oder dieser weiter verzögert wird. Wenn die Dox-Konzentration im ZNS für eine Induktion ausreichend wäre, könnte die *barnase*-Expression dennoch für eine schnelle Toxinwirkung in den Zellen betroffenen Zellen zu gering sein. Ferner kann durch eine Mosaikexpression die Verteilung der beiden Transgene im Gewebe heterogen sein, so dass nur einzelne Zellen/Zellcluster *barnase* exprimieren und nur regionale pathologische Veränderungen zu erwarten wären, die nicht zwangsläufig phänotypische Veränderungen verursachen würden.

Stimmt die Vermutung, dass es eine Korrelation zwischen der Stärke der *barnase*-Expression und dem Zeitpunkt des Zelltods gibt, können die Auswirkungen der Barnase an einem bestimmten Zeitpunkt in Geweben je nach Expressionsstatus des Aktivators und der Verfügbarkeit mit Doxizylin unterschiedlich sein.

4.4 Bewertung der histopathologischen Befunde im ZNS der induzierten transgenen Mäuse

Von besonderem Interesse waren die Effekte der *barnase*-Expression im ZNS induzierter *CMV/bar*- und *GFAP/bar*-Mäuse. In beiden transgenen Linien konnte eine transkriptionelle *barnase*-Expression nach einem Induktionszeitraum von 21 Tagen in Regionen des ZNS beobachtet werden. Die histologischen Befunde zeigten, dass es trotz fehlender phänotypischer Ausprägung zytologische Auswirkungen der *barnase*-Induktion gab, die sich in den transgenen Linien unterschiedlich darstellte. Aufgrund eines fehlenden Antikörpers gegen das Barnase-Protein dienten verschiedene histologische Untersuchungen zur Analyse der möglichen Toxinwirkung auf Zelltypen des ZNS.

In induzierten Mäusen der *CMV/bar*-Linie wurde im Großhirn und Cerebellum eine reaktive Astrogliose beobachtet. Dabei war im Großhirn eine sehr lokale Aktivierung von Astrozyten um einzelne Zellkerne und Blutgefäße herum zu erkennen. Im Cerebellum war im Vergleich zum Wildtyp die Körnerschicht stark GFAP-positiv. Ferner wurden im Großhirn und Hirnstamm „Cluster“ apoptotischer Neurone gefunden, während keine Mikroglia-Aktivierung festgestellt wurde. Diese Befunde weisen auf pathologische Prozesse im ZNS der *CMV/bar*-Mäuse durch *barnase*-Induktion hin. Die sehr abgegrenzte Astrozyten-Aktivierung als Reaktion auf degenerative Prozesse einzelner Zellen und die Beobachtung von wenigen Ansammlungen apoptotischer Neurone, lässt auf sporadisch degenerierende Zellen schließen. Eine Mosaikexpression der Transgene könnte ebenso eine Rolle spielen wie die nicht ausreichende Induktion durch zu niedrige Konzentrationen des Transaktivators oder eine fehlende Verfügbarkeit von Dox. Diese Parameter können theoretisch in den untersuchten Geweben unterschiedlich sein, was die in ihrer Intensität nicht vergleichbare Astrozyten-Aktivierung in Großhirn und Cerebellum erklären könnte. Die Vorgänge in *CMV/bar*-Mäusen nach *barnase*-Induktion müssen durch weitere Untersuchungen, z.B. durch *in-situ*-Hybridisierung oder ein Barnase-Antikörperfärbung aufgeklärt werden, da es unbekannt ist, in welchen Zelltypen des ZNS der virale CMV-Promotor hinreichend aktiviert ist, um die *barnase* in ausreichenden Mengen zu exprimieren. Die gezeigten pathologischen Veränderungen könnten direkte Auswirkung der *barnase*-Expression in Neuronen und/oder Glia oder Wechselwirkungen und Interaktionen dieser in enger Beziehung stehenden Zellen darstellen.

Induzierte *GFAP/bar*-Mäuse zeigten im Vergleich zu *CMV/bar*-Mäusen größtenteils andere histopathologische Veränderungen im ZNS. Durch die Annahme, dass der GFAP-rtTA, wie in Reporteranalysen des verwendeten hGFAP-Promotors untersucht (Nolte et al., 2001), nur in Astrozyten exprimiert wurde, sind die Ergebnisse der histologischen Untersuchung besser

analysier- und interpretierbar als die von induzierten *CMV/bar*-Mäusen. Es kann davon ausgegangen werden, dass die hier beobachtete ZNS-Pathologie auf zelluläre Veränderungen oder das Absterben von Astrozyten durch *barnase*-Expression zurückzuführen ist.

Eine auffällige Veränderung im Vergleich zum Wildtyp ist die große Anzahl von erweiterten Blutgefäßen/Kapillaren im Großhirn, die von aktivierten Astrozyten, als auch von aktivierter Mikroglia umgeben sind. Die dilatierten Blutgefäße waren besonders in Kommissuren (Corpus Callosum) und in der Molekularschicht des Hippocampus zu finden. Ähnliche Beobachtungen in stärkerer Ausprägung wurden im ZNS von GFAP/Vimentin-Doppel-KO-Mäusen gemacht (Pekny et al., 1999). Hier wurde vermutet, dass durch das Fehlen der beider Intermediär-Filamente (IF) die mechanische Stabilität der Endothelzellen, Perivaskulären Zellen (Vimentin) und der die Blutgefäße umgebenden Astrozyten (GFAP) eingeschränkt war, so dass dem Blutdruck keine ausreichende Stabilität entgegen wirken konnte. Im Falle der astrozytären *barnase*-Expression könnte die Abnahme der Vitalität oder das Absterben von Astrozyten in der Umgebung von Blutgefäßen (Blut-Hirn-Schrankenfunktion der Astrozyten) zu deren Erweiterung und zu einer erhöhten Durchlässigkeit der Bluthirnschranke führen. Gerade in der Nähe von Blutgefäßen/Kapillaren wäre eine dauerhaft erhöhte Aktivität des GFAP-Promotors von Astrozyten, und damit auch eine stärkere *barnase*-Expression, durch reaktive Anpassungsvorgänge an die jeweiligen Druckveränderungen möglich. Aktivierte Astrozyten, wie sie um Blutgefäße und um zellfreie Hohlräume im Großhirn induzierter *GFAP/bar*-Mäuse gefunden wurden, waren nach Verlust von Astrozyten durch Verwundung des ZNS und nachfolgendem Absterben proliferierender Astrozyten (GFAP-*HSV-Tk*-transgene Tiere/ Ganciclovir) beobachtet worden (Bush et al., 1999). Dabei wurden in der betroffenen Region dilatierte Blutgefäße und zusätzlich fehlende Verbindungen der Endothelzellen zu Astrozyten gefunden, weiterhin wurden degenerierende Neurone als Folge der absterbenden Glia-Zellen beobachtet. Auch im Großhirn von induzierten *GFAP/bar*-transgenen Mäuse wurden neurodegenerative Anzeichen in Form von Ubiquitin-Akkumulationen in Somata von Neuronen gefunden.

In induzierten *GFAP/bar*-transgenen Mäusen gibt es Hinweise, dass eine *barnase*-Expression in Astrozyten und damit die Beeinträchtigung der Vitalität oder deren Zelltod, Folgen für die Stabilität der Blutgefäße, sowie für das Überleben assoziierter Neurone haben kann. Parallel wurde eine Zunahme der detektierbaren Anzahl von CD45-positiven Zellen (perivaskuläre Mikroglia/Mikroglia) in den betroffenen Regionen beobachtet, die reaktiv durch die pathologischen Vorgänge aktiviert wurden und eine „ramified“ Morphologie zeigten.

4.5 Bewertung des Barnase/Tet-Systems als neue Strategie der kontrollierten Toxingen-Expression für zellspezifische Anwendung im ZNS

Die Zytotoxizität der durch das Tet-System kontrollierten Barnase führte in Zellkultur zum Zelltod von Primärfibroblasten *CMV/bar*-transgener Mäuse, so dass die prinzipielle Funktionalität des Tet-Systems mit einem modifizierten Targetpromotor und einer bakteriellen RNase als Toxin gezeigt wurde.

