

Technische Universität München
Lehrstuhl für Entwicklungsgenetik

Untersuchung des CRH/CRH-Rezeptor
Systems mit Hilfe Zelltyp-spezifisch
CRH-überexprimierender Mauslinien

Martin Ableitner

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. A. Gierl

Prüfer der Dissertation: 1. Univ.-Prof. Dr. W. Wurst

2. Univ.-Prof. A. Schnieke, Ph. D.

Die Dissertation wurde am 28.07.2009 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt am 23.12.2009 angenommen.

Der Fortgang der wissenschaftlichen Entwicklung
ist im Endeffekt eine ständige Flucht vor dem Staunen
(Albert Einstein)

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	8
1.1	Das physiologische Stress-System	8
1.1.1	Die Stressreaktion	8
1.1.2	Die Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren Achse	9
1.1.3	Die Familie CRH-verwandter Neuropeptide und ihrer Rezeptoren	11
1.1.4	Die Rolle von CRH als Neuromodulator	15
1.2	Dysregulationen des CRH-Systems	16
1.2.1	Endogene Depression - Major Depression	17
1.2.2	CRH und Depression	19
1.3	Tiermodelle	20
1.3.1	Konventionelle CRH-überexprimierende Tiermodelle	22
1.3.2	Konditional CRH-überexprimierende Tiermodelle	23
1.4	Zielsetzung	26
2	MATERIAL	27
2.1	Geräte	27
2.2	Chemikalien und Lösungen	28
2.3	Enzyme	29
2.4	Nukleotide und Nukleinsäuren	30
2.5	Kits und Verbrauchsmaterial	30
2.6	Puffer und Medien	31
2.6.1	Puffer und Medien für die Bakterienkultur	31
2.6.2	Puffer und Medien für die Zellkultur	32
2.6.3	Sonstige Puffer und Medien	33
2.7	Antikörper und Konjugate	35

2.8	BAC- und Fosmid-Klone	35
2.9	Plasmide	36
2.10	Organismen.....	36
2.10.1	Bakterienstämme	36
2.10.2	Säuger-Zelllinien.....	37
2.10.3	Mauslinien.....	37
2.11	DNA-und mRNA-Sonden	37
2.11.1	DNA-Sonden.....	37
2.11.2	mRNA- Sonden.....	37
2.12	Oligonukleotide.....	38
2.12.1	Genotypisierungsprimer	38
2.12.2	Klonierungs-Primer und -Oligonukleotide.....	39
2.12.3	Sonstige Primer und Oligos.....	41
3	METHODEN.....	43
3.1	Arbeiten mit Bakterien	43
3.1.1	Kultivierung von Bakterien.....	43
3.1.2	Herstellung elektrokompenter <i>E. coli</i> Bakterien.....	43
3.1.3	Herstellung chemokompenter <i>E. coli</i> Bakterien.....	44
3.1.4	Transformation von Bakterien	44
3.1.4.1	Hitzeschocktransformation.....	44
3.1.4.2	Elektroporation.....	45
3.1.5	Anlegen von Glycerolstocks	45
3.2	Arbeiten mit Nukleinsäuren.....	45
3.2.1	Plasmidpräparation aus Bakterien.....	45
3.2.1.1	Minipräparation.....	46
3.2.1.2	Midi- und Maxipräparation	46
3.2.1.3	BAC-Präparation.....	46
3.2.2	DNA Fällung mittels Ethanolpräzipitation	47
3.2.3	DNA Isolation mittels Chloroform/Phenol Extraktion	47
3.2.4	DNA Präparation aus Mausschwanzgewebe.....	48

3.2.5	Restriktionsverdau von DNA	48
3.2.6	Agarose-Gelelektrophorese	48
3.2.7	Gelextraktion	49
3.2.7.1	Gelextraktion von DNA <10kb	49
3.2.7.2	Gelextraktion von DNA >10 kb	49
3.2.8	DNA Ligation	50
3.2.8.1	Ligation mit T4 DNA Ligase	50
3.2.8.2	TOPO-TA Ligation	51
3.2.9	Polymerase Kettenreaktion (Polymerase Chain Reaction)	51
3.2.9.1	Standard PCR	52
3.2.9.2	PCR zum Anfügen von DNA Sequenzen	53
3.2.9.3	PCR zur Aneinanderfügung von DNA Elementen (overlapping PCR)	54
3.2.9.4	Splinkerette PCR	55
3.2.9.5	Kolonie-PCR	57
3.2.10	PCR Aufreinigung	57
3.2.11	Sequenzierung	57
3.2.12	RED/ET Klonierung	57
3.2.13	Radioaktive DNA-Hybridisierung	59
3.2.13.1	DNA Isolation	59
3.2.13.2	Restriktionsverdau und Elektrophorese	60
3.2.13.3	DNA Transfer (Southern Blot)	60
3.2.13.4	Radioaktive Markierung der Hybridsierungs-Sonde	60
3.2.13.5	Hybridisierung der radioaktiv markierten Sonde	61
3.2.14	Kolonie Abklatsch (Colony Lift)	62
3.2.15	RNA-Isolation	62
3.2.16	Reverse Transkription	63
3.2.17	RACE-PCR	64
3.2.18	Konzentrationsbestimmung von DNA und RNA	65
3.3	In-Situ-Hybridisierung	65
3.3.1	Radioaktive Markierung der Sonde	65
3.3.2	Vorbehandlung der Gefrierschnitte	66
3.3.3	Hybridisierung der radioaktiv markierten Sonde	67
3.3.4	Waschen der Gefrierschnitte nach der Hybridisierung	67
3.3.5	Entwickeln	68

3.3.6	Nissl Färbung	69
3.4	Doppel-In-Situ-Hybridisierung.....	69
3.4.1	Herstellung der DIG-markierten Sonde	69
3.4.1.1	DIG-Markierung der Sonde	69
3.4.1.2	Konzentrationsbestimmung der DIG Sonde	70
3.4.2	Vorbereitung der Gefrierschnitte	70
3.4.3	Hybridisierung der Sonden.....	71
3.4.4	Waschen der Gefrierschnitte nach der Hybridisierung	71
3.4.5	Entwicklung des DIG Signals	72
3.5	In-Situ Quantifizierung.....	73
3.6	Immunohistochemie	74
3.6.1	Anti-Cre Immunohistochemie.....	74
3.6.2	Anti-GFP Immunohistochemie	75
3.7	LacZ-Färbung.....	76
3.8	Arbeiten mit Säuger-Zelllinien	77
3.8.1	Kultur von Human-Embryo-Kidney (HEK293) Zellen	77
3.8.2	Transfektion von HEK293 Zellen.....	77
3.8.2.1	Vorbehandlung der Deckgläschen	77
3.8.2.2	Transfektion von HEK293-Zellen mit <i>Lipofectamine</i> TM 2000.....	78
3.8.3	Kultur von embryonalen Stammzellen.....	78
3.8.3.1	Kultivierung von Feeder-Zellen.....	78
3.8.3.2	Elektroporation und Selektion der ES-Zellen	79
3.8.3.3	Splitten und Einfrieren der ES-Zell-Klone.....	79
3.8.3.4	Analyse der ES-Zell-Klone	80
3.8.3.5	Expansion und Injektion positiver Klone.....	80
3.9	Erzeugung, Zucht und Analyse der transgenen Mauslinien	81
3.9.1	Pronucleus-Injektion	81
3.9.2	Blastocysten-Injektion.....	81
3.9.3	Mauslinien.....	82
3.9.4	Anfertigen von Gefrierschnitten.....	83
3.9.5	Blutentnahme und Corticosteron-Messung.....	84

3.9.6	Verhaltensphänotypisierung.....	85
3.9.6.1	Open-Field Test.....	85
3.9.6.2	Elevated-Plus-Maze Test.....	85
3.9.6.3	Dark-Light-Box Test.....	86
3.9.6.4	Forced-Swim Test.....	86
3.9.7	Statistik.....	87
4	ERGEBNISSE.....	88
4.1	Generierung und Analyse der Linie CRH-COE_{Dlx}.....	88
4.1.1	Generierung konditional CRH überexprimierender Mäuse.....	88
4.1.2	Expressionsanalyse.....	88
4.1.2.1	Analyse der CRH-Überexpression mittels In-Situ-Hybridisierung.....	88
4.1.2.2	Analyse der Dlx5/6-Cre Aktivität mittels LacZ-Färbung.....	92
4.1.2.3	Fokussierte Expressionsanalyse des Hinterhirnbereichs mit Hilfe der Doppel-In-Situ-Hybridisierung.....	94
4.1.3	Verhaltensphänotypisierung der CRH-COE _{Dlx} Linie.....	96
4.1.4	Überprüfung der HPA-Achsen Aktivität.....	98
4.1.5	Quantifizierung der CRH/CRH-R1/CRH-R2 Expression.....	99
4.2	Generierung und Analyse der Linie CRH-Cre.....	101
4.2.1	Strategie zur Erzeugung des CRH-Cre Transgens.....	101
4.2.2	Konstruktion der Cre-Kassette.....	105
4.2.3	Funktionale Analyse der Cre-/CreERT2-Kassette.....	108
4.2.3.1	Funktionsanalyse der FRT-Sequenzen.....	108
4.2.3.2	Analyse der Cre- Expression mittels Immunohistochemie.....	110
4.2.3.3	Funktionsanalyse der Cre-/CreERT2-Rekombinase.....	111
4.2.3.4	Funktionsanalyse des Spleißens von Exon 1 des CRH Gens an Cre/CreERT2..	113
4.2.4	ET-Klonierung.....	115
4.2.5	Entfernung der Selektionskassetten.....	119
4.2.6	Generierung transgener Mäuse mittels Pronucleus-Injektion.....	120
4.2.7	Generierung transgener Mäuse mittels Blastocysten-Injektion.....	121
4.2.8	Analyse der Linie CRH-Cre.....	125
4.2.8.1	Verpaarung der Fos-Cre ^{Neo} -Chimären mit hACTB-Flpe Mäusen.....	125
4.2.8.2	Expressionsanalyse der CRH-Cre Mäuse.....	125

4.2.8.3	Analyse der Cre-Rekombinase Aktivität mittels LacZ-Färbung.....	127
4.2.8.4	Fokussierte Analyse des Hodengewebes.....	129
4.2.8.5	Funktionale Analyse der CRH-Cre Mauslinie mit Hilfe der Mauslinie Crhr1 ^{loxP-GFP}	131
4.2.8.6	Untersuchung der Cre-Expression in Embryonen.....	132
4.2.8.7	Lokalisierung der Insertion des CRH-Cre Transgens	133
4.2.8.8	Transkriptionsanalyse.....	135
4.2.9	Generierung konditional CRH-überexprimierender Mäuse.....	139
4.2.10	Expressionsanalyse der CRH-COE _{Crh} Mäuse	139
4.2.11	Verhaltensphänotypisierung der CRH-COE _{Crh} Linie.....	141
4.2.12	Überprüfung der HPA-Achsen Aktivität.....	143
5	DISKUSSION	144
5.1	Generierung und Analyse der Linie CRH-COE_{Dlx}	145
5.1.1	Expressionsmuster der Linie CRH-COE _{Dlx}	145
5.1.1.1	Cerebrale Expression von Dlx5/6-Cre	145
5.1.1.2	Periphere Expression von Dlx5/6-Cre.....	147
5.1.1.3	Dlx5/6-Cre Expression im Hirnstamm.....	148
5.1.2	Verhaltensphänotypisierung der CRH-COE _{Dlx} Mäuse	149
5.1.3	HPA-Achsen Aktivität	154
5.1.4	Kompensatorische Regulationen des CRH/CRH-R1 Systems.....	155
5.2	Generierung und Analyse der Linie CRH-COE_{Crh}.....	157
5.2.1	Generierung des transgenen CRH-Cre Konstrukts	158
5.2.2	Generierung der Linie CRH-COE _{Crh}	159
5.2.3	Expressionsmuster der Linie CRH-COE _{Crh}	160
5.2.3.1	Cerebrales Expressionsmuster.....	160
5.2.3.2	Peripheres Expressionsmuster.....	163
5.2.4	Mögliche Ursachen der unspezifischen Expression des CRH-Cre Transgens.....	165
5.2.5	Verhaltensphänotypisierung der CRH-COE _{Crh} Mäuse	169
5.2.6	HPA-Achsen Aktivität	169
6	ZUSAMMENFASSUNG	172
7	ANHANG.....	173

8	LITERATURVERZEICHNIS	176
9	DANKSAGUNG	188

1 Einleitung

1.1 Das physiologische Stress-System

1.1.1 Die Stressreaktion

Fällt das Wort „Stress“ verbinden die meisten Menschen heutzutage damit unangenehme und belastende Ereignisse oder Situationen. Im allgemeinen Sprachgebrauch fühlt man sich gestresst, wenn der Betroffene den Eindruck hat, eine Situation nicht kontrollieren zu können und er sie deshalb als bedrohlich oder belastend erlebt. Nichtsdestotrotz stellt Stress, bzw. die Stressreaktion an sich eine überlebensnotwendige Körperreaktion dar, ohne die der Organismus nicht fähig wäre auf externe (Umwelt) oder interne (z.B. physiologische oder biochemische Prozesse innerhalb des Körpers) Veränderungen adäquat zu reagieren. Dementsprechend definierte Hans Selye, ein Pionier in der Erforschung der physiologischen Stressantwort, Stress als „unspezifische Reaktion des Körpers auf jegliche Anforderungen“ (Selye, 1981). Zuvor hatte bereits Cannon (Cannon, 1929) den Begriff „Stress“ verwendet, um Körper- und Verhaltensreaktionen zu beschreiben, die es dem Individuum ermöglichen auf konkrete Gefahrensituationen mit Flucht oder Kampf, dem so genannten „Fight-or-Flight-Verhalten“ zu reagieren.

Zur Beschreibung einer typischen Stressantwort wird im Allgemeinen das von Hans Selye entwickelte „Drei-Phasen-Modell“ herangezogen. Innerhalb der als Schockphase bezeichneten ersten Phase erfolgt die Konfrontation des Organismus mit dem Stress-auslösenden Reizereignis (=Stressor). Die Einwirkung des Stressors führt zu einer Störung der Homöostase und damit zu einer Abweichung vom „Soll-Zustand“ des Körpers. Gekennzeichnet wird dies durch Veränderungen des arteriellen Blutdrucks (Hypotonus), Körpertemperaturabsenkung, Unterzucker des Blutes (Hypoglykämie), verminderte Harnabsonderung, Verringerung der Elektrolyte Chlorid, Natrium und Kalium im Blut, sowie einer Vermehrung der Lymphozyten.

In der sich anschließenden Widerstandsphase erfolgt unter anderem die über das sympathische Nervensystem vermittelte Sekretion von Adrenalin. Adrenalin sorgt für die Bereitstellung von Energie in Form von Glucose und Fettsäuren, für eine Stimulation der Herz- und Atemtätigkeit sowie für eine Erhöhung des Blutdrucks. Parallel hierzu werden weitere Stresshormone, wie z.B. Cortisol und Wachstumshormone ausgeschüttet, welche eine Wiederherstellung der Homöostase unter den veränderten Bedingungen bewirken sollen. Vegetative Funktionen, die während der Widerstandsphase sekundäre Priorität haben (Appetit, Schlaf, Verdauung, Sexualverhalten), werden während der Stressreaktion in ihrer Aktivität reduziert und tragen somit ebenfalls zur Bereitstellung von Energie bei.

Auf der Ebene verhaltensspezifischer Anpassungen und im Sinne des „Fight-or-Flight-Verhaltens“ sensibilisieren die initiierten Stresssysteme den Wahrnehmungsapparat, steigern kognitive Fähigkeiten, erhöhen die Wachsamkeit und verringern die Schmerzempfindlichkeit (Charmandari et al., 2005). Wirkt der Stressor längerfristig auf den Organismus ein, so dass die Stressantwort permanent aktiviert wird, kehrt sich die stabilisierende Wirkung des Stresssystems in das Gegenteil um und der Organismus kommt in die dritte Phase, die so genannte Erschöpfungsphase. Die eigentlich förderliche Bereitstellung von Ressourcen führt dauerhaft zu Mangelzuständen und kann innerhalb der Erschöpfungsphase zum Zusammenbruch oder sogar zum Tod des Organismus führen.

1.1.2 Die Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren Achse

Die unmittelbare Stressantwort wird hauptsächlich über zwei verschiedene Hormone, bzw. Transmittersysteme vermittelt. Zum einen erfolgt einer Aktivierung noradrenerger Neuronen des Hirnstamms im Bereich der Medulla und des Pons. Große Bedeutung hat hier vor allem der Locus coeruleus, welcher sich im dorsalem Tegmentum des Pons befindet und einen Großteil des cerebralen Noradrenalins produziert, bzw. ausschüttet (Tsigos and Chrousos, 2002; Charmandari et al., 2005). Die anschließende Fortleitung der ausgelösten Aktionspotentiale über das sympathische Nervensystem endet unter anderem in der Medulla der Nebenniere und bewirkt dort die Ausschüttung von Catecholaminen - in erster Linie Adrenalin. Wichtige Effekte des Adrenalins sind z.B. die Steigerung der Herzfrequenz, der Anstieg des Blutdrucks, die Erweiterung der Bronchiolen sowie die Zentralisierung der Durchblutung und die Hemmung der Darmperistaltik. Die zweite Hauptachse der Stressprozessierung findet über ein neuroendokrines Hormonsystem statt, welches sich aus den drei Hauptkomponenten Hypothalamus, Hypophyse und Nebenniere zusammen setzt und an dessen zentraler Position das Corticotropin-Releasing-Hormone (CRH) steht. Dieses System wird in Anspielung auf die erwähnten drei Hauptkomponenten als HHN-Achse oder im englischen Sprachgebrauch als HPA-Achse (hypothalamic-pituitary-adrenal-axis) bezeichnet (Abbildung 1). Wird der Organismus mit einem internen oder externen Stressor konfrontiert so sekretiert eine spezifische Population von Neuronen des paraventriculären hypothalamischen Nukleus (PVN) verstärkt CRH über ihre axonalen Fortsätze in der Eminentia mediana in die dort befindlichen portalen Blutgefäße, von wo aus es zur Adenohypophyse gelangt und dort an den CRH-Rezeptor Typ 1 (CRH-R1) bindet. Der CRH-R1 wird in der Adenohypophyse von corticotropen endokrinen Zellen exprimiert, die als Reaktion auf die CRH-R1 Aktivierung die Transkription des Proopiomelanocortin-(POMC) Gens erhöhen.

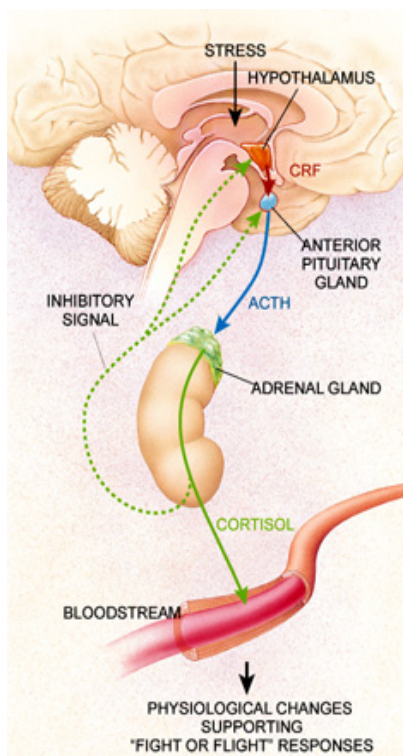


Abbildung 1: Die Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren Achse.

Die Stressor-induzierte Erregung afferenter Neuronen bewirkt die Sezernierung von CRH aus dem paraventriculären Nucleus des Hypothalamus. CRH bewirkt die Freisetzung von ACTH aus der Adenohypophyse, welches über den Blutkreislauf zu Nebenniere gelangt und dort eine erhöhte Synthese und Freisetzung von Glucocorticoiden veranlaßt. Glucocorticoide führen zu physiologischen Veränderungen im Sinne der „Fight-or-Flight-response“ und sorgen über eine negative Rückkopplung für die Beendigung der Stressantwort.

Das POMC Protein fungiert dabei als Vorläufer (Prohormon) und wird gewebespezifisch in verschiedene Peptidhormone gespalten. Während im Hypophysenzwischenlappen (Pars intermedia lobi glandularis) die Hormone CLIP, α -Melanozyten-stimulierendes Hormon (α -MSH), γ -Lipotropin (γ -LPH) und β -Endorphin abgespalten werden, wird in der Adenohypophyse POMC zu β -Lipotropin und dem für die Weiterleitung der Stressantwort bedeutsamen Adrenocorticotropin (ACTH) prozessiert. Verstärkt wird die Synthese von ACTH durch die synergistische Wirkungsweise von Arginin-Vasopressin (AVP), das bei Stresseinwirkung ebenfalls im PVN ausgeschüttet wird und den Effekt von CRH auf die ACTH Freisetzung verstärkt, während AVP alleine nur einen geringen Einfluss auf den ACTH Anabolismus zeigt (Sawchenko et al., 1984; Van Praag et al., 2004). Ausgehend von den corticotrophen Zellen der Adenohypophyse gelangt ACTH in den Blutkreislauf und von dort zu seinem Hauptzielorgan, der Nebenniere. Die Nebenniere ist eine paarige Hormondrüse, welche an den oberen Polen der beiden Nieren aufsitzt und deren Rinde sich anatomisch in drei Schichten gliedern lässt: die äußere Zona glomerulosa, welche Mineralcorticoide (vor allem Aldosteron) bildet, die mittlere Zona fasciculata, aus der Glucocorticoide (vor allem Cortisol) sekretiert werden und die innere Zona reticularis, in der vorwiegend Androgene synthetisiert werden. Das Nebennierenmark ist Teil des sympathischen Nervensystems und verantwortlich für die Freisetzung von Adrenalin und Noradrenalin. Erreicht ACTH die Zona fasciculata der Nebennierenrinde, so stimuliert es dort die Synthese und Freiset-

zung von Glucocorticoiden (Cortisol in Primaten und Corticosteron in Nagetieren), den eigentlichen Effektor-Molekülen der Stress-Antwort. Über die Blutzirkulation gelangen die ausgeschütteten Glucocorticoide in alle Organsysteme und ermöglichen so eine Koordination derjenigen Gehirn- und Körperfunktionen, die für die Auseinandersetzung mit dem Stressor, sowie für die anschließende Erholungs- und Adaptationsphase essentiell sind. So mobilisieren Glucocorticoide Substrate für den Energie Metabolismus (via Gluconeogenese), verstärken kardiovaskuläre Reaktionen und supprimieren inflammatorische Prozesse. Gleichzeitig beeinflussen sie emotionale und kognitive Prozesse, wie z.B. Lernen und Gedächtnis (Sapolsky, 2001; Korte, 2001) und sind in die Modulation von Angst, bzw. Furchtverhalten involviert (Herman et al., 2003; de Kloet, 2004). Eine weitere wichtige Funktion der Glucocorticoide besteht in der Regulation der HPA-Achsen-Aktivität, bzw. der CRH-Ausschüttung über einen inhibitorschen Rückkopplungsmechanismus. Dieser Mechanismus wird dabei sowohl über Glucocorticoidrezeptoren als auch über hochaffine Mineralocorticoidrezeptoren in den Bereichen des Hippocampus, des Hypothalamus und der Hypophyse ausgeübt und führt letztendlich zur Beendigung der neuroendokrinen Stressreaktion (Jacobson and Sapolsky, 1991; de Kloet, 1995)

1.1.3 Die Familie CRH-verwandter Neuropeptide und ihrer Rezeptoren

Das Corticotropin-freisetzende Hormon (im englischen Sprachgebrauch Corticotropin-Releasing Hormone/Factor = CRH/CRF) wurde erstmals von Vale et. al 1981 isoliert (Vale et al., 1981). Reifes CRH besteht aus einem 41 Aminosäuren langen Polypeptid, welches durch proteolytische Prozessierung aus eines 196-Aminosäure langen Prohormons hervorgeht. Das CRH Gen besteht aus zwei Exons, wobei das komplette Protein von Exon 2 codiert wird. Während die Aminosäuresequenz von CRH bei Mensch und Ratte identisch ist, sind die homologen CRH-ähnlichen Peptide von Amphibien (Sauvagine) und Fischen (Urotensin I) nur zu etwa 50 % identisch mit der menschlichen Sequenz. (Dautzenberg and Hauger, 2002). Gemäß seiner Funktion als Stimulator der Stress-Antwort wird CRH vor allem im paraventriculären hypothalamischen Nucleus (PVN) exprimiert, findet sich aber auch in anderen Gehirnbereichen wie zentraler Amygdala, frontalem Cortex, Cerebellum, Bettkern der Stria terminalis, Septum, Pons und Hirnstamm (Swanson et al., 1983) (Abbildung 3A). In peripheren Organen von Säugern wird CRH vor allem im Nebennierenmark, Ovar, Hoden, Herz, Lunge, Leber, Magen, Duodenum, Pankreas, Plazenta und der Haut gebildet (Thompson et al., 1987; Bruhn et al., 1987; Grino et al., 1987; Yoon et al., 1988; Fabbri et al., 1990; Mastorakos et al., 1993; Aird et al., 1993; Slominski et al., 2007). Dieses relativ breite Expressionsmuster deutet bereits darauf hin, dass die Funktion von CRH sich

nicht nur auf die Initiation der HPA-Achse beschränkt, sondern in eine Vielzahl physiologischer Prozesse involviert ist. Neben CRH wurden in den vergangenen Jahren weitere Peptide entdeckt, die sich aufgrund ihrer strukturellen Homologie als CRH-Peptid-Familie zusammenfassen lassen (Abbildung 2). Dazu gehören Urocortin 1 (UCN1), Urocortin 2 (UCN2) und Urocortin 3 (UCN3) (Dautzenberg and Hauger, 2002). UCN1 wird zentral hauptsächlich im Etinger Westphal Nucleus des Gehirns (Abbildung 3A), sowie peripher im Gastrointestinaltrakt, Hoden, Herz, Thymus, Haut und Milz synthetisiert (Vaughan et al., 1995). UCN2 findet sich im Hypothalamus, Hirnstamm, Rückenmark (Abbildung 3A) und peripher in Herz, Blut-Zellen und Nebennieren (Reyes et al., 2001; Hsu and Hsueh, 2001). UCN3 Expression wurde vor allem im Hypothalamus und Amygdala (Abbildung 3A) sowie im Gastrointestinaltrakt und Pankreas detektiert (Lewis et al., 2001; Hsu and Hsueh, 2001). Ein Protein, welches zwar nicht zur CRH-Peptid Familie zählt, aber in funktionellem Zusammenhang mit CRH steht ist das CRH-Bindeprotein (CRH-BP). Das CRH-BP konnte bei Menschen und Nagern im Gehirn und der Hypophyse sowie in der Leber, der Plazenta und innerhalb des Blutkreislaufes nachgewiesen werden (Potter et al., 1994; Cortright et al., 1995) und ist im Stande CRH und UCN1 mit hoher Affinität jedoch nicht UCN2 und UCN3 zu binden und damit funktional zu inaktivieren.