Die histologischen Untersuchungen der ZNS induzierter *CMV*- oder *GFAP/bar*-Mäuse zeigten, dass eine *barnase*-Expression zu pathologischen Veränderungen in Zelltypen des ZNS führte. Dabei wurden die Erwartungen von einer kompletten Deletion der Zielzellen nicht erfüllt, wobei sich bei den besser interpretierbaren induzierten *GFAP/bar*-Mäusen interessante reaktive Veränderungen im ZNS ergaben, die vergleichbar waren mit Beobachtungen nach Astrozyten-Deletion und GFAP-Knockout (Bush et al., 1999; Pekny et al., 1999). Es wurde deutlich, dass in diesem komplexen Netzwerk von Zellen eine Störgröße zu Interaktionen/Kommunikation führt, so dass Sekundärreaktionen auch nach gezielter Ausschaltung von Zellen kaum vermeidbar sein können. Die histologischen Untersuchungen der Mäuse waren nur ein Zeitfenster der Pathogenese. Die gezielte Anwendung durch gut charakterisierte zelltypspezifische Promotoren, gemeinsam mit genauen Analysen in definierten zeitlichen Abständen, könnten Aufschluss über die Primär- und Sekundärreaktionen geben.

Die Basalexpression der Barnase scheint in einem gewissen Zeitrahmen kein Problem für die Mäuse darzustellen. Die Befunde zeigten viel eher, dass die zytotoxische Barnase auch nach Induktion in zu geringem Maße exprimiert wurde, so dass ein umfassendes Absterben der Astrozyten nicht eintrat. Durch Senkung der Basalrate sollte das originale *CMVtet*-System (Gossen und Bujard, 1992) für Suizidgen-Anwendungen optimiert werden. Diese Reduzierung korrelierte mit einer niedrigeren Induktionsfähigkeit, die dennoch zum Zelltod der doppelt-stabilen Klone und auch der transgenen Primärfibroblasten in Zellkultur führte. Es wäre denkbar, dass sich, wie schon oft beobachtet wurde, die Zellkulturergebnisse nicht auf die *in-situ* Situation übertragen lassen (z.B. Turmaine et al., 2000). Die niedrigere Induktionsfähigkeit des modifizierten Systems reicht möglicherweise nicht aus, um die Barnase in ausreichenden Mengen in den Geweben zu exprimieren. Zusätzlich ist der Aktivator GFAP-Promotor kontrolliert, so dass eine niedrige Aktivatormenge auch darauf zurückzuführen sein könnte. Dieser Promotor ist wenig aktiv, erst bei Veränderung der Zellgestalt sowie Proliferation ist ein hoher Umsatz des Intermediärfilaments zu beobachten. Das Setzen einer Läsion im ZNS von induzierten und nicht induzierten *GFAP/bar*-Mäusen und die Untersuchung der proliferierenden Astrozyten könnte zur Klärung beitragen.

Weiterhin zeigen die Ergebnisse, dass die bakterielle RNase in ihrer Zytotoxizität nicht mit anderen verwendeten Toxinen vergleichbar ist. In Zellkultur wurde eine Leckexpression toleriert, die *barnase*-Expression musste einen Schwellenwert überschreiten und der Zelltod trat verzögert ein.

Die Barnase ist in Kombination mit induzierten Expressionssystemen insofern geeignet, als dass eine ungewollte, aber in diesen Anwendungen vorkommende Leckexpression, nicht sofort zum Tod der betroffenen Zellen führt. Die Toxizität des alternativ verwendeten DT-A war in Zellkultur durch das Tet-Expressionssystem nicht regulierbar, selbst ein modifiziertes, weniger aktives DT-A führte in uninduzierten Zellen zum Tod (Paulus et al., 1997; 1999). In transgenen Anwendungen wurde eine Lebendgeburtrate von 1,75 % der tetO-DTA-transgenen Mäuse erreicht (normal: 10-40 %), obwohl das Transgen transkriptionell nicht aktiv sein sollte (Lee et al., 1998). Das zeigt einerseits die vorhandene Residualaktivität des original CMVtet-Promotors und andererseits die starke Toxizität des DT-A. Durch die Modifikation des Zielpromotors und der Verwendung der Barnase, eines Toxins „mittlerer“ Zytotoxizität (Makarov et al., 2003), wurden zwei Parameter zur Optimierung des Systems für eine Letalgenexpression verändert, was für eine schnelle zytotoxische Wirkung *in-situ* möglicherweise eine zu starke Abschwächung darstellte. Es wurden dennoch zytopathologische Veränderungen im ZNS von induzierten *GFAP/bar*-transgenen Tieren beobachtet, die aus dem Verlust oder einer Funktionseinschränkung betroffener Astrozyten ohne vorherigen invasiven Eingriff resultierten. Dabei waren oft einzelne Zellen/Zellpopulationen betroffen, so dass es möglich sein würde gezielt spezifische Zellen und deren unmittelbares Umfeld ohne vorherige äußere Einwirkungen zu untersuchen.

Insgesamt gesehen könnte die gezielte Ausschaltung von Zellen im ZNS durch Verwendung der Barnase in Kombination mit dem Tet-Expressionssystem erreicht werden. Die Grundvoraussetzungen, lebende Nachkommen und prinzipielle Regulation der Barnase, sind vorhanden. Durch Optimierung der Dox-Dosis, des Zeitraumes der Induktion und durch Verwendung eines Aktivators, der von einem zelltypspezifischen und konstitutiv exprimierten Promotor kontrolliert wird, kann die Induktion optimiert werden. Der verzögerte Zelltod durch die zytotoxische Wirkung der Barnase kann für einige Anwendungen vorteilhaft sein. Gerade degenerative Erkrankungen im ZNS sind oft durch langsame Progression gekennzeichnet (z.B. Jellinger et al., 2002), so dass die Eigenschaft der Barnase als Toxin für eine Simulationen geeignet wäre.

Literaturverzeichnis

- Adamec, E., Mohan, P. S., Cataldo, A. M., Vonsattel, J. P., and Nixon, R. A. (2000). Up-regulation of the lysosomal system in experimental models of neuronal injury: implications for Alzheimer's disease. *Neuroscience* **100**, 663-75.
- Adrain, C., and Martin, S. J. (2001). The mitochondrial apoptosome: a killer unleashed by the cytochrome seas. *Trends Biochem Sci* **26**, 390-7.
- Ameisen, J. C. (2002). On the origin, evolution, and nature of programmed cell death: a timeline of four billion years. *Cell Death Differ* **9**, 367-93.
- Andersson, H., and Alestig, K. (1976). The penetration of doxycycline into CSF. *Scand J Infect Dis Suppl*, 17-9.
- Ankarcrona, M., Dypbukt, J. M., Bonfoco, E., Zhivotovsky, B., Orrenius, S., Lipton, S. A., and Nicotera, P. (1995). Glutamate-induced neuronal death: a succession of necrosis or apoptosis depending on mitochondrial function. *Neuron* **15**, 961-73.
- Barbosa, E. R., Limongi, J. C., and Cummings, J. L. (1997). Parkinson's disease. *Psychiatr Clin North Am* **20**, 769-90.
- Besnard, F., Brenner, M., Nakatani, Y., Chao, R., Purohit, H. J., and Freese, E. (1991). Multiple interacting sites regulate astrocyte-specific transcription of the human gene for glial fibrillary acidic protein. *J Biol Chem* **266**, 18877-83.
- Bi, Y. M., Rothstein, S. J., and Wildeman, A. G. (2001). A novel strategy for regulated expression of a cytotoxic gene. *Gene* **279**, 175-9.
- Bignami, A., Eng, L. F., Dahl, D., and Uyeda, C. T. (1972). Localization of the glial fibrillary acidic protein in astrocytes by immunofluorescence. *Brain Res* **43**, 429-35.
- Bilsland, A. E., Anderson, C. J., Fletcher-Monaghan, A. J., McGregor, F., Evans, T. R., Ganly, I., Knox, R. J., Plumb, J. A., and Keith, W. N. (2003). Selective ablation of human cancer cells by telomerase-specific adenoviral suicide gene therapy vectors expressing bacterial nitroreductase. *Oncogene* **22**, 370-80.
- Blau, H. M., and Rossi, F. M. (1999). Tet B or not tet B: advances in tetracycline-inducible gene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 797-9.
- Bohner, S., Lenk, I. I., Rieping, M., Herold, M., and Gatz, C. (1999). Technical advance: transcriptional activator TGTV mediates dexamethasone-inducible and tetracycline-inactivatable gene expression. *Plant J* **19**, 87-95.
- Borrelli, E., Heyman, R., Hsi, M., and Evans, R. M. (1988). Targeting of an inducible toxic phenotype in animal cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**, 7572-6.
- Bredesen, D. E. (1995). Neural apoptosis. *Ann Neurol* **38**, 839-51.