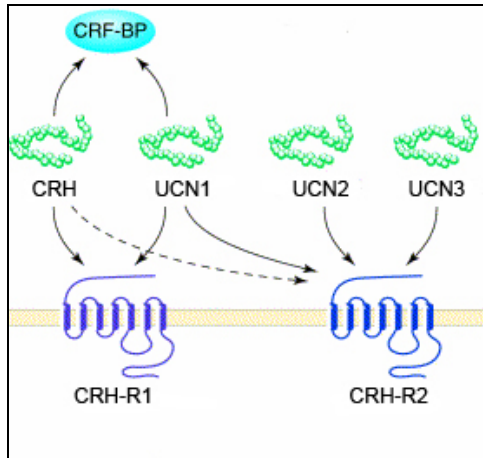


Abbildung 2: Die Familie der CRH-verwandten Neuropeptide und ihrer Rezeptoren.

CRH und UCN1-3 sind Liganden zweier verschiedener Rezeptoren: CRH Rezeptor Typ 1 (CRH-R1) und CRH Rezeptor Typ 2 (CRH-R2). Beide Rezeptoren besitzen sieben Transmembranomänen und gehören zu Klasse der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren, deren Signaltransduktion hauptsächlich über die G-Protein vermittelte Aktivierung von Adenylatcyclasen übertragen wird (Blank et al., 2003). Die mRNA von CRH-R1 ist im Säugerhirn und der Hypophyse relativ weit verbreitet. Die Bereiche mit der höchsten Expression sind dabei cerebraler Cortex, Cerebellum, Amygdala, Hippocampus, Bulbus olfactorius und Adenohypophyse (Abbildung

3B). In der Peripherie findet sich CRH-R1 vor allem im Hoden, Ovar und der Nebenniere (Chalmers et al., 1995; Lovenberg et al., 1995). Der CRH-R2 wird zwar auch im Gehirn exprimiert, dort ist er allerdings hauptsächlich auf die Bereiche des Bulbus olfactorius, des lateralen Septums, der medialen Amygdala, des Bettkerns der Stria terminalis, der Raphekerne und des Hypothalamus begrenzt (Abbildung 3B), wohingegen eine ausgedehntere Expression von CRH-R2 in peripheren Organen wie Herz, Gastrointestinaltrakt, Skelettmuskulatur, Lunge, Gefäßsystem und Ovar zu beobachten ist (Lovenberg et al., 1995). Bezüglich der Ligandenspezifität zeigen beide Rezeptoren eine gewisse Redundanz. So sind CRH und UCN1 fähig sowohl an CRH-R1 als auch an CRH-R2 zu binden. Während die Affinität von UCN1 für beide Rezeptoren in etwa gleich groß ist, bindet CRH bevorzugt den CRH-R1 mit einer etwa 10-fach höheren Affinität im Vergleich zu CRH-R2 (Bale and Vale, 2004). UCN2 und UCN3 binden im Gegensatz dazu selektiv an CRH-R2. Bei der Frage nach dem funktionellen Zusammenhang zwischen den Liganden und Rezeptoren des CRH-Systems geht man inzwischen von einer teilweisen antagonistischen Wirkungsweise von CRH-R1 und CRH-R2 aus. Demnach erfolgt die Aktivierung und Steuerung der unmittelbaren, schnellen Stressantwort über das CRH/CRH-R1 System, während die Urocortine eine CRH-R2-vermittelte, langsam eintretende Erholungsphase einleiten und den Organismus so vor potentiell negativen Begleiteffekten bewahren, die durch eine exzessive, bzw. zu lange Stressreaktion verursacht werden (Steckler and Holsboer, 1999; Hsu and Hsueh, 2001; Van Praag et al., 2004). Das klassische CRH System und das Urocortin System stellen nach diesem Model zwei Seiten einer Waage dar, die sich gegenseitig in Balance halten und so für die Aufrechterhaltung der Homöostase von essentieller Bedeutung sind.

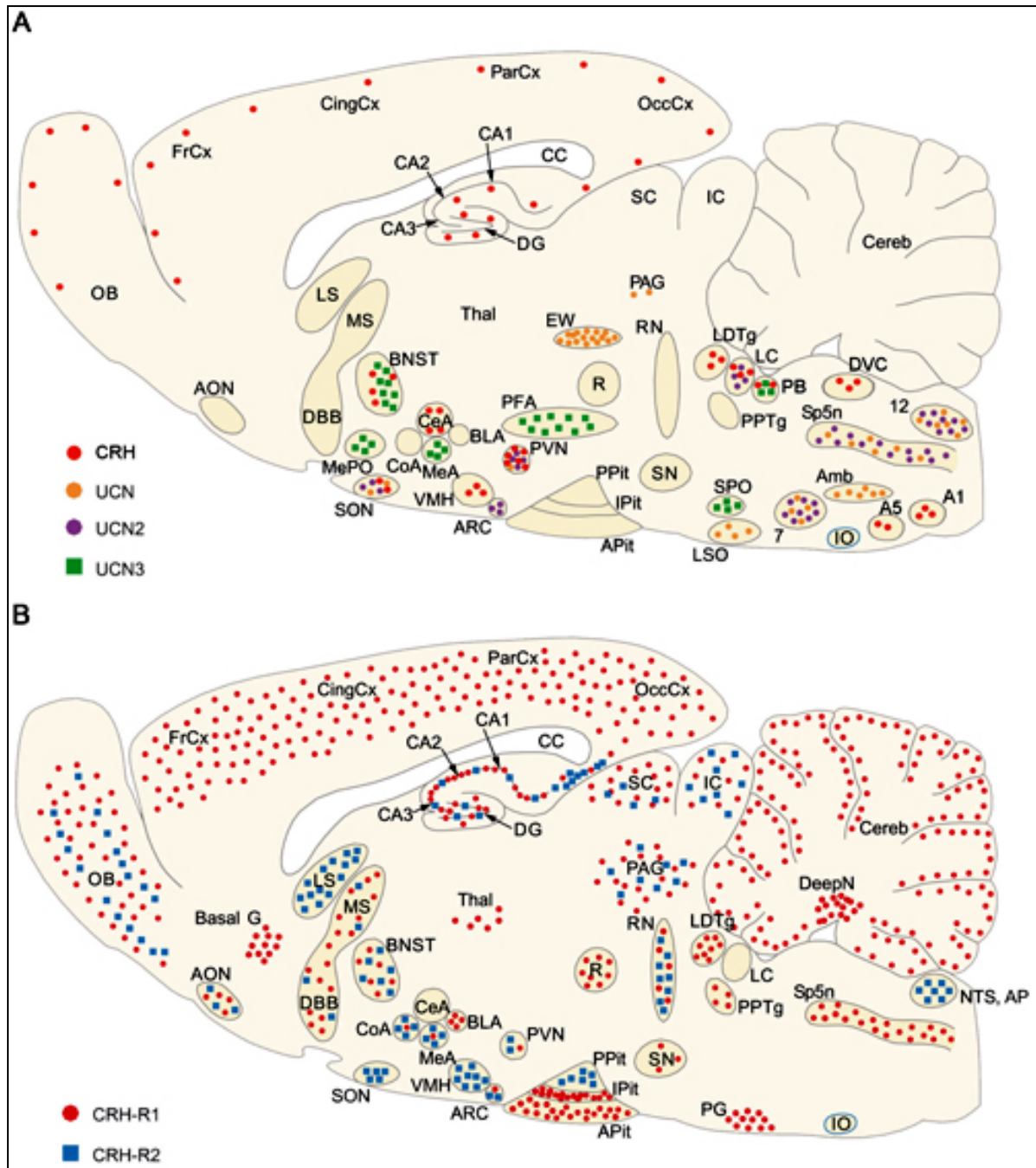


Abbildung 3: Verteilung von (A) CRH, UCN1, UCN2 und UCN3 mRNA und (B) CRH-R1 und CRH-R2 mRNA im Sagittalschnitt eines Nagergehirns. Abgewandelt dargestellt aus Reul & Holsboer (Reul and Holsboer, 2002).

Abkürzungen: 7, Nucleus facialis; 12, Nucleus hypoglossus; Amb, Nucleus ambiguus; AON, Nucleus olfactorius anterior; AP, Area postrema; Apit, Adenohypophyse; ARC, Nucleus arcuatus; Basal G, Basalganglien; BLA, basolaterale Amygdala; BNST, Bettkern der Stria terminalis; CA1-3, Felder CA1-3 des Cornu ammonis; CC, Corpus callosum; CeA, zentrale Amygdala; Cereb, Cerebellum; CingCx, Cortex cinguli; CoA, corticaler Nucleus der Amygdala; DBB, diagonales Broca-Band; Deep N, Nuclei cerebelli; DG, Gyrus dentatus; FrCx, frontaler Cortex; IC, Colliculi inferiores; IO, inferiorer Olivenkernkomplex; IPit, Hypophysenzwischenlappen; LC, Locus coeruleus; LDTg, Nucleus tegementalis posterolateralis; LSO, lateraler superiorer Olivenkernkomplex; MeA, mediale Amygdala; MePO, Nucleus preopticus medianus; MS, mediales Septum; NTS, Nucleus tractus solitarii; OB, Bulbus olfactorius; OccCx, okzipitaler Cortex, PAG, periaquäduktales Grau; ParCx, parietaler Cortex; PFA, Area perifornica; PG, Griseum pontis/Brückengrau; Ppit, Neurohypophyse; PPTg, Nucleus tegmenti pedunculopontinus; PVN, Nucleus paraventricularis hypothalami; R, Nucleus ruber; RN, Raphekern(e); SC, Colliculi superiores; SN, Substantia nigra; SON, Nucleus supraopticus; Sp5n, Nucleus spinalis trigemini; SPO, oberer paraolivärer Kern; Thal, Thalamus

1.1.4 Die Rolle von CRH als Neuromodulator

Die Expression von CRH außerhalb des Hypothalamus macht deutlich, dass dieses Peptid nicht nur eine neuroendokrine Funktion als Koordinator der HPA-Achse erfüllt, sondern auch in autonome und verhaltensspezifische Stressantworten involviert ist. Die hohe Dichte CRH-positiver Zellen in so unterschiedlichen Gehirnbereichen wie dem Neocortex, dem Hippocampus, der zentralen Amygdala, Teilen des Mittel- und Hinterhirns (wie z.B. dem Locus coeruleus, den Raphe Kernen, dem ventralen Tegmentum und Nucleus tractus solitarius) sowie des Cerebellums legt nahe, dass CRH hier die Rolle eines Neuromodulators oder -regulators inne hat und damit integrativen Einfluss auf diverse kognitive, motivatorische und emotionale Funktionen ausüben kann (Bale and Vale, 2004). Interessanterweise finden sich CRH-immunreaktive Projektionen in Kerngebieten, die als prominente Vertreter wichtiger Neurotransmittersysteme gelten, wie z.B. in der Substantia Nigra (dopaminerges System), im Locus coeruleus (noradrenerges System) und in den Raphe Kernen (serotonerges System) (Austin et al., 1997). Ob und in wie weit CRH direkten Einfluss auf diese oder andere Neurotransmittersysteme nimmt bleibt unklar, wenngleich viele Indizien eine derartige Implikation für das dopaminerge System (Ungless et al., 2003; Korotkova et al., 2006; Riegel and Williams, 2008), das noradrenerge System (Koob, 1999; Sauvage and Steckler, 2001) das GABA-erge System (Nie et al., 2004), das serotonerge System (Tan et al., 2004) und das cholinerge System (Day et al., 1998a; Day et al., 1998b; Sauvage and Steckler, 2001) vermuten lassen.

In Tierversuchen konnte gezeigt werden, dass die Injektion von CRH in das zentrale Nervensystem physiologische und verhaltensspezifische Veränderungen verursacht, die nahezu identisch mit Stress-induzierten Veränderungen sind. Dazu gehören erhöhter Puls und erhöhter arterieller Blutdruck, Unterdrückung des Explorationsverhaltens, Stimulierung des Fellpflegeverhaltens, gesteigerte Konfliktbereitschaft, erhöhte Ängstlichkeit, verminderte Nahrungsaufnahme und reduzierte Libido (Dunn and Berridge, 1990; Owens and Nemeroff, 1991). Die beobachteten Effekte können dabei mit CRH-Rezeptor Antagonisten rückgängig gemacht werden und sind unabhängig von der HPA-Achsen-Aktivierung. Verabreicht man hingegen CRH-Rezeptor Antagonisten alleine, so werden viele der Stress-induzierten Verhaltensweisen gedämpft, was als weitere Evidenz für die Rolle von CRH als Mediator der Verhaltensreaktion auf Stress gewertet werden kann (Heinrichs et al., 1995).

Über den Modus operandi von CRH innerhalb der neuronalen Netzwerke ist nur sehr wenig bekannt. Bisher konnte lediglich gezeigt werden, dass CRH an den terminalen Nervenendigungen lokalisiert ist (Cain et al., 1991) und insbesondere in hippocampalen, GABA-ergen Neuronen sowie in den Endigungen von glutamatergen und GABA-ergen Neuronen im Locus coeruleus

kolokalisiert werden kann (Yan et al., 1998; Valentino et al., 2001). Die Funktion von CRH im Gehirn entspricht dabei nicht so sehr der eines klassischen Neurotransmitters. Üblicherweise zeichnen sich Neurotransmitter durch ihre schnelle Signalübertragung (im Bereich von zehntel Millisekunden) aus, sowie durch ihre Fähigkeit Membranpotentiale zu verändern. Beides trifft auf CRH nicht zu (Gallagher et al., 2008), weshalb man dazu übergeht CRH als Neuromodulator oder Neuroregulator zu begreifen (Merchenthaler, 1984; Radulovic et al., 1999; Gallagher et al., 2008). CRH beeinflusst nach diesem Model das Membranpotential nicht direkt, sondern bewirkt über CRH-R1- oder CRH-R2-vermittelte Signaltransduktionskaskaden das „priming“ der Prä- oder Postsynapse, so dass dadurch die Wirkungsweise von kosezernierten Neurotransmittern oder anderen Neuromodulatoren verändert werden kann (Orozco-Cabal et al., 2006).

1.2 Dysregulationen des CRH-Systems

Unter normalen physiologischen Umständen ist die Stressantwort über das CRH-System zeitlich eng begrenzt; die weitreichenden Eingriffe der CRH-induzierten Prozesse auf Physiologie und Verhalten des Organismus erzielen innerhalb dieses Zeitrahmens deshalb mehr Nutzen als Kosten. Unter den Aspekt „Nutzen“ fallen dabei die körpereigenen Veränderungen, die es dem Organismus ermöglichen auf einen Stressor adäquat zu reagieren und die Homöostase aufrecht zu erhalten. Die Kosten bestehen dagegen in der Herunterregulierung anderer Körperfunktionen wie z.B. Reproduktion, Wachstum, Immunabwehr und katabole Reaktionen, sowie in einem erhöhten Energiebedarf während der Stressreaktion. Sind diese Kosten kurzfristig tolerierbar, so wirken sie sich bei chronischem Stress schädigend auf den Organismus aus (Erschöpfungsphase) und führen zu krankhaften Veränderungen wichtiger Körperfunktionen. Bedenkt man den enormen Einfluss, den das CRH- System auf vegetative, neuroendokrine, emotionale und kognitive Funktionsbereiche im Rahmen der Stressantwort hat, so ist es nicht verwunderlich, dass eine Störung der fein austarierten, CRH-modulierten Regulationsmechanismen zu verschiedenen pathophysiologischen Zuständen führen kann (Tsigos and Chrousos, 2002). Als Kontrollinstanz der endokrinen Stressantwort kann sich ein dysreguliertes CRH-System insbesondere auf die Funktionalität und Integrität der HPA-Achse auswirken. Konkret kann dies zu Störungen der HPA-Achsen Balance führen, was sich entweder in einer dauerhaft erhöht aktivierten (hyperaktiven) oder dauerhaft reduziert aktivierten (hypoaktiven) HPA-Achse manifestiert. Einer dysregulierten HPA-Achse wird dabei ebenfalls eine Beteiligung bei der Pathogenese verschiedener Erkrankungen zugesprochen. Abbildung 4 verdeutlicht dies mit einer Auflistung pathologischer Zustände, die nach bisherigem Kenntnisstand mit einer hyper- oder hypoaktiven HPA-Achse assoziiert werden.

Increased HPA axis activity	Decreased HPA axis activity
Chronic stress	Adrenal insufficiency
Melancholic depression	Atypical/seasonal depression
Anorexia nervosa	Chronic fatigue syndrome
Malnutrition	Fibromyalgia
Obsessive-compulsive disorder	Hypothyroidism
Panic disorder	Nicotine withdrawal
Excessive exercise (obligate athleticism)	Discontinuation of glucocorticoid therapy
Chronic active alcoholism	After Cushing syndrome cure
Alcohol and narcotic withdrawal	Premenstrual tension syndrome
Diabetes mellitus	Postpartum period
Truncal obesity (Metabolic syndrome X)	After chronic stress
Childhood sexual abuse	Rheumatoid arthritis
Psychosocial short stature	Menopause
Attachment disorder of infancy	
'Functional' gastrointestinal disease	
Hyperthyroidism	
Cushing syndrome	
Pregnancy (last trimester)	

Abbildung 4: Pathogene Zustände die mit einer veränderten HPA-Achsen Aktivität in Zusammenhang gebracht werden. Adaptiert von Chrousos & Gold (Chrousos and Gold, 1992)

Immer mehr klinische Studien weisen auch darauf hin, dass eine chronische HPA-Hyperaktivität, bzw. die Überexpression von CRH in engem Zusammenhang mit der Ätiologie von affektiven Störungen (wie z.B. Depression) und Angsterkrankungen steht (Arborelius et al., 1999). Besonders das Krankheitsbild der endogenen Depression (oder auch Major Depression) wurde auf diesen Zusammenhang hin gut untersucht und erhielt durch die dort beobachtete CRH-Dysregulation ein weiteres mögliches Erklärungsmodell.

1.2.1 Endogene Depression - Major Depression

Nach dem ICD-10 Klassifikationssystem (*International Classification of Diseases*) definiert sich das Krankheitsbild der endogenen Depression/Major Depression durch ein gleichzeitiges Auftreten von Symptomen wie depressiver Verstimmung, Verlust von Interesse und Freude sowie vermindertem Antrieb, Ermüdbarkeit und Aktivitätseinschränkung (World Health Organization, 1992). Neben diesen obligaten Hauptsymptomen können eine Reihe von Nebensymptomen dia-

agnostiziert werden, die bei jedem Patienten in unterschiedlicher Konstellation und Ausprägung auftreten. Dazu gehören:

- verminderte Konzentration und Aufmerksamkeit
- vermindertes Selbstwertgefühl
- pessimistische Zukunftsperspektive
- Suizidgedanken

sowie als somatische Charakteristika:

- Libidoverlust
- Stupor, Akinese (körperliche und geistige Regungslosigkeit)
- Agitiertheit
- Schlafstörungen (veränderter Schlafzyklus)
- Appetitstörung – Gewichtsverlust
- Gastrointestinale Störungen
- Herz-/Kreislaufprobleme
- allgemeines Krankheitsgefühl

Neben dem mit den oben aufgeführten Symptomen einhergehenden Verlust an Lebensqualität, besteht die dramatischste Folge der Depression in der Suizidalität. So haben ca. 40 bis 80 % der depressiv Erkrankten Selbstmordgedanken oder führen suizidale Handlungen aus und 15 % der Patienten versterben durch Selbsttötung (Angst, 1997). Dass Depression keine Randerscheinung ist belegen jüngere Studien, die davon ausgehen, dass 2 bis 5 % der Weltbevölkerung an schweren Formen und bis zu 20 % an milderer Formen dieser Krankheit leiden (Kessler et al., 2003). Schätzungen der Welt-Gesundheits-Organisation (WHO) gehen davon aus, dass in den Industrieländern bis zum Jahr 2020 Depression weltweit die zweithäufigste Erkrankung nach Herz-Gefäß-Erkrankungen sein wird. Depressive Erkrankungen wirken sich daher nicht nur auf das Wohlbefinden des Betroffenen verheerend aus, sondern verursachen durch Arbeitsausfall und medizinische Betreuung auch einen immensen volkswirtschaftlichen Schaden.

Als psychosoziale Risikofaktoren für die Entwicklung einer Depression (gemeint ist dabei im folgendem immer der Krankheitstyp der endogenen Depression oder Major Depression) gelten unter anderem akuter Stress, chronischer Stress, in der Kindheit erlebte Traumata sowie Verlust-Erfahrungen (Claes, 2004). Zwillingsstudien deuten aber auch auf eine genetische Disposition

hin, die mit einer Vererbbarkeit von 30 bis 50 % beziffert wird (Sullivan et al., 2000; Nestler et al., 2002; Kendler et al., 2006).

Die neurobiologischen Mechanismen, die zur Entstehung von Depression beitragen konnten bisher nur lückenhaft aufgeklärt werden und reichen nicht aus, um ein zufrieden stellendes Erklärungsmodell für dieses komplexe Krankheitsbild zu entwickeln. Lange Zeit galt die so genannte Monoaminhypothese der Depression als bestes Erklärungsmodell. Sie beruht auf der Beobachtung, dass die Konzentration der Neurotransmitter Serotonin und/oder Noradrenalin in depressiven Patienten erniedrigt ist und das eine mittels Antidepressiva (wie z.B. Serotonin-Wiederaufnahme-Hemmer) herbeigeführte Erhöhung dieser Neurotransmitter zu einer Linderung der Depressions-Symptome führen kann (Berton and Nestler, 2006). Gegen die Monoaminhypothese spricht, dass der molekularbiologische/biochemische Effekt der auf das monoaminerge System abzielenden Antidepressiva zwar schon nach einigen Stunden eintritt, der therapeutische Effekt aber erst nach Wochen feststellbar ist. Außerdem spricht immer nur ein Teil der Patienten auf die Behandlung mit diesen Antidepressiva an, während bei anderen Patienten überhaupt keine Wirkung zu beobachten ist. Daher wird eine vollständige Remission bei optimaler Behandlung mit Antidepressiva derzeit nur bei weniger als 50 % der Betroffenen erzielt (Berton and Nestler, 2006). Neben Monoaminen geraten daher bei der Diskussion über Ätiologie und Pathophysiologie von Depression in jüngster Vergangenheit immer öfter auch Faktoren wie Neurogenese, epigenetische Mechanismen oder andere Neuropeptide (wie z.B. CRH) in das Blickfeld der Forschung (Nestler et al., 2002; Urani et al., 2005).

1.2.2 CRH und Depression

Mehrere Beobachtung weisen auf eine mögliche Rolle von CRH bei depressiven Erkrankungen hin: bei viele Patienten mit endogener Depression findet man eine erhöhte CRH mRNA Expression im hypothalamischen PVN (Raadsheer et al., 1995) und dadurch bedingt eine verstärkte Sekretion von CRH und Cortisol (Nemeroff et al., 1984). Gleichzeitig führt die intravenöse Verabreichung von CRH zu einer abgeflachten ACTH Freisetzung, was als Folge einer kompensatorischen Herunterregulierung des CRH-R1 (als Reaktion auf die CRH Überexpression im PVN) angesehen wird (Holsboer et al., 1984; Gold et al., 1984; Heim et al., 2001). Mit Hilfe des kombinierten Dexamethason/CRH Test konnte zudem festgestellt werden, dass bei Patienten mit endogener Depression der von den Glucocorticoiden ausgeübte inhibitorische Rückkopplungsmechanismus beeinträchtigt ist und somit die CRH-Hypersekretion nur noch unzureichend „abgebremst“ wird (Heuser et al., 1994). Außerhalb der HPA-Achse wurden erhöhte Konzentrationen von CRH-Protein in der Zerebrospinalflüssigkeit und erhöhte Mengen an CRH mRNA in

den Brodmann-Arealen 9,10 und 11 depressiver Patienten nachgewiesen (Nemeroff et al., 1984; Merali et al., 2004), sowie eine signifikante Reduktion von CRH-Bindungsstellen im frontalen Cortex von Suizidanten (Nemeroff et al., 1988). In einer Studie von Austin et al. (Austin et al., 2003), die an 11 Suizidanten und 11 Kontrollen durchgeführt wurde, fanden sich zudem erhöhte Mengen an CRH im Locus coeruleus (30 %), in der medialen Raphe (39 %) sowie in der kaudalen dorsalen Raphe (45 %). Umgekehrt stellen einige Studien eine Normalisierung der vorher erhöhten CRH Konzentrationen nach Behandlung von depressiven Patienten mit antidepressiven Therapieverfahren (Antidepressiva, Elektrokonvulsion) fest (Nemeroff et al., 1991; Banki et al., 1992; Kling et al., 1994).

Zusammengefasst legen diese Beobachtungen nahe, dass in Personen mit einer Depression (oder zumindest einem Teil der Erkrankten) CRH sowohl in hypothalamischen als auch in extrahypothalamischen Gehirnbereichen überexprimiert wird und dass die beobachtete Hyperaktivierung der HPA-Achse unter anderem eine Folge dieser zentralen CRH-Hypersekretion ist. In Anbetracht der weitreichenden Funktionen die CRH im Gehirn ausübt, kann nur darüber spekuliert werden, in wie weit die Symptomatik der endogenen Depression auf eine erhöhte CRH Konzentration zurückzuführen ist oder die erhöhte CRH Konzentration eine Folge anderer, mit der Depression assoziierter Vorgänge ist. Auffällig ist jedoch, dass einige der Symptome einer Depression Analogien zu CRH-induzierten Verhaltensänderungen im Tierexperiment aufweisen, wie z.B. reduzierte Libido, erhöhte Ängstlichkeit oder verminderter Appetit. Welche mögliche Rolle CRH in der Entwicklung von endogener Depression wirklich spielt bleibt deshalb weiter aufzuklären.

1.3 Tiermodelle

Bei der Erforschung von Ursachen und möglichen Behandlungsmethoden von menschlichen Erkrankungen stellen Tiermodelle in der Wissenschaft bis heute ein unverzichtbares Handwerkszeug dar. Unabhängig von ethischen Fragestellungen muss dabei immer ein Kompromiss zwischen Vergleichbarkeit zum menschlichen Organismus und praktischer Handhabung des Tiermodells getroffen werden. Jahrzehntlang war aus dieser Überlegung heraus die Ratte die bevorzugte Spezies in der präklinischen Forschung. Ratten eignen sich gut für kognitive und operante Verhaltenstests und sind robust, bzw. groß genug für die Durchführung invasiver Techniken (wie z.B. Implantation von Messsonden). Die Entwicklung neuer molekularbiologischer Methoden, wie z.B. die homologe Rekombination in embryonalen Stammzellen oder die Pronucleus-Injektion, eröffneten schließlich die Möglichkeit der gezielten Veränderung von Genen in einem Modellorganismus, was der Erforschung der genetischen Grundlagen menschlicher Erkrankun-

gen zu einem Durchbruch verhalf. Es stellte sich dabei heraus, dass sich die Techniken zur genetischen Manipulation besonders gut bei Mäusen anwenden lassen. Hinzu kommt, dass die Zucht und Haltung von Mäusen relativ einfach, kostengünstig und (aufgrund ihrer geringen Körpergröße) Platz sparend ist, und sich aufgrund der kurzen Generationszeit in verhältnismäßig kurzer Zeit eine große Anzahl an Versuchstieren produzieren lässt (Cryan and Holmes, 2005). Dies begünstigte die Maus als Modellorganismus auch in der neuropsychiatrischen Forschung, wengleich hier ebenso deutlich die Limitationen der Maus zum Vorschein kommen. Viele Symptome psychiatrischer Erkrankungen sind kognitiver (z.B. vermindertes Selbstbewusstsein) und emotionaler Natur (z.B. Niedergeschlagenheit) und können daher nur unzureichend in einem Tier wie der Maus untersucht werden ohne in Gefahr zu laufen beobachtete Verhaltensweisen zu anthropomorphisieren. Trotzdem bestehen große Ähnlichkeiten im anatomischen, neuronalen und funktionellen Gehirnaufbau zwischen Mensch und Maus, sowie ein großes gemeinsames Repertoire an evolutionär konservierten Verhaltensweisen und physiologischen Reaktionen (Cryan and Holmes, 2005).