- Breitman, M. L., Clapoff, S., Rossant, J., Tsui, L. C., Glode, L. M., Maxwell, I. H., and Bernstein, A. (1987). Genetic ablation: targeted expression of a toxin gene causes microphthalmia in transgenic mice. *Science* **238**, 1563-5.
- Brenner, M. (1994). Structure and transcriptional regulation of the GFAP gene. *Brain Pathol* **4**, 245-57.
- Brenner, M., Kisseberth, W. C., Su, Y., Besnard, F., and Messing, A. (1994). GFAP promoter directs astrocyte-specific expression in transgenic mice. *J Neurosci* **14**, 1030-7.
- Brenner, M., and Messing, A. (1996). GFAP Transgenic Mice. *Methods* **10**, 351-64.
- Bridgewater, J. A., Springer, C. J., Knox, R. J., Minton, N. P., Michael, N. P., and Collins, M. K. (1995). Expression of the bacterial nitroreductase enzyme in mammalian cells renders them selectively sensitive to killing by the prodrug CB1954. *Eur J Cancer* **31A**, 2362-70.
- Budihardjo, I., Oliver, H., Lutter, M., Luo, X., and Wang, X. (1999). Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis. *Annu Rev Cell Dev Biol* **15**, 269-90.
- Bursch, W. (2001). The autophagosomal-lysosomal compartment in programmed cell death. *Cell Death Differ* **8**, 569-81.
- Bursch, W., Ellinger, A., Gerner, C., Frohwein, U., and Schulte-Hermann, R. (2000). Programmed cell death (PCD). Apoptosis, autophagic PCD, or others? *Ann N Y Acad Sci* **926**, 1-12.
- Bush, T. G., Puvanachandra, N., Horner, C. H., Polito, A., Ostefeld, T., Svendsen, C. N., Mucke, L., Johnson, M. H., and Sofroniew, M. V. (1999). Leukocyte infiltration, neuronal degeneration, and neurite outgrowth after ablation of scar-forming, reactive astrocytes in adult transgenic mice. *Neuron* **23**, 297-308.
- Bush, T. G., Savidge, T. C., Freeman, T. C., Cox, H. J., Campbell, E. A., Mucke, L., Johnson, M. H., and Sofroniew, M. V. (1998). Fulminant jejuno-ileitis following ablation of enteric glia in adult transgenic mice. *Cell* **93**, 189-201.
- Cai, J., Yang, J., and Jones, D. P. (1998). Mitochondrial control of apoptosis: the role of cytochrome c. *Biochim Biophys Acta* **1366**, 139-49.
- Chen, A., Muzzio, I. A., Malleret, G., Bartsch, D., Verbitsky, M., Pavlidis, P., Yonan, A. L., Vronskaya, S., Grody, M. B., Cepeda, I., Gilliam, T. C., and Kandel, E. R. (2003). Inducible enhancement of memory storage and synaptic plasticity in transgenic mice expressing an inhibitor of ATF4 (CREB-2) and C/EBP proteins. *Neuron* **39**, 655-69.
- Chen, J., Kelz, M. B., Zeng, G., Sakai, N., Steffen, C., Shockett, P. E., Picciotto, M. R., Duman, R. S., and Nestler, E. J. (1998). Transgenic animals with inducible, targeted gene expression in brain. *Mol Pharmacol* **54**, 495-503.
- Chomczynski, P., and Sacchi, N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* **162**, 156-9.

- Chtarto, A., Bender, H. U., Hanemann, C. O., Kemp, T., Lehtonen, E., Levivier, M., Brotchi, J., Velu, T., and Tenenbaum, L. (2003). Tetracycline-inducible transgene expression mediated by a single AAV vector. *Gene Ther* **10**, 84-94.
- Ciechanover, A. (1998). The ubiquitin-proteasome pathway: on protein death and cell life. *Embo J* **17**, 7151-60.
- Clark, A. J., Iwobi, M., Cui, W., Crompton, M., Harold, G., Hobbs, S., Kamalati, T., Knox, R., Neil, C., Yull, F., and Gusterson, B. (1997). Selective cell ablation in transgenic mice expression E. coli nitroreductase. *Gene Ther* **4**, 101-10.
- Cohen, G., and Heikkila, R. E. (1974). The generation of hydrogen peroxide, superoxide radical, and hydroxyl radical by 6-hydroxydopamine, dialuric acid, and related cytotoxic agents. *J Biol Chem* **249**, 2447-52.
- Cortez, N., Trejo, F., Vergara, P., and Segovia, J. (2000). Primary astrocytes retrovirally transduced with a tyrosine hydroxylase transgene driven by a glial-specific promoter elicit behavioral recovery in experimental parkinsonism. *J Neurosci Res* **59**, 39-46.
- Cui, W., Allen, N. D., Skynner, M., Gusterson, B., and Clark, A. J. (2001). Inducible ablation of astrocytes shows that these cells are required for neuronal survival in the adult brain. *Glia* **34**, 272-82.
- Cui, W., Gusterson, B., and Clark, A. J. (1999). Nitroreductase-mediated cell ablation is very rapid and mediated by a p53-independent apoptotic pathway. *Gene Ther* **6**, 764-70.
- Culver, K. W., Ram, Z., Wallbridge, S., Ishii, H., Oldfield, E. H., and Blaese, R. M. (1992). In vivo gene transfer with retroviral vector-producer cells for treatment of experimental brain tumors. *Science* **256**, 1550-2.
- Cummings, C. J., Mancini, M. A., Antalffy, B., DeFranco, D. B., Orr, H. T., and Zoghbi, H. Y. (1998). Chaperone suppression of aggregation and altered subcellular proteasome localization imply protein misfolding in SCA1. *Nat Genet* **19**, 148-54.
- Czlonkowska, A., Kurkowska-Jastrzebska, I., Czlonkowski, A., Peter, D., and Stefano, G. B. (2002). Immune processes in the pathogenesis of Parkinson's disease - a potential role for microglia and nitric oxide. *Med Sci Monit* **8**, RA165-77.
- Davies, S. W., Turmaine, M., Cozens, B. A., DiFiglia, M., Sharp, A. H., Ross, C. A., Scherzinger, E., Wanker, E. E., Mangiarini, L., and Bates, G. P. (1997). Formation of neuronal intranuclear inclusions underlies the neurological dysfunction in mice transgenic for the HD mutation. *Cell* **90**, 537-48.
- Delaney, C. L., Brenner, M., and Messing, A. (1996). Conditional ablation of cerebellar astrocytes in postnatal transgenic mice. *J Neurosci* **16**, 6908-18.