Um ein Tiermodell wie die Maus für die Erforschung menschlicher Erkrankungen valide anwenden zu können, sollten deshalb drei Kriterien erfüllt sein (Cryan and Holmes, 2005; Kato et al., 2007):

1. Konstruktvalidität (construct validity): der (der Krankheit) zu Grunde liegende Mechanismus sollte bei Mensch und Tiermodell identisch sein.
2. Inhaltsvalidität (face validity): die phänotypischen Ausprägungen, bzw. Symptome sollten bei Mensch und Tiermodell identisch sein.
3. Vorhersagevalidität (predictive validity): die medikamentöse Behandlung (z.B. mit Antidepressiva) sollte bei Mensch und Tiermodell denselben Effekt zeigen.

Um im Mausmodell phänotypische Ausprägungen von Symptomen endogener Depression operationalisieren zu können, bedient man sich vor allem der spezifischen Symptome, die in depressiven Patienten ohne Befragung mehr oder weniger objektiv gemessen werden können (Cryan and Mombereau, 2004; Cryan and Holmes, 2005). Einige dieser relevanten Symptome sind nachfolgend den phänotypischen Ausprägungen von Depressions-ähnlichen Zuständen im Mausmodell gegenübergestellt:

Symptome bei endogener Depression	Depressions-ähnlicher Phänotyp in der Maus
erhöhte Ängstlichkeit	erhöhtes Angstverhalten
psychomotorische Unruhe, Agitiertheit	veränderte lokomotorische Aktivität
verringertes Appetit	reduzierte Nahrungsaufnahme
Schlafstörungen	verändertes Schlafverhalten
reduzierte Libido	verringerte sexuelle Aktivität

1.3.1 Konventionelle CRH-überexprimierende Tiermodelle

Die in klinischen Studien festgestellte Korrelation zwischen CRH-Überexpression und endogener Depression wirft die Frage auf, ob und wenn ja inwiefern hypersekretiertes CRH zur Entstehung von depressiven Symptomen beiträgt. In der Vergangenheit wurden deshalb mehrere transgene, CRH-überexprimierende Mauslinien generiert, die zur Klärung dieser Frage beitragen sollten.

Eine konventionell ubiquitär überexprimierende Mauslinie, deren CRH-Überexpression über den Methallothionin-Promotor MT-1 gesteuert wird, wurde 1992 von Stenzel-Poore et al. entwickelt (Stenzel-Poore et al., 1992). Die Tiere zeigen hohe Plasmawerte an ACTH und Corticosteron und einen Morbus Cushing ähnlichen Phänotyp, wie erhöhte Stammfett-Akkumulation, Muskelatrophie, dünne Haut und Alopezie. Bezüglich des Verhaltens konnte eine erhöhte Ängstlichkeit in der Dark-Light-Box sowie im Elevated-Plus-Maze festgestellt werden (Heinrichs et al., 1997), sowie eine Reversion des Verhaltens nach Gabe eines CRH Rezeptor Antagonisten (Stenzel-Poore et al., 1994). Die Tatsache, dass eine Adrenalectomie zwar die Corticosteron-Werte zu normalisieren vermag, jedoch keinen Einfluss auf das Angst-ähnliche Verhalten hat, legt nahe, dass der beobachtete Verhaltensphänotyp wahrscheinlich CRH/CRH-R1 vermittelt wird und nicht eine Folge erhöhter Glucocorticoide ist (Heinrichs et al., 1997).

Dirks et al. (Dirks et al., 2002) publizierten eine transgene Maus, welche CRH unter der Kontrolle des Thy-1 Promotors selektiv im Gehirn (hauptsächlich PVN, zentrale Amygdala und BNST) überexprimiert. Obwohl in diesem Tier die basalen Corticosteron-Werte erhöht sind und die Tiere ab einem Alter von ca. 6 Monaten einen Cushing-ähnlichen Phänotyp entwickeln, zeigt sich bezüglich der ACTH Konzentrationen und der HPA-Achsen Reaktivität kein Unterschied zu Wildtyp Mäusen (Groenink et al., 2002). Auf der Verhaltensebene lassen sich teilweise sensorische Verarbeitungsdefizite erkennen; im Gegensatz zu der transgenen Mauslinie von Stenzel-Poore et al. zeigten diese Mäuse keinerlei Auffälligkeiten im Angstverhalten.

Ergebnisse die Rückschlüsse auf Angst-ähnliches oder Depressions-ähnliches Verhalten zu lassen sind nicht bekannt.

1.3.2 Konditional CRH-überexprimierende Tiermodelle

Aufgrund der Tatsache, dass die im vorhergehenden Kapitel beschriebenen konventionellen CRH-überexprimierenden Mauslinien CRH relativ unspezifisch und ektopisch exprimieren, sowie einen Hypercortisolismus aufwiesen (d.h. ein Cushing-ähnliches Syndrom), bestand Bedarf an Tiermodellen, deren CRH-Überexpression räumlich und zeitlich besser kontrolliert werden konnte. Ein Versuch in diese Richtung wurde mit einer von Vicentini et al. generierten Mauslinie unternommen, welche eine auf dem rtTA/tetO+ System basierende Vorderhirn-spezifische und induzierbare CRH-Überexpression erlaubt (Vicentini et al., 2009). Die doppelt transgenen Mäuse besitzen dabei zum einen den rtTA Transkriptionsfaktor, der unter der Kontrolle des Vorderhirn-spezifischen CamKII α -Promotors steht und zum anderen ein Konstrukt, welches aus dem CRH Gen und dem tetO Operator besteht. Durch Zugabe von Doxycyclin wird die Bindung des rTA Transkriptionsfaktors an das tetO Operon ermöglicht und somit die Expression des transgenen CRH induziert. Tiere die auf die Weise einer 3-wöchigen induzierten CRH-Überexpression unterzogen wurden, zeigen neben signifikant erhöhten Corticosteron-Werten am Vormittag nur schwache inhibitorische Verhaltenseffekte in der Dark-Light-Box und eine signifikant reduzierte Immobilität im Forced-Swim Test ($P < 0,05$) (Vicentini et al., 2009).

In einem alternativer Ansatz zur Erzeugung konditional CRH-überexprimierender Mauslinien wurden die Eigenschaften des ubiquitär exprimierten ROSA26 (R26) Locus mit dem Cre/loxP System kombiniert (Guo et al., 1997; Reichardt et al., 1999; Nagy, 2000; Gelman et al., 2003; Branda and Dymecki, 2004).

In dieser „Knock-in“ Mauslinie (CRH-COE) wurde eine Kopie der murinen CRH cDNA in den R26 locus inseriert und ein mittels IRES-Sequenz (IRES = internal ribosome entry site) unabhängig translatierbares LacZ-Reportergen an die CRH cDNA gekoppelt (Lu et al., 2008). Unter normalen Umständen kann diese CRH-Reportergen Einheit nicht transkribiert werden, da dies durch einen zwischen ROSA26 Promotor und CRH liegenden Transkriptions-Stop verhindert wird (Abbildung 5). Um die Stopkassette zu entfernen und damit die Transkription von CRH und dem LacZ-Reporter-Gen zu ermöglichen bedarf es der Einkreuzung einer transgenen Cre-Mauslinie. Cre-Mäuse besitzen ein Transgen, das sich in seiner einfachsten Variante aus dem Gen für die Cre-Rekombinase sowie einem nach experimentellem Bedarf gewebsspezifischen Promotor zusammensetzt.

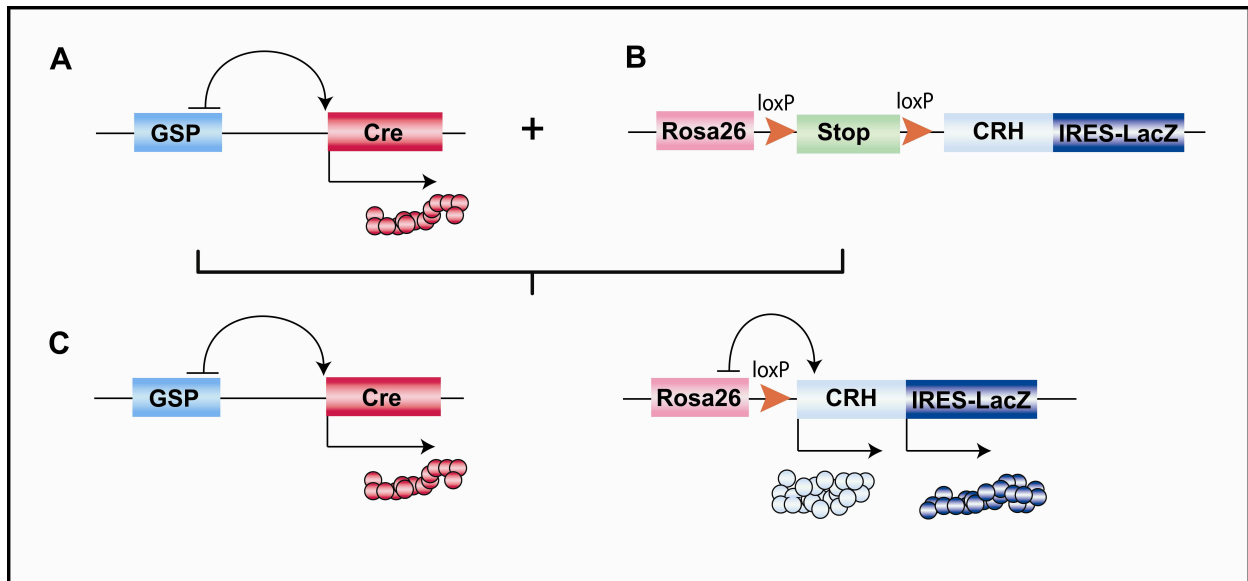


Abbildung 5: Strategie zur Generierung von konditional CRH-überexprimierenden Mäusen.

Konditional CRH-überexprimierende Tiere gehen dabei aus der Kreuzung von (A) transgenen, gewebsspezifisch Cre-exprimierenden Mäusen (GSP = gewebsspezifischer Promotor) und (B) CRH-COE Mäusen, welche ein zusätzliches, inaktives CRH Gen enthalten hervor. Ein Teil der Nachkommen besitzt beide Konstrukte (C), was zu einer Aktivierung des auf dem modifizierten ROSA26 Locus (R26) befindlichen CRH Gens durch Cre führt.

Die Cre-Rekombinase ist ein Enzym, welches spezifische DNA Motive (loxP-Sequenzen) erkennt und die zwischen zwei loxP-Stellen befindliche DNA je nach Orientierung der loxP-Sequenzen ausschneiden oder invertieren kann (Nagy, 2000). Aus der Verpaarung von CRH-COE Mäusen und Cre-Mäusen gehen Nachkommen hervor, die zum Teil beide Transgene tragen. In diesen Tieren kann die spezifisch exprimierte Cre-Rekombinase die Stopkassette durch die Erkennung der flankierenden loxP-Sequenzen deletieren und somit eine CRH-Überexpression herbeiführen, deren Stabilität und Kontinuität durch den R26 Promotor gewährleistet wird. Durch die Wahl des Cre-Promotors kann dabei bestimmt werden, wann und in welchem Gewebe- oder Zelltyp die Cre-Expression und damit die CRH-Überexpression induziert wird. Durch Heterozygoten-Verpaarungen lassen sich schließlich Mäuse produzieren, die CRH von einem oder von beiden R26 Allelen exprimieren ($R26^{+/Crh}Cre$, bzw. $R26^{Crh/Crh}Cre$) und so neben ihren beiden endogenen CRH Genen zwei artifizielle CRH exprimierende Konstrukte enthalten. Bisher wurden auf diese Weise zwei konditionale CRH-überexprimierende Mauslinien erzeugt, die einerseits CRH im zentralen Nervensystem (COR-COE_{Nes}) und andererseits in glutamatergen Neuronen und GABA-ergen Projektionsneuronen des Vorderhirns (CRH-COE_{Cam}) überexprimieren (Lu et al., 2008).

Heterozygote und homozygote COR-COE_{Nes} Tiere weisen keine Unterschiede in ihren basalen ACTH- und Corticosteron-Werten im Vergleich zu Kontrolltieren auf, zeigen aber eine HPA-

Achsen Hyperreaktivität als Antwort auf Stress. Im Forced-Swim Test und Tail-Suspension-Test konnte jeweils eine reduzierte Immobilität und damit ein Antidepressiva-ähnliches Verhalten (bzw. ein verstärktes aktives Stressbewältigungsverhalten) festgestellt werden. CRH-COE_{Cam} Mäuse unterscheiden sich nicht in ihrem endokrinologischen Phänotyp, zeigen jedoch ein erhöhtes Angstverhalten.

Wenngleich die beiden konditionalen Mauslinien eine räumlich gut kontrollierte Überexpression von CRH ermöglichen sind sie doch auch mit gewissen Einschränkungen verbunden. An erster Stelle steht hierbei das Problem der ektopischen Expression. Will man mit Hilfe eines Mausmodells die Situation im depressiven Patienten nachahmen, so sollte die Überexpression in den transgenen Tieren nur in denjenigen Zellpopulationen stattfinden, die natürlicherweise CRH produzieren. Da sowohl in den CRH-COE_{Nes} als auch in den CRH-COE_{Cam} Mäusen die Überexpression auch in anderen anatomischen Strukturen und Zell-/Neuronentypen induziert wird, entspricht das Modell per se nicht mehr der klinisch vorgefundenen Situation und erweitert den Interpretationsspielraum für jeden beobachteten Phänotyp. Außerdem muss bedacht werden, dass die bisher verwendeten spezifischen Cre-Promotoren zeitlich nicht induziert werden können. Das bedeutet, dass (wie im Fall der Line CRH-COE_{Nes}) bereits während der Embryogenese die CRH-Expression aktiviert werden kann; dies führt eventuell zu kompensatorischen Gegenregulationen vor- oder nachgeschalteter Transmitter- und Rezeptorsysteme und kann unter Umständen als unabhängige Variable die Ausprägung von Phänotypen beeinflussen. Da sich depressive Symptome bei betroffenen Menschen meist erst während des Erwachsenenalters entwickeln, wäre eine angestrebte Konstruktvalidität dadurch nur noch bedingt gegeben.

1.4 Zielsetzung

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, den in klinischen Studien beobachteten Zusammenhang zwischen CRH Hypersekretion und einer Erkrankung an endogener Depression aufzugreifen (Nemeroff et al., 1984; Raadsheer et al., 1995; Austin et al., 2003) und CRH-überexprimierende Mausmodelle zu generieren, die es erlauben den Effekt einer zentralen CRH Hypersekretion auf Physiologie und Verhalten der Tiere zu untersuchen. Um die Limitationen der bisher erzeugten CRH-überexprimierenden Mauslinien zu umgehen, eine stringendere räumliche und zeitliche Kontrolle der Überexpression zu erreichen sowie nicht zuletzt ein Mausmodell mit besserer Konstrukt- und Inhaltsvalidität zu erhalten sollten zwei Mauslinien erzeugt werden, die CRH nicht-ektopisch, bzw. nur in CRH-spezifischen Neuronen überexprimieren.

In beiden Fällen wurde auf die Strategie der konditionalen Überexpression mit Hilfe des Cre/loxP System sowie der Verwendung der CRH-COE Mauslinie (Lu et al., 2008) zurückgegriffen.

Die erste Mauslinie sollte durch die Kreuzung der bereits existierenden Dlx5/6-Cre Linie (Monory et al., 2006) mit CRH-COE Mäusen erzeugt werden. Der Dlx5/6 Promotor ist dabei spezifisch für GABA-erge Interneuronen, in denen CRH teilweise kolokalisiert ist (Yan et al., 1998; Valentino et al., 2001; Chen et al., 2004).

Die zweite Mauslinie sollte CRH nur in CRH-spezifischen Neuronen überexprimieren. Hierfür musste eine neue Cre-Mauslinie generiert und etabliert werden, die diesen Anforderungen Rechnung trägt.

Beabsichtigt war einen transgenen Expressionsvektor zu konstruieren, dessen Cre-Rekombinase-Expression unter der Kontrolle des CRH-Promotors und dessen regulatorischer Elemente erfolgen sollte. Dieses Transgen sollte anschließend in das murine Genom inseriert werden. Parallel sollte hierbei sowohl die konventionelle Cre-Rekombinase als auch eine durch Tamoxifen induzierbare (und damit zeitlich kontrollierbare) Cre-Rekombinase verwendet werden.

Die so entstandenen CRH-Cre Linien sollten dann ebenfalls mit CRH-COE Mäusen verpaart werden und zur Erzeugung der CRH-spezifischen, CRH-überexprimierenden Mäuse führen.

Mit einer eingehenden verhaltensspezifischen, histologischen und endokrinologischen Analyse der beiden CRH-überexprimierenden Linien sollte die möglichen Effekte der CRH Überexpression auf Physiologie, Neurobiologie und Verhalten der Maus studiert werden.

2 Material

2.1 Geräte

Gerät	Hersteller
Autoklav Typ 24	Melag
Avanti™ J-25 Zentrifuge	Beckmann
Binokular Leica MZ6	Leica
Biofuge Pico	Heraeus Instruments
Centrifuge 5403	Eppendorf,
Concentrator 5301	Eppendorf,
Dispergiergerät VDI 12	VWR
Elektrophorese Zubehör	MWG Biotech
Elektrophoresis Power Supply EPS 200	Pharmacia Biotech
Entwicklermaschine (XP 2000)	3M/Kodak
Fluoreszenzmikroskop Axioplan 2	Zeiss
Geldokumentationssystem Gel Print 2000i	MWG Biotech
Gelelektrophorese Kammern	peqLab Biotechnologie GmbH
GeneAmp PCR System 2400	Applied Biosystems
GeneAmp PCR System 9700	Applied Biosystems
GenePulser II	Bio Rad
GenePulser Xcell	Bio Rad
Heizblöcke Thermomixer 5436	Eppendorf
Inkubations-Öfen	Memmert
Inkubationsrotor	CMV
Kryostat 2800 Frigocut	Reichert-Jung
Kryostat HM 560 M	Microm
Lichtmikroskop Leica DMRB	Leica
Lichtquelle KL 200	Leica
Megafuge 1.0 R	Thermo Scientific
pH-Meter pH 538	WTW,
Photometer GeneQuant II	Pharmacia Biotech
Reinstwasseranlage Seralpur PRO 90 CN	Seral
Schütteltisch SM25	Fa. Edmund Bühler
Schüttler Doumax 1030	Heidolph
Sonifier Cell Disrupter B15	Branson
Szintillationsmessgerät	Beckmann Instruments
Thermal cycler PTC-225	MJ Research
Thermoblock	Biometra
Thermomixer comfort	Eppendorf
Umwälzthermostat E-5	Julabo
UV-Stratalinker® 2400	Stratagene
Vortexer MS1 Minishaker	IKA

Waagen 40SM-200-A/LP 4200 S	Precisa, Dietikon, Sartorius
Wasserbad Multitemp III	Pharmacia Biotech
Wasserbad SW1	GFL
Wasserbad Tap 1008	GFL
Zellkultur Inkubator	Heraeus Instruments

2.2 Chemikalien und Lösungen

Substanz	Hersteller
2-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich
Agarose	Invitrogen
Ampicillin	Sigma-Aldrich
Ampuwa® (H ₂ O)	Fresenius
Bacto-Agar	Becton, Dickinson and Co.
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich
BSA (Rinderserumalbumin)	Sigma-Aldrich
Calciumchlorid (CaCl ₂)	Merck
Chloramphenicol	Sigma
Chloroform	Merck
D(-) Arabinose	Sigma-Aldrich
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich
Dinatriumphosphat (Na ₂ HPO ₄)	Merck
Deoxycholat	Sigma
DPX (Einbettmedium)	BDH
DTT (Dithiothreitol)	Roche
EDTA (Ethyldiamintetraessigsäure)	Sigma-Aldrich
Essigsäure	Merck
Essigsäureanhydrid	Sigma-Aldrich
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich
Ethylenglycoltetraessigsäure (EGTA)	Roth
Ferricyanid	Sigma
Ferrocyanid	Sigma
Ficoll	Amersham Pharmacia
Formamid	Roth
Fotoemulsion NTB2	Kodak
Fotoentwickler Developer D-19	Kodak
Fotofixierer Polymax RT	Kodak
Gelatine	Biochemical
Glutaraldehyd	Sigma-Aldrich
Glycin	Sigma-Aldrich
Igepal (NP-40)	Sigma-Aldrich
IPTG (Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid)	Roth
Isoamylalkohol	Merck
Isofluran	Abbott

Isopropanol	Roth
Kaliumacetat (KAc)	Merck
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Merck
Kanamycin	Sigma-Aldrich
Kresylviolett	Merck
Lauryl Sulfat (Sodiumdodecylsulfat)	Sigma-Aldrich
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	Merck
Mangandichlorid	Merck
Methanol	Roth
MOPS (3-Morpholinpropansulfonsäure)	Sigma-Aldrich
N,N-Dimethylformamid (DMF)	Sigma
Natriumchlorid (NaCl ₂)	Roth
Natriumcitrat	Sigma
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Roth
Natriumhydroxid (NaOH)	Roth
Nonidet-P40	Roche
NSS (normal swine serum)	DAKO
Paraformaldehyd (PFA)	Sigma-Aldrich
Phenol	Merck
Roti®-Phenol/Cl/-Lösung	Roth
Rubidiumchlorid (RbCl)	Merck
Salzsäure (HCl)	Roth
Spermidin	Sigma
Sucrose	Merck
Szintillationslösung	Roth
Tamoxifen	Sigma
Tetracyclin	Sigma
Tris (Trishydroxymethyl-aminoethan)	Roth
Triton-X	Sigma-Aldrich
Trizma® Base	Sigma
TRIZOL	Invitrogen
Tween-20	Bio-Rad
Wasserstoffperoxid (H ₂ O ₂)	Merck
X-Gal	Genaxxon Bioscience
Xylol	Roth

2.3 Enzyme

Enzym	Hersteller
DNase I, RNase-frei	Roche
Herculase DNA Polymerase	Stratagene
Proteinase K	Sigma-Aldrich
Restriktionsenzyme + 10 x Puffer	Fermentas. NEB
RNase A	Roche, Boehringer

RNAse H	Sigma
SP6-RNA Polymerase	Roche
Superscript™ II Plus Reverse Transkriptase	Invitrogen
T4 DNA Ligase	Roche
T7-RNA Polymerase	Roche
Taq DNA Polymerase	Roche, Abgene
Terminale Transferase	Roche

2.4 Nukleotide und Nukleinsäuren

Nukleotid/Nukleinsäure	Hersteller
[α - ³² P]-dCTP	GE Healthcare
[α -thio- ³⁵ S]-UTP	GE Healthcare
Desoxynukleotide	Roche
DIG RNA labeling mix	Roche
Lachssperma-DNA	Roche
Oligo(dT) ₁₅ Primer	Roche
Smart Ladder	Eurogentec

2.5 Kits und Verbrauchsmaterial

Kit/Verbrauchsmaterial	Hersteller
5'/3' RACE Kit, 2 nd Generation	Roche
Bakterienkulturschalen	Greiner Labortechnik
Counter-Selection BAC Modification Kit	Gene Bridges
Deckgläschen (für Histologie)	Fisher Scientific
Deckgläschen (für Zellkultur)	Roth
DIG Nucleic Acid Detection Kit	Roche
DIG RNA Labeling Kit (SP6/T7)	Roche
DIG Wash and Block Buffer Set	Roche
Einmalpipetten	Greiner Labortechnik
Elektroportationsküvetten	Bio-Rad
Falcon™ Tubes	BD Biosciences
Filterpapier 3MM	Whatman
Hybond-N ⁺ Nylon Membran	Amersham, GE Healthcare
Kapillarröhrchen 0,9 mm	WU
Kryoboxen	Pesce
Lipofectamin™ 2000	Invitrogen
Megaprime DNA labeling system	Amersham
NBT/BCIP Stock Solution	Roche
Objektträgerkästen	Merck
PCR Reaktionsgefäße	Peske
Pipettenspitzen	Sarstedt

ProTaq MountFluor	Quartet Immunodiagnostics
QIAGEN Large-construct Kit	Qiagen
QIAGEN Plasmid Maxi Kit	Qiagen
QIAGEN Plasmid Midi Kit	Qiagen
QIAprep Spin Miniprep Kit	Qiagen
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen
Rapid DNA Ligation Kit	Fermentas
Rapid-Hyb Buffer	Amersham
Reaktionsgefäße	Eppendorf
Radioimmunoassay (RIA) Kit für Corticosteron	MP Biomedicals
RNeasy Mini Kit	Qiagen
Röntgenfilme Biomax	Kodak
Serologische Pipetten	Nunc, Sarstedt
Sigma Fast DAB Peroxidase Substrate Tablet Set	Sigma
SnakeSkin® Dialyse Schlauch	PIERE
Sterilfilter 0,45 µm	Sartorius
SuperFrost® Plus Objektträger	Fisher Scientific, Merck
Tissue Tek	Polysciences
TOPO TA Cloning Kit pCRII TOPO	Invitrogen
Trockenperlen	Roth
TSA™ Biotin System	PerkinElmer
Vectashield Mounting Medium (Fluoreszenz)	Vector Laboratories
Vectastain Elite ABC Kit	Linaris
Vector® Red Alkaline Phosphatase Substrate Kit	Vector Laboratories
Zellkulturschalen, -platten	Nunc
Microspin S-300 HR Säulen	Amersham

2.6 Puffer und Medien

2.6.1 Puffer und Medien für die Bakterienkultur

Medium	Zusammensetzung
Agarmedium	1,5 % Bacto-Agar in dem jeweiligen Flüssigmedium
LB-(Luria Bertani-) Medium	1,0 % Trypton 0,5 % Hefeextrakt 1,0 % NaCl, autoklaviert
SOC-Medium	2,0 % Trypton 0,5 % Hefeextrakt 10 mM NaCl 2,5 mM KCl 10 mM MgSO ₄