- Djeha, A. H., Hulme, A., Dexter, M. T., Mountain, A., Young, L. S., Searle, P. F., Kerr, D. J., and Wrighton, C. J. (2000). Expression of Escherichia coli B nitroreductase in established human tumor xenografts in mice results in potent antitumoral and bystander effects upon systemic administration of the prodrug CB1954. *Cancer Gene Ther* **7**, 721-31.
- Dobie, K., Mehtali, M., McClenaghan, M., and Lathe, R. (1997). Variegated gene expression in mice. *Trends Genet* **13**, 127-30.
- Drabek, D., Guy, J., Craig, R., and Grosveld, F. (1997). The expression of bacterial nitroreductase in transgenic mice results in specific cell killing by the prodrug CB1954. *Gene Ther* **4**, 93-100.
- Earnshaw, W. C., Martins, L. M., and Kaufmann, S. H. (1999). Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis. *Annu Rev Biochem* **68**, 383-424.
- Eddleston, M., and Mucke, L. (1993). Molecular profile of reactive astrocytes--implications for their role in neurologic disease. *Neuroscience* **54**, 15-36.
- Ewald, D., Li, M., Efrat, S., Auer, G., Wall, R. J., Furth, P. A., and Hennighausen, L. (1996). Time-sensitive reversal of hyperplasia in transgenic mice expressing SV40 T antigen. *Science* **273**, 1384-6.
- Fedoroff, S., Ahmed, I., Opas, M., and Kalnins, V. I. (1987). Organization of microfilaments in astrocytes that form in the presence of dibutyryl cyclic AMP in cultures, and which are similar to reactive astrocytes in vivo. *Neuroscience* **22**, 255-66.
- Fedoroff, S., and Hao, C. (1991). Origin of microglia and their regulation by astroglia. *Adv Exp Med Biol* **296**, 135-42.
- Felsher, D. W., and Bishop, J. M. (1999). Reversible tumorigenesis by MYC in hematopoietic lineages. *Mol Cell* **4**, 199-207.
- Forster, K., Helbl, V., Lederer, T., Urlinger, S., Wittenburg, N., and Hillen, W. (1999). Tetracycline-inducible expression systems with reduced basal activity in mammalian cells. *Nucleic Acids Res* **27**, 708-10.
- Freundlieb, S., Schirra-Muller, C., and Bujard, H. (1999). A tetracycline controlled activation/repression system with increased potential for gene transfer into mammalian cells. *J Gene Med* **1**, 4-12.
- Furth, P. A., St Onge, L., Boger, H., Gruss, P., Gossen, M., Kistner, A., Bujard, H., and Hennighausen, L. (1994). Temporal control of gene expression in transgenic mice by a tetracycline-responsive promoter. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 9302-6.
- Goldman, M. H., Goldberg, R. B., and Mariani, C. (1994). Female sterile tobacco plants are produced by stigma-specific cell ablation. *Embo J* **13**, 2976-84.
- Gonsior, S. M., Platz, S., Buchmeier, S., Scheer, U., Jockusch, B.M. and Hinssen (1994). Conformational difference between nuclear and cytoplasmic actin as detected by a monoclonal antibody. *J Cell Sci* **112**, 797-809.

- Gossen, M., and Bujard, H. (1992). Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 5547-51.
- Gossen, M., Freundlieb, S., Bender, G., Muller, G., Hillen, W., and Bujard, H. (1995). Transcriptional activation by tetracyclines in mammalian cells. *Science* **268**, 1766-9.
- Haltia, M., Viitanen, M., Sulkava, R., Ala-Hurula, V., Poyhonen, M., Goldfarb, L., Brown, P., Levy, E., Houlden, H., Crook, R., and et al. (1994). Chromosome 14-encoded Alzheimer's disease: genetic and clinicopathological description. *Ann Neurol* **36**, 362-7.
- Hartley, R. W. (1989). Barnase and barstar: two small proteins to fold and fit together. *Trends Biochem Sci* **14**, 450-4.
- Hennighausen, L., Wall, R. J., Tillmann, U., Li, M., and Furth, P. A. (1995). Conditional gene expression in secretory tissues and skin of transgenic mice using the MMTV-LTR and the tetracycline responsive system. *J Cell Biochem* **59**, 463-72.
- Herr, W. (1998). The herpes simplex virus VP16-induced complex: mechanisms of combinatorial transcriptional regulation. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **63**, 599-607.
- Hetts, S. W. (1998). To die or not to die: an overview of apoptosis and its role in disease. *Jama* **279**, 300-7.
- Heyman, R. A., Borrelli, E., Lesley, J., Anderson, D., Richman, D. D., Baird, S. M., Hyman, R., and Evans, R. M. (1989). Thymidine kinase obliteration: creation of transgenic mice with controlled immune deficiency. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**, 2698-702.
- Hoffmann, A., Villalba, M., Journot, L., and Spengler, D. (1997). A novel tetracycline-dependent expression vector with low basal expression and potent regulatory properties in various mammalian cell lines. *Nucleic Acids Res* **25**, 1078-9.
- Honing, S., Kreimer, G., Robenek, H. and Jockusch, B.M. (1994). Receptor-mediated endocytosis is sensitive to antibodies against the uncoating ATPase (hsc70). *J Cell Scis.* **107**, 1185-96
- Ide, T., Takada, K., Qiu, J. H., Saito, N., Kawahara, N., Asai, A., and Kirino, T. (1999). Ubiquitin stress response in postischemic hippocampal neurons under nontolerant and tolerant conditions. *J Cereb Blood Flow Metab* **19**, 750-6.
- Ilinskaya, O. N., Karamova, N. S., Ivanchenko, O. B., and Kipenskaya, L. V. (1996). SOS-inducing ability of native and mutant microbial ribonucleases. *Mutat Res* **354**, 203-9.
- Isles, A. R., Ma, D., Milsom, C., Skynner, M. J., Cui, W., Clark, J., Keverne, E. B., and Allen, N. D. (2001). Conditional ablation of neurones in transgenic mice. *J Neurobiol* **47**, 183-93.
- Janzer, R. C., and Raff, M. C. (1987). Astrocytes induce blood-brain barrier properties in endothelial cells. *Nature* **325**, 253-7.
- Jellinger, K. A. (2002). Recent developments in the pathology of Parkinson's disease. *J Neural Transm Suppl*, 347-76.

- Kafri, T., van Praag, H., Gage, F. H., and Verma, I. M. (2000). Lentiviral vectors: regulated gene expression. *Mol Ther* **1**, 516-21.
- Kamper, M. R., Gohla, G., and Schluter, G. (2002). A novel positive tetracycline-dependent transactivator (rtTA) variant with reduced background activity and enhanced activation potential. *FEBS Lett* **517**, 115-20.
- Kegel, K. B., Kim, M., Sapp, E., McIntyre, C., Castano, J. G., Aronin, N., and DiFiglia, M. (2000). Huntingtin expression stimulates endosomal-lysosomal activity, endosome tubulation, and autophagy. *J Neurosci* **20**, 7268-78.
- Kelekar, A., and Thompson, C. B. (1998). Bcl-2-family proteins: the role of the BH3 domain in apoptosis. *Trends Cell Biol* **8**, 324-30.
- Kelz, M. B., Kuszak, J. R., Yang, Y., Ma, W., Steffen, C., Al-Ghoul, K., Zhang, Y. J., Chen, J., Nestler, E. J., and Spector, A. (2000). DeltaFosB-induced cataract. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **41**, 3523-38.
- Kerr, J. F., Wyllie, A. H., and Currie, A. R. (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* **26**, 239-57.
- Kettenmann, H., and Ilchner, S. (1993). Physiological properties of microglia. *Clin Neuropathol* **12**, 306-7.
- Keyvani, K., Baur, I., and Paulus, W. (1999). Tetracycline-controlled expression but not toxicity of an attenuated diphtheria toxin mutant. *Life Sci* **64**, 1719-24.
- Kiechle, F. L., and Zhang, X. (2002). Apoptosis: biochemical aspects and clinical implications. *Clin Chim Acta* **326**, 27-45.
- Kim, T. W., Pettingell, W. H., Hallmark, O. G., Moir, R. D., Wasco, W., and Tanzi, R. E. (1997). Endoproteolytic cleavage and proteasomal degradation of presenilin 2 in transfected cells. *J Biol Chem* **272**, 11006-10.
- Kirchhoff, F., Dringen, R., and Giaume, C. (2001). Pathways of neuron-astrocyte interactions and their possible role in neuroprotection. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* **251**, 159-69.
- Kistner, A., Gossen, M., Zimmermann, F., Jerecic, J., Ullmer, C., Lubbert, H., and Bujard, H. (1996). Doxycycline-mediated quantitative and tissue-specific control of gene expression in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 10933-8.
- Kitada, T., Asakawa, S., Hattori, N., Matsumine, H., Yamamura, Y., Minoshima, S., Yokochi, M., Mizuno, Y., and Shimizu, N. (1998). Mutations in the parkin gene cause autosomal recessive juvenile parkinsonism. *Nature* **392**, 605-8.
- Knowlton, A. A. (1994). Heat-shock proteins, stress, and the heart. *Ann N Y Acad Sci* **723**, 128-37.