	10 mM MgCl ₂ , autoklaviert 20 mM Glucose (steril filtriert)
--	--

2.6.2 Puffer und Medien für die Zellkultur

Medium	Zusammensetzung/Hersteller
0,5 % Trypsin-EDTA (1x)	Invitrogen
DMEM	Invitrogen
DPBS (1x)	Invitrogen
ES-Zell Einfriermedium	5 ml FCS (PAN Biotech) 3 ml ES-Zell Medium 2 ml DMSO
ES-Zellmedium	500 ml DMEM (high Glucose) 75 ml FCS (PAN Biotech) 5 ml-Glutamin (200 mM) 5 ml MEM nonessential aminoacids (100x) 1 ml Mercaptoethanol (50 mM) 90 µl LIF (10 ⁷ U/ml)
FCS (fetal calf serum)	Invitrogen (für HEK Zellen) PAN Biotech (für ES-Zellen) PAA (für Feeder-Zellen)
Feeder-Medium	500 ml DMEM (high Glucose) 50 ml FCS (PAA) 5 ml L-Glutamin (200 mM) 6 ml MEM nonessential amico acids (100x)
Geneticin (G418)	Invitrogen
HEK-Zell Medium	500 ml DMEM 50 ml FCS (Invitrogen) 10 ml Penicillin-Streptomycin
L-Glutamin (200 mM)	Invitrogen
LIF (ESGRO®), 10 ⁷ U/ml	Chemicon
Lysis Puffer	10 mM Tris-HCl 10 mM EDTA 10 mM NaCl 0,5 % Sarcosyl 1 mg/ml Proteinase K
MEM nonessential aminoc acids (100x)	Invitrogen
Mercaptoethanol (50 mM)	Invitrogen

Mitomycin C	Sigma-Aldrich
Opti-MEM®	Invitrogen
Pen-Strep (Penicillin-Streptomycin)	Invitrogen
Präzipitierungslösung	10 ml 100 % Ethanol (kalt) 0,15 ml NaOH (5M)
selektives ES-Zellmedium	ES-Zellmedium Geneticin (Endkonzentration: 200 µg/ml aktiv)

2.6.3 Sonstige Puffer und Medien

Medium	Zusammensetzung/Hersteller
DEPC-H ₂ O	2 ml DEPC ad 2 l dd H ₂ O, die Lösungen wurden geschüttelt, für ca. 4 h Stunden bei RT stehengelassen und anschließend 2 x autoklaviert
DIG Block-Puffer	Roche
DIG Wasch-Puffer	Roche
dNTP-Mix	5 mM Desoxyadenosintriphosphat (dATP) 5 mM Desoxycytosintriphosphat (dCTP) 5 mM Desoxyguanintriphosphat (dGTP) 5 mM Desoxythymidintriphosphat (dTTP)
Eluationspuffer (EB)	Qiagen
Hybridisierungsmix	50 % deionisiertes Formamid 20 mM Tris-HCl (pH 8,0) 300 mM NaCl 5 mM EDTA (pH 8,0) 10 % Dextransulfat 0,02 % Ficoll 400 0,02 % Polyvinylpyrrolidon 0,02 % BSA 0,5 mg/ml tRNA (phenolextrahiert) 0,2 mg/ml Heringssperma DNA 200 mM DTT
LacZ-Färbelösung	0,1 % X-Gal 0,005 M Ferrocyanid 0,005 M Ferricyanid verdünnt in LacZ-Waschpuffer
LacZ-Fix	4 % PFA/PBS, pH 7,4 0,005 M EGTA 0,01 M MgCl ₂

	verdünnt in 0,1 M PBS (pH 7,4)
LacZ-Waschpuffer	0,002 M MgCl ₂ 0,01 % Deoxycholat 0,02 NP40 verdünnt in 0,1 M PBS (pH 7,4)
Ladepuffer	7,5 g Ficoll 400 0,05 g Orange G 20 ml EDTA (0,5 M; pH 8,0) 30 ml ddH ₂ O
NEN-TNB	0,5 % blocking reagent (aus dem TSA™-Biotin System) gelöst in TNT Puffer
NET Puffer	100 mM NaCl 25 mM EDTA 2 mM Tris-HCl (pH 7,5)
Neutralisierungspuffer	1,5 M NaCl 0,5 M Tris-HCl (pH 7,5) 1 mM EDTA
NTE Puffer	500 mM NaCl 10 mM Tris-HCl (pH 8,0) 5 mM EDTA (pH 8,0)
PBS (10x)	120 mM NaCl 2,7 mM KCl 7 mM Na ₂ HPO ₄ 3 mM NaH ₂ PO ₄ pH 7,4 autoklaviert
PBST	1 x PBS Triton-X-100
Southern Blot Denaturierungspuffer	0,5 M NaOH 1,5 M NaCl
Southern Blot Waschpuffer 1	2 % SSC 0,1 % SDS
Southern Blot Waschpuffer 2	0,2 % SSC 0,1 % SDS
SSC (20x)	3 M NaCl 0,3 M Natriumcitrat, autoklaviert
TAE Puffer	40 mM Tris-Acetat

	1mM EDTA
TFB I	30 mM KAc 100 mM RbCl 10 mM CaCl ₂ 50 mM MnCl ₂ 15 % Glycerol
TFB II	10 mM MOPS 75 mM CaCl ₂ 10 mM RbCl 15 % Glycerol
TNT Puffer	0,15 M NaCl 0,1 M Tris-HCl 0,05 % Tween 20 gelöst in ddH ₂ O pH 7,6
X-Gal-Lösung	20 mg/ml in DMSO, sterilfiltriert

2.7 Antikörper und Konjugate

Antikörper	Verdünnung	Hersteller
anti-chicken (Alexa 594)	1:300	Invitrogen
anti-Cre (polyklonal, rabbit)	1:1000 bis 1:3000	Schütz et. al (1999)
anti-DIG(Fab)-POD	1:400	Roche
anti-GFP (polyklonal, chicken)	1:2000	Bachem
anti-rabbit BA-1000 (biotinyliert)	1:300 bis 1:400	Vector Laboratories
Streptavidin-AP Konjugat	1:400	Roche

2.8 BAC- und Fosmid-Klone

	BAC	Fosmid
Backbone	pTARBAC1	pEpiFOS5
Backbonegröße	10683 bp	7518 bp
CRH-tragende Insertion (BAC-/Fosmid Nummer)	RPC124-212D10	G135p64409f5 (WI1-1975E16)
Insertionsgröße	162930 bp	44232 bp
Sequenzlänge upstream des CRH Locus	123284 bp	29596 bp
Sequenzlänge downstream des CRH Locus	37729 bp	11413 bp
Wirtsorganismus	<i>E. coli</i> DH10B	<i>E. coli</i> DH10B

Ursprungsorganismus des Inserts	Mus musculus C57BL/6J	Mus musculus C57BL/6J
Hersteller des Klons	Jackson Laboratory	Whitehead Institute/MIT Center for Genome Research
Bezugsquelle	Children`s Hospital Oakland Research Institute	

2.9 Plasmide

Plasmid	Bezugsquelle
pL451	zur Verfügung gestellt von Dr. Ralf Kühn, Helmholtz Zentrum München
pPGKCrebpA	zur Verfügung gestellt von Dr. Ralf Kühn, Helmholtz Zentrum München
193 IRES Venus	zur Verfügung gestellt von Dr. Claudia Seisenberger, Helmholtz Zentrum München
pcDNA3.1(+)	Invitrogen
pCRII-TOPO	Invitrogen
706-Flp	Gene Bridges
pSVpaX1	zur Verfügung gestellt von Dr. Ralf Kühn, Helmholtz Zentrum München
pCAGGS-Flpe-IRES-puro	Gene Bridges
pCAG-CreER(T2)-bpA SS1	zur Verfügung gestellt von Dr. Jan Deussing, Max-Planck Institut für Psychiatrie, München
pROSA-ITLD	zur Verfügung gestellt von Dr. Jan Deussing, Max-Planck Institut für Psychiatrie, München
pSC101-BAD-gba ^{tet}	Gene Bridges
pEGFP-N1	Clontech

2.10 Organismen

2.10.1 Bakterienstämme

Bakterienstamm	Genotyp	Herkunft
<i>E. coli</i> : DH5 α	fhuA2 Δ (argF-lacZ)U169 phoA glnV44 Φ 80 Δ (lacZ)M15 gyrA96 recA1 relA1 endA1 thi-1 hsdR17	Invitrogen
<i>E. coli</i> : XL1-Blue	recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac	Invitrogen
<i>E. coli</i> : DH10B	F ⁻ <u>mcrA</u> Δ (mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ 80dlacZ Δ M15 Δ lacX74 endA1 recA1 deoR Δ (ara,leu)7697 araD139 galU galK nupG rpsL λ ⁻	Children`s Hospital Oakland Research Institute

<i>E. coli</i> : TOP10	mcrA, Δ (mrr-hsdRMS-mcrBC), Δ lacX74, deoR, recA1, araD139 Δ (ara-leu)7697, galK, rpsL, endA1, nupG	Invitrogen
<i>E. coli</i> : 294-Cre	<i>F</i> ⁻ , [λ bdA] ⁻ , <i>supE44</i> , <i>endA1</i> , <i>thi-1</i> , <i>hsdR17</i> , <i>lacZ::cI857-Cre</i>	Buchholtz et al., 1996b
<i>E. coli</i> : 294-Flp	<i>F</i> ⁻ , [λ bdA] ⁻ , <i>supE44</i> , <i>endA1</i> , <i>thi-1</i> , <i>hsdR17</i> , <i>lacZ::cI857-FLP</i>	Buchholtz et al., 1996b

2.10.2 Säuger-Zelllinien

Zelllinie	Spezies	Herkunftsorgan
HEK293	Homo sapiens sapiens	embryonale Niere
EMFI (Feeder-Zellen)	Mus musculus	embryonale Fibroblasten
TBV2 (ES-Zellen)	Mus musculus	Blastocyste

2.10.3 Mauslinien

Mauslinie	Referenz
CRH-COE	Lu et al., 2008
ROSA26	Soriano et al., 1999
hACTB-Flpe	Rodriguez et al., 2000
Dlx5/6-Cre	Monory et al., 2006
flogCR1	Kühne et. al, unveröffentlicht

2.11 DNA-und mRNA-Sonden

2.11.1 DNA-Sonden

Sonde	Verdau der Ziel-DNA mit:	Sondenlänge
3' HA	Hind III	500 bp
Fos-Sonde 1	Nde I	510 bp
Fos-Sonde 2	Nde I	786 bp
Crh_ Exon 1 Sonde	Hind III	506 bp
Cre-Sonde	ohne Verdau (colony lift)	751 bp

2.11.2 mRNA- Sonden

Sonde	Sondenlänge	Genbank Zugriffsnr.	Nukleotidposition
endogenes CRH (3' UTR)	291 bp	AY128673	1816-2107
Tyrosinhydroylase (TH)	765 bp	NM-009377	23-788
GFP	724 bp	U55762	676-1400
CRH	355 bp	AY128673	1306-1661

Cre	661 bp	AB449974	112-773
LacZ	367 bp	U46489	192-569

2.12 Oligonukleotide

Die folgenden Oligonukleotide wurden von der Firma Eurofins MWG (Ebersberg) hergestellt. Sie wurden lyophilisiert erhalten und mit destilliertem Wasser auf eine Stammkonzentration von 100 pmol/μl eingestellt. Für PCRs die in geringem Maßstab durchgeführt wurden, wurden aus den Stammlösungen 1:10 Verdünnung mit 10 pmol/μl angelegt. Alle Sequenzen sind den allgemeinen Standards entsprechend als Sense-Strang in 5'-3'-Richtung angegeben.

2.12.1 Genotypisierungsprimer

Folgende Primer wurden verwendet um Mäuse auf Anwesenheit verschiedener Transgene hin zu kontrollieren und darauf basierend geeignete Versuchs- oder Zuchttiere auszuwählen. Ansätze in denen gleichzeitig drei oder vier Primer verwendet wurden, ermöglichten es innerhalb einer PCR zu bestimmen, ob Transgene heterozygot (Mutante/Wildtyp, bzw. mt/wt), homozygot (mt/mt) oder überhaupt nicht vorlagen (wt/wt).

Primername	Sequenz (5'-3')	Produklänge (bp)	Detektion von:
Cre-F Cre-R	GATCGCTGCCAGGATATACG AATCGCCATCTTCCAGCAG	574	Cre-Rekombinase
CTSQ-up CTSQ-down	ACAAGGTCTGTGAATCATGC TTACAATGTGGATTTTGTGGG	1098	Catepsin Q, DNA Kontrolle
Venus fwd Venus rev	TACGGCCTGCAGTGGTTC GGGTGTTCTGCTGGTAGTGG	364	Venus Reportergen
SPLK locus fwd1 5' SPLK rev3 SPLK 3' locus fwd	CAGGGCTTGATGAAGGGATA CAGTCGGGAAACCTGTCGTG GCAGGAAGTGAGTATGAGAGG	725 (mt) : SPLK locus fwd1 +5' SPLK rev3 1092 (wt) : SPLK locus fwd1+ SPLK 3' locus fwd	CRH-Cre Insertion
Flipase-fwd Flipase-rev	TTCGAATCATCGGAAGAAGC TTGCCGGTCCTATTTACTCG	413	Flp-Rekombinase
ROSA-1 ROSA-5 ROSA-6	AAAGTCGCTCTGAGTTGTTAT TAGAGCTGGTTCGTGGTGTG GCTGCATAAAACCCAGATG	398 (wt): ROSA-1+ROSA-6 646 (mt): ROSA-1+ROSA-7 505 (del): ROSA-1+ROSA-5	Modifizierter ROSA26 Locus der Linie CRH COE

ROSA-7	GGGGAACCTTCCTGACTAGGG		
CreER2-fwd CreER2-rev	CCTTGTTGGATGCTGAGCCC TGGGAGAGGATGAGGAGGAG	586	CreERT2- Rekombinase
RK-Cre(3) fwd RK-PGK fwd BAC 3'HA rev	ATTCTCCCACCGTCAGTACG GGGGAACCTTCCTGACTAGGG CTCCAAAGAAGGGTCACCGC	1053: RK-Cre(3) fwd+BAC 3'HA rev 680: RK-Cre(3) fwd+RK- PGK fwd	Selektionskassette
Cor26 fwd Cor26 rev LacZ rev	GTTATTAGGTCCCTCGACCTG GATCAGAACCGGCTGAGGT CCGTAATGGGATAGGTCACG	478: Cor26 fwd+Cor26 rev 363: Cor26 fwd+LacZ rev	ROSA26 Locus

2.12.2 Klonierungs-Primer und -Oligonukleotide

Klonierungs-Primer und Klonierungs-Oligonukleotide besitzen innerhalb ihrer Sequenz Restriktionsschnittstellen oder funktionale Elemente. Primer bestehen demgemäß aus einer Bindungssequenz und einem Klonierungselement (meistens Restriktionsschnittstellen), welches sich als Primerüberhang am 5' Ende befindet.