- Knox, R. J., Friedlos, F., Biggs, P. J., Flitter, W. D., Gaskell, M., Goddard, P., Davies, L., and Jarman, M. (1993). Identification, synthesis and properties of 5-(aziridin-1-yl)-2-nitro-4-nitrosobenzamide, a novel DNA crosslinking agent derived from CB1954. *Biochem Pharmacol* **46**, 797-803.
- Kringstein, A. M., Rossi, F. M., Hofmann, A., and Blau, H. M. (1998). Graded transcriptional response to different concentrations of a single transactivator. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 13670-5.
- Kulich, S. M., and Chu, C. T. (2003). Role of reactive oxygen species in extracellular signal-regulated protein kinase phosphorylation and 6-hydroxydopamine cytotoxicity. *J Biosci* **28**, 83-9.
- Lamartina, S., Roscilli, G., Rinaudo, C. D., Sporeno, E., Silvi, L., Hillen, W., Bujard, H., Cortese, R., Ciliberto, G., and Toniatti, C. (2002). Stringent control of gene expression in vivo by using novel doxycycline-dependent trans-activators. *Hum Gene Ther* **13**, 199-210.
- Landel, C. P., Zhao, J., Bok, D., and Evans, G. A. (1988). Lens-specific expression of recombinant ricin induces developmental defects in the eyes of transgenic mice. *Genes Dev* **2**, 1168-78.
- Larsen, K. E., and Sulzer, D. (2002). Autophagy in neurons: a review. *Histol Histopathol* **17**, 897-908.
- Lee, P., Morley, G., Huang, Q., Fischer, A., Seiler, S., Horner, J. W., Factor, S., Vaidya, D., Jalife, J., and Fishman, G. I. (1998). Conditional lineage ablation to model human diseases. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 11371-6.
- Leist, M., and Nicotera, P. (1997). The shape of cell death. *Biochem Biophys Res Commun* **236**, 1-9.
- Lem, J., Applebury, M. L., Falk, J. D., Flannery, J. G., and Simon, M. I. (1991). Tissue-specific and developmental regulation of rod opsin chimeric genes in transgenic mice. *Neuron* **6**, 201-10.
- Leuchtenberger, S., Perz, A., Gatz, C., and Bartsch, J. W. (2001). Conditional cell ablation by stringent tetracycline-dependent regulation of barnase in mammalian cells. *Nucleic Acids Res* **29**, E76.
- Liu, X., Alexander, V., Vijayachandra, K., Bhogte, E., Diamond, I., and Glick, A. (2001). Conditional epidermal expression of TGFbeta 1 blocks neonatal lethality but causes a reversible hyperplasia and alopecia. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 9139-44.
- Liuzzi, F. J., and Lasek, R. J. (1987). Astrocytes block axonal regeneration in mammals by activating the physiological stop pathway. *Science* **237**, 642-5.
- Lotharius, J., and Brundin, P. (2002). Pathogenesis of Parkinson's disease: dopamine, vesicles and alpha-synuclein. *Nat Rev Neurosci* **3**, 932-42.

- Macario, A. J., and de Macario, E. C. (1999). The archaeal molecular chaperone machine: peculiarities and paradoxes. *Genetics* **152**, 1277-83.
- MacLellan, W. R., and Schneider, M. D. (1997). Death by design. Programmed cell death in cardiovascular biology and disease. *Circ Res* **81**, 137-44.
- Makarov, A. A., and Ilinskaya, O. N. (2003). Cytotoxic ribonucleases: molecular weapons and their targets. *FEBS Lett* **540**, 15-20.
- Mansuy, I. M., Winder, D. G., Moallem, T. M., Osman, M., Mayford, M., Hawkins, R. D., and Kandel, E. R. (1998). Inducible and reversible gene expression with the rtTA system for the study of memory. *Neuron* **21**, 257-65.
- Mariani, C., Goldberg, R. B., and Leemans, J. (1991). Engineered male sterility in plants. *Symp Soc Exp Biol* **45**, 271-9.
- Masood, K., Besnard, F., Su, Y., and Brenner, M. (1993). Analysis of a segment of the human glial fibrillary acidic protein gene that directs astrocyte-specific transcription. *J Neurochem* **61**, 160-6.
- Mathis, C., Hindelang, C., LeMeur, M., and Borrelli, E. (2000). A transgenic mouse model for inducible and reversible dysmyelination. *J Neurosci* **20**, 7698-705.
- Mayer, R. J., Tipler, C., Arnold, J., Laszlo, L., Al-Khedhairi, A., Lowe, J., and Landon, M. (1996). Endosome-lysosomes, ubiquitin and neurodegeneration. *Adv Exp Med Biol* **389**, 261-9.
- Mayford, M., Bach, M. E., Huang, Y. Y., Wang, L., Hawkins, R. D., and Kandel, E. R. (1996). Control of memory formation through regulated expression of a CaMKII transgene. *Science* **274**, 1678-83.
- Mimnaugh, E. G., Kayastha, G., McGovern, N. B., Hwang, S. G., Marcu, M. G., Trepel, J., Cai, S. Y., Marchesi, V. T., and Neckers, L. (2001). Caspase-dependent deubiquitination of monoubiquitinated nucleosomal histone H2A induced by diverse apoptogenic stimuli. *Cell Death Differ* **8**, 1182-96.
- Minelli, A., Brecha, N. C., Karschin, C., DeBiasi, S., and Conti, F. (1995). GAT-1, a high-affinity GABA plasma membrane transporter, is localized to neurons and astroglia in the cerebral cortex. *J Neurosci* **15**, 7734-46.
- Moolten, F. L., and Wells, J. M. (1990). Curability of tumors bearing herpes thymidine kinase genes transferred by retroviral vectors. *J Natl Cancer Inst* **82**, 297-300.
- Morimoto, R. I. (1993). Cells in stress: transcriptional activation of heat shock genes. *Science* **259**, 1409-10.
- Morimoto, T., Ide, T., Ihara, Y., Tamura, A., and Kirino, T. (1996). Transient ischemia depletes free ubiquitin in the gerbil hippocampal CA1 neurons. *Am J Pathol* **148**, 249-57.
- Nestler, E. J., Kelz, M. B., and Chen, J. (1999). DeltaFosB: a molecular mediator of long-term neural and behavioral plasticity. *Brain Res* **835**, 10-7.

- Nixon, R. A., and Cataldo, A. M. (1993). The lysosomal system in neuronal cell death: a review. *Ann N Y Acad Sci* **679**, 87-109.
- Nolte, C., Matyash, M., Pivneva, T., Schipke, C. G., Ohlemeyer, C., Hanisch, U. K., Kirchhoff, F., and Kettenmann, H. (2001). GFAP promoter-controlled EGFP-expressing transgenic mice: a tool to visualize astrocytes and astrogliosis in living brain tissue. *Glia* **33**, 72-86.
- Oppenheim, R. W. (1997). Related mechanisms of action of growth factors and antioxidants in apoptosis: an overview. *Adv Neurol* **72**, 69-78.
- Palmiter, R. D., Behringer, R. R., Quaife, C. J., Maxwell, F., Maxwell, I. H., and Brinster, R. L. (1987). Cell lineage ablation in transgenic mice by cell-specific expression of a toxin gene. *Cell* **50**, 435-43.
- Park, J., Kim, I., Oh, Y. J., Lee, K., Han, P. L., and Choi, E. J. (1997). Activation of c-Jun N-terminal kinase antagonizes an anti-apoptotic action of Bcl-2. *J Biol Chem* **272**, 16725-8.
- Parks, G. D., Young, V. A., Koumenis, C., Wansley, E. K., Layer, J. L., and Cooke, K. M. (2002). Controlled cell killing by a recombinant nonsegmented negative-strand RNA virus. *Virology* **293**, 192-203.
- Paulus, W., Baur, I., Oberer, D. M., Breakefield, X. O., and Reeves, S. A. (1997). Regulated expression of the diphtheria toxin A gene in human glioma cells using prokaryotic transcriptional control elements. *J Neurosurg* **87**, 89-95.
- Pekny, M., Johansson, C. B., Eliasson, C., Stakeberg, J., Wallen, A., Perlmann, T., Lendahl, U., Betsholtz, C., Berthold, C. H., and Frisen, J. (1999). Abnormal reaction to central nervous system injury in mice lacking glial fibrillary acidic protein and vimentin. *J Cell Biol* **145**, 503-14.
- Priault, M., Chaudhuri, B., Clow, A., Camougrand, N., and Manon, S. (1999). Investigation of bax-induced release of cytochrome c from yeast mitochondria permeability of mitochondrial membranes, role of VDAC and ATP requirement. *Eur J Biochem* **260**, 684-91.
- Prior, T. I., FitzGerald, D. J., and Pastan, I. (1991). Barnase toxin: a new chimeric toxin composed of pseudomonas exotoxin A and barnase. *Cell* **64**, 1017-23.
- Prior, T. I., FitzGerald, D. J., and Pastan, I. (1992). Translocation mediated by domain II of Pseudomonas exotoxin A: transport of barnase into the cytosol. *Biochemistry* **31**, 3555-9.
- Prior, T. I., Kunwar, S., and Pastan, I. (1996). Studies on the activity of barnase toxins in vitro and in vivo. *Bioconjug Chem* **7**, 23-9.
- Ridet, J. L., Alonso, G., Chauvet, N., Chapron, J., Koenig, J., and Privat, A. (1996). Immunocytochemical characterization of a new marker of fibrous and reactive astrocytes. *Cell Tissue Res* **283**, 39-49.

- Rinkenberger, J. L., and Korsmeyer, S. J. (1997). Errors of homeostasis and deregulated apoptosis. *Curr Opin Genet Dev* **7**, 589-96.
- Robertson, A., Perea, J., Tolmachova, T., Thomas, P. K., and Huxley, C. (2002). Effects of mouse strain, position of integration and tetracycline analogue on the tetracycline conditional system in transgenic mice. *Gene* **282**, 65-74.
- Rossi, F. M., and Blau, H. M. (1998). Recent advances in inducible gene expression systems. In "Curr Opin Biotechnol", Vol. 9, pp. 451-6.
- Rothstein, J. D., Dykes-Hoberg, M., Pardo, C. A., Bristol, L. A., Jin, L., Kuncl, R. W., Kanai, Y., Hediger, M. A., Wang, Y., Schielke, J. P., and Welty, D. F. (1996). Knockout of glutamate transporters reveals a major role for astroglial transport in excitotoxicity and clearance of glutamate. *Neuron* **16**, 675-86.
- Rudge, J. S., and Silver, J. (1990). Inhibition of neurite outgrowth on astroglial scars in vitro. *J Neurosci* **10**, 3594-603.
- Ryding, A. D., Sharp, M. G., and Mullins, J. J. (2001). Conditional transgenic technologies. *J Endocrinol* **171**, 1-14.
- Salomon, B., Lores, P., Pioche, C., Racz, P., Jami, J., and Klatzmann, D. (1994). Conditional ablation of dendritic cells in transgenic mice. *J Immunol* **152**, 537-48.
- Sander, A., Guth, A., Brenner, H. R., and Witzemann, V. (2000). Gene transfer into individual muscle fibers and conditional gene expression in living animals. *Cell Tissue Res* **301**, 397-403.
- Savill, J. (1997a). Apoptosis in resolution of inflammation. *J Leukoc Biol* **61**, 375-80.
- Savill, J. (1997b). Recognition and phagocytosis of cells undergoing apoptosis. *Br Med Bull* **53**, 491-508.
- Schipper, H. M. (1996). Astrocytes, brain aging, and neurodegeneration. *Neurobiol Aging* **17**, 467-80.
- Schuldiner, M., Itskovitz-Eldor, J., and Benvenisty, N. (2003). Selective ablation of human embryonic stem cells expressing a "Suicide" gene. *Stem Cells* **21**, 257-65.
- Schultze, N., Burki, Y., Lang, Y., Certa, U., and Bluethmann, H. (1996). Efficient control of gene expression by single step integration of the tetracycline system in transgenic mice. *Nat Biotechnol* **14**, 499-503.
- Schwartz, L. M., Smith, S. W., Jones, M. E., and Osborne, B. A. (1993). Do all programmed cell deaths occur via apoptosis? *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 980-4.
- Shah, R. M., Spirn, P. W., Salazar, A. M., Steiner, R. M., Cohn, H. E., Solit, R. W., Wechsler, R. J., and Erdman, S. (1993). Localization of peripheral pulmonary nodules for thoroscopic excision: value of CT-guided wire placement. *AJR Am J Roentgenol* **161**, 279-83.

- Shimura, H., Hattori, N., Kubo, S., Mizuno, Y., Asakawa, S., Minoshima, S., Shimizu, N., Iwai, K., Chiba, T., Tanaka, K., and Suzuki, T. (2000). Familial Parkinson disease gene product, parkin, is a ubiquitin-protein ligase. *Nat Genet* **25**, 302-5.
- Shin, M. K., Levorse, J. M., Ingram, R. S., and Tilghman, S. M. (1999). The temporal requirement for endothelin receptor-B signalling during neural crest development. *Nature* **402**, 496-501.
- Sidman, R. L., Augevine, J. B. (1971). Atlas Of The Mouse Brain and Spinal Cord. *Cambridge, mass., Harvard University Press*
- Smith, D. L., Woodman, B., Mahal, A., Sathasivam, K., Ghazi-Noori, S., Lowden, P. A., Bates, G. P., and Hockly, E. (2003). Minocycline and doxycycline are not beneficial in a model of Huntington's disease. *Ann Neurol* **54**, 186-96.
- Steller, H. (1995). Mechanisms and genes of cellular suicide. *Science* **267**, 1445-9.
- Susin, S. A., Lorenzo, H. K., Zamzami, N., Marzo, I., Snow, B. E., Brothers, G. M., Mangion, J., Jacotot, E., Costantini, P., Loeffler, M., Larochette, N., Goodlett, D. R., Aebersold, R., Siderovski, D.P., Penninger, J.M., and Kroemer, G. (1999). Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature* **397**, 441-6.
- Tan, Z., Qu, W., Tu, W., Liu, W., Baudry, M., Schreiber, S. (2000). P53 accumulation due to downregulation of ubiquitin: relevance for neuronal apoptosis. *Cell Death Differ* **7**, 675-81.
- Tan, Z., Tu, W., Schreiber, S. (2001). Downregulation of free ubiquitin: a novel mechanism of p53 stabilization and neuronal cell death. *Mol Brain Research* **91**, 179-88.
- Triezenberg, S. J., Kingsbury, R. C., and McKnight, S. L. (1988). Functional dissection of VP16, the trans-activator of herpes simplex virus immediate early gene expression. *Genes Dev* **2**, 718-29.
- Turmaine, M., Raza, A., Mahal, A., Mangiarini, L., Bates, G. P. and Davies, S. W. (2000). Nonapoptotic neurodegeneration in a transgenic mouse model of Huntington's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 8093-7.
- Ungerstedt, U. (1968). 6-Hydroxy-dopamine induced degeneration of central monoamine neurons. *Eur J Pharmacol* **5**, 107-10.
- Urlinger, S., Baron, U., Thellmann, M., Hasan, M. T., Bujard, H., and Hillen, W. (2000). Exploring the sequence space for tetracycline-dependent transcriptional activators: novel mutations yield expanded range and sensitivity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 7963-8.
- van den Eijnde, S. M., Luijsterburg, A. J., Boshart, L., De Zeeuw, C. I., van Dierendonck, J. H., Reutelingsperger, C. P., and Vermeij-Keers, C. (1997). In situ detection of apoptosis during embryogenesis with annexin V: from whole mount to ultrastructure. *Cytometry* **29**, 313-20.

- van Engeland, M., Nieland, L. J., Ramaekers, F. C., Schutte, B., and Reutelingsperger, C. P. (1998). Annexin V-affinity assay: a review on an apoptosis detection system based on phosphatidylserine exposure. *Cytometry* **31**, 1-9.
- van Leeuwen, F. W., de Kleijn, D. P., van den Hurk, H. H., Neubauer, A., Sonnemans, M. A., Sluijs, J. A., Koycu, S., Ramdjielal, R. D., Salehi, A., Martens, G. J., Grosveld, F. G., Peter, J., Burbach, H., and Hol, E. M. (1998). Frameshift mutants of beta amyloid precursor protein and ubiquitin-B in Alzheimer's and Down patients. *Science* **279**, 242-7.
- Walker, P. R., and Sikorska, M. (1997). New aspects of the mechanism of DNA fragmentation in apoptosis. *Biochem Cell Biol* **75**, 287-99.
- Welch, W. J. (1993). How cells respond to stress. *Sci Am* **268**, 56-64.
- Weller, M., Schulz, J. B., Wullner, U., Loschmann, P. A., Klockgether, T., and Dichgans, J. (1997). Developmental and genetic regulation of programmed neuronal death. *J Neural Transm Suppl* **50**, 115-23.
- Wiesinger, H. (2001). Arginine metabolism and the synthesis of nitric oxide in the nervous system. *Prog Neurobiol* **64**, 365-91.
- Wyllie, A. H. (1986). What is apoptosis? *Histopathology* **10**, 995-8.
- Yamaizumi, M., Mekada, E., Uchida, T., and Okada, Y. (1978). One molecule of diphtheria toxin fragment A introduced into a cell can kill the cell. *Cell* **15**, 245-50.
- Yamamoto, A., Lucas, J. J., and Hen, R. (2000). Reversal of neuropathology and motor dysfunction in a conditional model of Huntington's disease. *Cell* **101**, 57-66.
- Yamamoto, S., Jiang, H., Nishikawa, K., Ishihara, M., Wang, J. C. and Kato, R. (1992). Proteinkinase C-dependent and -independent actions of a potent protein kinase C inhibitor, staurosporine. (1992) *Eur. J. Pharmacol* **227**, 113-22.
- Zhu, Z., Ma, B., Homer, R. J., Zheng, T., and Elias, J. A. (2001). Use of the tetracycline-controlled transcriptional silencer (tTS) to eliminate transgene leak in inducible overexpression transgenic mice. *J Biol Chem* **276**, 25222-9.
- Zielasek, J., and Hartung, H. P. (1996). Molecular mechanisms of microglial activation. *Adv Neuroimmunol* **6**, 191-22.

Anhang

I. Abbildungsverzeichnis

- **Abb. 3.1:** *Barnase*-Expressionsanalysen von neuronalen Neuro2A NSE-tTA/bar- und CHO CMV-tTA/bar-stabilen Zellen (D7) mittels RT- und Realtime-PCR.
- **Abb. 3.2:** Darstellung morphologischer Veränderungen von D7- und neuronalen NSE-tTA/bar-stabilen Zellen nach Induktion durch Hellfeld-Aufnahmen und Kernfärbung.
- **Abb. 3.3:** Darstellung von ultrastrukturellen Veränderungen induzierter D7-Zellen durch EM.
- **Abb. 3.4:** Hsp70- und Ubiquitin-Expression induzierter und nicht induzierter D7-Zellen wurden durch spezifische RT-PCR dargestellt.
- **Abb. 3.5:** Reaktive Veränderungen induzierter D7-Zellen: Vergleichende Hsp70- und Ubiquitin-Immunfärbungen und Westernblot. Aufnahmen durch Fluoreszenz-Mikroskopie (FLM).
- **Abb. 3.6:** Apoptose-Nachweis von induzierten D7-Zellen durch Caspase-3-Immunfluoreszenzfärbung.
- **Abb. 3.7:** RT-PCR-Analyse der Dox-induzierten *barnase*-Expression von *CMV/bar*-transgenen Primärfibroblasten und die Darstellung des Zelltods (Hellfeld-Aufnahmen).
- **Abb. 3.8:** Darstellung der Kernmorphologie induzierter *CMV/bar*-transgener Primärzellen im Vergleich zu Wildtyp-, sowie uninduzierten transgenen Primärzellen durch Bisbenzimid. Quantitative Auswertung der Kernflächen und Korrelation zwischen pyknotischen Zellkernen und Induktion.
- **Abb. 3.9:** Ultrastrukturelle Veränderungen induzierter *CMV/bar*-Primär-Fibroblasten durch EM.
- **Abb.3.10:** Darstellung der Hsp70-Immunfluoreszenz und deren Korrelation zum Auftreten pyknotischer Kerne induzierter *CMV/bar*-transgener Primärfibroblasten.

- **Abb. 3.11:** Ubiquitin-Immunfluoreszenzfärbungen von *CMV/bar*-Primärfibroblasten nach Dox-Induktion.
- **Abb. 3.12:** Apoptose-Nachweis von induzierten *CMV/bar*-Primärfibroblasten durch Caspase 3-Immunfluoreszenz.
- **Abb. 3.13:** Die RT-PCR-Analyse und *barnase*-Realtime-PCR zeigen *rtTA*- und *barnase*-Expression in Geweben induzierter *CMV/bar*-Mäuse.
- **Abb. 3.14:** Vergleichende RT-PCR-Analyse unterschiedlicher Gewebe uninduzierter und induzierter *CMV/bar*-Mäuse hinsichtlich der *barnase*-Expression.
- **Abb. 3.15:** RT-PCR-Analyse und Real-Time-PCR von Geweben des ZNS induzierter *GFAP/bar*-Mäuse (*rtTA*- und *barnase*-Expression).
- **Abb. 3.16:** Darstellung von neuronalen Zellen der *CMV/bar*-Mäuse durch Nissl-Färbung.
- **Abb. 3.17:** Darstellung von Astrozyten im Großhirn induzierter *CMV/bar*-transgener Tiere durch GFAP-Immunfluoreszenzfärbung.
- **Abb. 3.18:** Darstellung von Astrozyten im Cerebellum induzierter *CMV/bar*-transgener Tiere durch GFAP-Immunfluoreszenzfärbung.
- **Abb. 3.19:** Apoptose-Nachweis im Großhirn und Hirnstamm von induzierten *CMV/bar*-transgenen Mäusen durch Caspase 3-Immunfluoreszenzfärbung.
- **Abb. 3.20:** Darstellung von Neuronen und Glia im Großhirn induzierter *GFAP/bar*-transgener Tiere durch Nissl-Färbung.
- **Abb. 3.21:** Darstellung von Astrozyten mittels GFAP-Immunfluoreszenzfärbung im Großhirn von induzierten *GFAP/bar*-transgenen Tieren.
- **Abb. 3.22:** Darstellung von Blutgefäßen durch GFAP-/Glattmuskel-Aktin-Immunfluoreszenz-Doppelfärbung im Großhirn induzierter *GFAP/bar*-transgener Tiere.
- **Abb. 3.23:** CD45-Immunfluoreszenzfärbung zur Darstellung aktivierter Mikroglia im Großhirn induzierter *GFAP/bar*-transgener Mäuse.

- **Abb. 3.24:** Nachweis von Ubiquitin-Akkumulation im Großhirn induzierter *GFAP/bar*-Mäuse durch Immunfluoreszenz.
- **Abb. 3.25:** Apoptose-Nachweis im Großhirn induzierter *GFAP/bar*-transgener Mäuse durch Caspase 3-Immunfluoreszenzfärbung.

II. Abkürzungsverzeichnis

AA	Acrylamid
Abb	Abbildung
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
Barnase	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> ribonuklease
BG	Bergmann Glia
bidest	Bidestilliert
bp	Basenpaare
BS	Hirnstamm
BSA	Bovine Serum Albumin
C	Cytosin
CARD	Caspase recruitment domain
Cbr	Großhirn
Cbl	Cerebellum
CC	Corpus Callosum
cDNA	Copy DNA
CE	Cerebellum
CHO	Chinese hamster ovary
cm	Zentimeter
CMF-PBS (PBS ⁻)	Calcium-und Magnesium-freie phosphatgepufferte Saline
CMV	Cytomegalie-Virus
CO ₂	Kohlendioxid
d	Tage

Anhang

ddH ₂ O	bidestilliertes Wasser
DED	Death Effector Domain
Dox	Doxizylin
DMEM	Dulbecco`s Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP`S	Desoxyribonukleotide
DT-A	Diphtheria-Toxin A
DTT	1,4-Dithiothreitol
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
et al.	Et alii (und andere)
EtOH	Ethanol
FCS	Fötales Rinderserum
G	Guanin
g	Gramm
g	Erdbeschleunigung
G418	Geneticin
GCV	Ganciclovir
GFAP	Glial Fibrillary Acidic Protein
h	Stunde
h	Human
H ₂ O	Wasser
HBS	HEPES-gepufferte Saline
HEPES	N-2-hydroxyethylpiperazin-N`-2-ethansulfonsäure
HSE	Hitzeschock-Element

Anhang

HSF	Hitzeschock-Faktor
Hsp	Hitzeschock-Protein
HSV	Herpes-Simplex-Virus
IgG	Immunglobulin
In-situ	Im Organismus
K	Körnerschicht
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
liq	Flüssig
LV	Lateralventrikel
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
M	Molar
M	Molekularschicht
mA	Milliampere
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
MMTV	Maus Mammary Tumor Virus
MPTP	1-Methyl-4-Phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridin
mRNA	Messenger-RNA
Neo	Neomycin
ng	Nanogramm
NSE	Neuron Specific Enolase
Ntr	Nitroreduktase
O.D.	Optische Dichte

Anhang

PCD	Programmierter Zelltod
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PD	Parkinson`sche Erkrankung
PE	Pseudomonas Endotoxin A
pg	Pikogramm
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehung pro Minute
RT	Raumtemperatur
RT	Reverse Transkription
rtTA	Reverser tetrazyklinabhängiger Transaktivator
SC	Rückenmark
SDS	Sodiumdodecylsulfat
sec	Sekunde
SKM	Skelettmuskel
SSC	Standard-Saline-Citrat-Puffer
SV40	Simian Virus 40
T	Thymin
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TE	Tris-EDTA-Puffer
Tet	tetrazyklinabhängig
tetO	Tet-Operatorsequenz
tetR	Tet-Repressor
TF	TopFree
TG	Transgen

Anhang

TNF	Tumor-Nekrosefaktor
TK	Thymidinkinase
Tris	Tris-(Hydroxymethyl)-aminomethan
tTA	Tetrazyklinabhängiger Transaktivator
U	Definierte Einheit eines Enzyms (Unit)
ü.N	Über Nacht
UV	Ultraviolettes Licht
V	Volt
v/v	Volumenprozent
Vol	Volumen
Vs	Voltsekunden
WT	Wildtyp
w/v	Gewichtprozent
ZNS	Zentrales Nervensystem

III. Sequenzen

TF - Promotor - Sequenz:

EcoRI Sac I

GAATTCGAGCTCGGTACAACCTCCCCTAGACATATCCTACTCTATCATTGATAGAGTGACCCTTCCATAG
 ACATATCCTACTCTATCATTGATAGAGTGACCCTTCCACTAGGTTCACTTTTCTCTATCATTGATAGGGA
 GTGGTAAACAATTGATGGACAAAATCTATCAATGATAGAGAGTGTCATGTTACTAGTATTGTTCTTCTCTA
 TCATTGATAGTGACTTTGCCTAATCACTTAGCAACTCTATCATTGATAGAGTTCTAGTATTAGCAAGGCC
 TTTCTCTATATAAGGAAGTTCATTTCACTTTGGAGAAGATCCCCGGG

Sma I

In rot: TATA-Box

In grün: Operator-Sequenzen

Barnase-Sequenz:

CCTAGGCCCATGTTGCAAACTGCCCAACGCCTAATAGAAGTCTGT
 ATAGTATTCGATGGACTATTAATGTAATGTTTTAGTCTTCGTGTTCTGGGAGCCGACCCACCGTA
 GTTTTCCCTTGGAACGTCTGCAGCGAGGCCCTTTTCGTAGCCGCCTCTGTAGAAGAGTTTTGC
 CCTCCGTTTGAGGGCCCGTTTTTCGCCTGCTTGTACCGCACTTCGCCTATAATTGATATGTAGT
 CCGAAGTCTTTAAGTCTGGCCTAAGAAATGAGTTCGCTGACCGACTAAATGTTTTGTTGCCTGG
 TAATAGTCTGGAAATGTTTTTAGTCTATTGCTTTTTTTGCCGAAGGACGCCTCCGGCAAAAAA
 GTCGAAATGTATTTACACATTATTTAAAAGAAGTTTGAGACTAGCCAGTT

Barnase-Konstrukt aus pVE113:



Danksagung

Ich möchte mich vor allem bei PD Dr. Jörg Bartsch für die Betreuung dieser Arbeit und für seine Diskussionsbereitschaft und Motivationsfähigkeit danken.

Seine Begeisterungsfähigkeit für wissenschaftliche Fragestellungen ist ansteckend.

Bei Prof. Dr. Christian Kaltschmidt möchte ich mich ganz herzlich für die Erstellung des Zweitgutachtens bedanken.

Diese Arbeit wurde am Lehrstuhl für Entwicklungsbiologie und molekulare Pathologie von Prof. Dr. H. Jockusch erstellt. Sie wurde innerhalb des Graduiertenkollegs „Zelluläre Grundlagen biotechnischer Prozesse“ begonnen und durch ein Abschlussstipendium der Universität Bielefeld weiterfinanziert, wobei ich mich bei Frau Schnoor für ihr Engagement bedanken möchte. Ferner möchte ich mich für die finanzielle Unterstützung bei der R. A. Oetker Stiftung, Bielefeld bedanken.

Dr. Peter Heimann und Renate Piwek danke ich für die Erstellung der Elektronenmikroskopischen Aufnahmen.

Bei Daniel „Ebl“ Eberhard möchte ich mich für die Einarbeitung in histologische Techniken und Hilfestellungen in Hard- Soft- und Nervenproblemen bedanken.

Ferner bedanke ich mich bei Ralf Palmisano für die Einführung in die konfokale Mikroskopie, die Arbeit an dem bar-RNA-Oligo, die leider noch keine Früchte getragen hat, und natürlich auch für die unterhaltsamen Mittagspausen.

Weiterhin möchte ich mich bei der W7-Truppe für die angenehme Arbeitsatmosphäre danken, Dr. Peter Heimann, der bei 1000 und 1 er Frage zu Rate gezogen wurde, und natürlich meiner Arbeitsgruppe, die ich absolut weiterempfehlen kann!

Mit Silvia Naus, Dirk Wildeboer, Angela Perz u.a. konnte man sich glücklicherweise auch wunderbar über nicht fachliche Dinge unterhalten. Die Bilderwand am Kühlschrank ist kult.

Danke auch an Rene´, die letzte Zeit war mit Sicherheit etwas nervig.

Zum Schluss möchte ich meiner Familie danken, besonders meinen Eltern, die mich immer unterstützt haben.

Versicherung

Ich versichere, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig verfasst, keine anderen Quellen und Hilfsmittel als die angegebenen benutzt und die Stellen der Arbeit, die anderen Werken im Wortlaut oder Sinn nach entnommen sind, unter Angabe der Quelle als Entlehnung kenntlich gemacht habe. Das gleiche gilt auch graphische Darstellungen und Fotos.

Bielefeld, 17. Oktober 2003