Primername	Sequenz (5'-3')	enthaltene funktionale Element
3pA fwd	TGTGCTATTTTCGAAGGTTCCGGA- TCAGCTTGATGGG	BstBI
3pA rev	TGTGCTATTTTCGAAGATCCAGAC- ATGATAAGATACATTG	BbsI
bpA fwd kom.	CTGTACAAGTAAAGAGCTCGCTGAT- CAGCCTCGACTG	5' Ende komplementär zu 3'- Antisense-Strang-Ende von-Venus
bpA rev	TGCTGTCCCTCGAGGACTTCGCGCTG- AGGCGCATGGCCCCGGGTCGGTCCGT- TAATTAAGAGGATCGAGCCCCAG- CTGGTTCT	PacI, XmaI, BbvCI, XhoI
Cre fwd	ACGACAGTGAGCTCCTAGCCAGGGCCG- GCCGCCA-CCATGCCCAAGAAGAAGAG- GAAGGTGTC	Kozak Sequenz, FseI, SacI
Cre rev	CTGGCTAGCTCGAGCGTACTCTCATATG- CTAATCG-CCATCTTCCAGCAG	NdeI, XhoI

CreER2-FseI fwd	GCCATATGTGCCTCTGAGCTGTGGCAGGC- AAACCCT	FseI
CreER2-NdeI rev	CCAGGGCCGCCCGCCACCATGTCCAATTTA- CTGACC	NdeI
CRH Exon 1 fwd	ACTTAAGAGAAACTCAGAGCCCAAGTACG	AflII
CRH Exon 1 rev	TGGCGCGCCCTGAAGCACCGAGGTTGAGG	AscI
CRH-3' HA fwd	CCCCGGGTGTTCAAGATCAATACTTTGG- CTTTG	XmaI
CRH-3' HA rev	TTTAATTAATCATTACACACACAGATA- TCTAGG	PacI
CRH-5' HA fwd	AGGGCGGCCCTGAAGCACCGAGGTTGAGG	AscI
CRH-5' HA rev	ACCTGCAGGGCTGCTCATCTTTATCCACTC	SbfI
EV-Linker antisense	GATCCTTAATTAATCGCTTGCTGGATGTC- CTGCAGGA	BamHI, SbfI, PacI
EV-Linker sense	AGCTTCCTGCAGGTGTAGGTCGTTGCTT- TAATTAAG	HindIII, SbfI, PacI
FRT-Neo-3pA fwd	GACGCGTTCGAATTCCGAAGTTCCTATTC	MluI
FRT-Neo-3pA rev	CCTCGAGTGCTCACTCTGGCCGGCCTGT- ACCTGACTGATGAAGTTCC	FseI, XhoI
IRES-Venus fwd	CAGAGGCACATATGATTACGCCAAGCT- GGGATCC	NdeI
IRES-Venus rev kom.	TCAGCGAGCTCTTTACTTGTACAGCTCG- TCCATG	5' Ende komplementär zu 5'- Sense-Strang-Ende von bpA.
SA fwd	ACTGTGGCAAGCTTACGACAGGCC- TGCAGGTGTCCTGAGGCGGCCCT- GTACAGCCGCGGGATCTGTAGGGCGC- AGTAGTCC	HindIII, SbfI, AscI, SacI
SA rev	GCGAGGCTGGTACCACTGTCCGACGCG- TAGCGGCCAG-CTTATCGATACCGTCG	MluI, KpnI

2.12.3 Sonstige Primer und Oligos

Primername	Sequenz (5'-3')
5'RACE Cre rev 1	AGGCAAATTTTGGTGTACGG
5'RACE Cre rev 2	ACGGACAGAAGCATTTCAG
5'RACE Cre rev 3	CGAACCTGGTCGAAATCAGT
5'SPLK fwd1	CGAAGAGTAACCGTTGCTAGGAGAGACC
5'SPLK fwd2	GTGGCTGAATGAGACTGGTGTGCGAC
5'SPLK rev1	ACATACGAGCCGGAAGCATAAAG
5'SPLK rev2	GTGCCTAATGAGTGAGCTAACTC
5'SPLK rev3	CAGTCGGGAAACCTGTCGTG
AC 141209 fwd 1	TGTATTCTTCCGTACTCGTC
AC 141209 fwd 2	CTCTCAGCTACTGTACTCGC
BAC 3'HA fwd	TTGGCTGGACGTAAACTCCTC
BAC 3'HA rev2	GAAAACCTGCAGGAGGCATC
BAC 5'HA fwd	CAACATCATTTAAGTTTCCG
BAC 5'HA fwd2	GCTTCTGTGCTTGGGTACAC
BAC 5'HA rev	TACAAGTAAAGAGCTCGCTG
CRH Exon 1 fwd	CTTCTCCTCCCTTGGTAGGTG
CRH Exon 1 rev	TTTTCTGGTCCGTATCTGGC
CRH Intron fwd 1	TTCTCCCCACCTTCTCTCTC
CRH Intron fwd 2	GGTTGTCCCTTCTAGGTCTCC
CRH Intron fwd 3	GGTCCTTAGGAAGAGGAGC
Fos Sonde 1 fwd	AGGCACAGTGTACTACTATC
Fos Sonde 1 rev	GCATCTGAACAACCTTTGTAT
Fos Sonde 2 fwd	CTGCTTATAGCAATTCATATCC
Fos Sonde 2 rev	ATTGGGATCCAAGTGTACAC
Fos-RK-5'-fwd1	CACGACAGGTTTCCCGACT
Fos-RK-5'-fwd2	CAGGGAAAATGAAGGCTGAC
Fos-RK-5'-fwd3	GCTGGTTTTGTGAGCATGAAC
Fos-RK-5'-rev	ACAGATACAAAGTTGTTTCAGATGC

RK-Cre(2) fwd	ATGTTTAGCTGGCCCAAATG
RK-Neo fwd	CTCGTCCTGCAGTTCATTCA
RK-SA rev	GAAAGACCGCGAAGAGTTTG
RT-CRH fwd	CACCTACCAAGGGAGGAGAA
RT-CRH rev	GTTGCTGTGAGCTTGCTGAG
SPLK locus fwd 1	CAGGGCTTGATGAAGGATA
SPLK locus fwd 2	ACCGAACGTGGCAATTTAAC
SPLK locus rev	GACTGGCTGGCTTGAGAAAG
SPLK-A	CGAAGAGTAACCGTTGCTAGGAGAGACCGTGGCTGA- ATGAGACTGGTGTGACACTAGTGG
SPLK-B	AATTCCACTAGTGTGACACCAGTCTCTAATTTTTTTT- TTTCAAAAAA
Stop(Cre) fwd	CCAGACCAGGCCAGGTATCTCTGAC
Stop(Neo) fwd	TCAGAGCAGCCGATTGTCTGTTGTG
Stop(SA) rev	TTCGCGGTCTTTCCAGTGGG

3 Methoden

3.1 Arbeiten mit Bakterien

3.1.1 Kultivierung von Bakterien

Die Kultivierung der verwendeten *E. coli* Bakterienstämme erfolgte in Luria-Bertani-Medium (LB-Medium), welches nach seiner Herstellung autoklaviert und gegebenenfalls zu Selektionszwecken mit dem erforderlichen Antibiotikum (z.B. Ampicillin, Kanamycin, Tetracyclin, Chloramphenicol) versetzt wurde. Die eingesetzten Antibiotika-Konzentrationen hingen dabei von der Art des zu selektionierenden Vektors ab: bei „multy-copy“-Plasmiden betrug die Arbeitskonzentration 50 µg/ml, bei „single-copy“-Vektoren (wie z.B. BACs oder Fosmide) 15 µg/ml.

Zur Herstellung von LB-Agar Platten wurde Agar dem Flüssigmedium (15g/l) zugesetzt, die Suspension durch Erhitzen im Wasserbad oder in der Mikrowelle in Lösung gebracht und in Kulturschalen ausgegossen.

3.1.2 Herstellung elektrokompetenter *E. coli* Bakterien

Mit einer Pipettenspitze wurden in Glycerol eingefrorene *DH5α E. coli* Zellen in eine 50 ml LB Flüssigkultur überführt und diese bei 37 °C über Nacht auf einem Schüttelinkubator inkubiert. Am nächsten Tag wurden 1000 ml LB-Flüssigmedium mit der 50 ml Vorkultur inokkuliert und solange bei 37 °C und unter Schütteln bebrütet, bis die Bakterienkultur eine optische Dichte von $OD_{600} = 0,5 - 0,6$ erreicht hatte. Die Zelldichte sollte zu diesem Zeitpunkt ca. $4-5 \times 10^7$ Zellen/ml betragen. Alle nun folgenden Schritte wurden im 4° C Raum durchgeführt. Die 1-Liter Gesamtkultur wurde nun auf 6 vorgekühlte 200 ml Zentrifugations-Gefäße verteilt (ca. 170 ml Kultur pro Gefäß) und 30 Minuten auf Eis gekühlt. Anschließend erfolgte die Zentrifugation in der Beckmann Zentrifuge bei 4000 x g für 15 Minuten bei 2 °C. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet eines jeden Zentrifugations-Gefäßes in 50 ml sterilem, eiskaltem Wasser resuspendiert und auf Eis gestellt. Unter Zugabe von weiterem Wasser wurden die Bakterien solange auf Eis durch leichtes Schwenken der Gefäße gelöst bis ein Endvolumen von ca. 166 ml erreicht war. Dann wurde die Zentrifugation wiederholt, der Überstand abermals verworfen und das zurückbleibende Pellet in einem Gesamtvolumen von 83 ml resuspendiert. Nach einer weiteren Zentrifugation wurde das Bakterienpellet nun in 6,6 ml (pro Zentrifugationsgefäß) sterilem, eiskaltem Wasser mit einem Anteil von 10 % Glycerol gelöst und, auf Eis kühlend, in vorgekühlte Plastikröhrchen transferiert. Nach einer letzten Zentrifugation wurde der Glycerolüberstand dekantiert

und das verbleibende Pellet wieder in 1 ml sterilem, 10%-igen Glycerol-Wasser durch Vortexen in Lösung gebracht. Diese Suspension wurde nun in sterile Eppendorf Reaktionsgefäße aliquotiert (20µl pro Aliquot) und bei -80 °C weggefroren werden.

Zur Bestimmung der Transformations-Kompetenz wurde 1µl *pUC19* Vektor (10pg/µl) in ein Aliquot, bzw. in 20 µl elektrokompente Zellen elektroporiert und diese auf LB-Ampicillin Platten ausgebracht.

Folgende Formel kam bei der Berechnung der Kompetenz zur Anwendung:

$$\frac{\text{Kolonienzahl}}{x \text{ ng transformierte DNA}} \times \frac{10^3 \text{ ng}}{\mu\text{g}} \times \frac{y \mu\text{l Gesamt-Transformationsvolumen}}{X \mu\text{l ausplattiertes Volumen}}$$

$$= \frac{\text{Anzahl transformierter Zellen}}{\mu\text{g Plasmid DNA}}$$

wobei $x = 0,01$

$y = 1020$

$X = 20, 50 \text{ oder } 100$

3.1.3 Herstellung chemokompetenter *E. coli* Bakterien

5 ml LB Flüssigmedium wurden mit *E. coli* Bakterien des Stammes *DH5α* oder *XLI-Blue* über Nacht angeimpft. Am nächsten Tag wurde die Starterkultur in 100 ml LB Medium überführt und dort bis zu einem $OD_{550\text{nm}}$ von < 500 angezogen. Die Bakterien wurden dann in einer vorgekühlten Zentrifuge zweimal für je 15 Minuten bei 5000 rpm (rounds per minute) und 4 °C pelletiert (2x 50 ml) und die Pellets auf Eis in je 15 ml eiskalter TBF I-Lösung suspendiert.

Nach einer 20-minütigen Inkubation auf Eis und einer weiteren Zentrifugation für 5 Minuten bei 4000 rpm und 4 °C wurden die Pellets vorsichtig in je 1,8 ml TBF II-Lösung suspendiert, zu je 100 µl aliquotiert und bei -80 °C eingefroren.

3.1.4 Transformation von Bakterien

3.1.4.1 Hitzeschocktransformation

Zur Transformation von DNA in Bakterien mittels Hitzeschock wurden chemokompetente *E. coli* Zellen der Linien *DH5α* und/oder *XLI-Blue* eingesetzt. Die Zellen wurden auf Eis aufgetaut

und anschließend mit der zu transformierenden Plasmid-DNA (1-100 ng) vorsichtig vermischt. Nach einer Inkubationszeit von 30 Minuten erfolgte der Hitzeschock bei 42 °C für 90 Sekunden. Die Bakterien wurden schließlich kurz auf Eis gestellt und mit 250 µl SOC Medium oder 500 µl LB Medium versetzt und ca. 1 Stunde bei 37 °C geschüttelt. Abhängig vom Experiment wurden zwischen 30 und 150 µl des Ansatzes auf selektiven LB-Agarplatten mittels Drygalskispatel ausplattiert und über Nacht bei 37 °C bebrütet. Abweichungen von diesem Prozedere erfolgten im Rahmen des „TOPO cloning“ (Invitrogen), bei dem, wenn möglich, die von Invitrogen empfohlenen TOP10-Zellen eingesetzt wurden und der Hitzeschock nur für 30 Sekunden erfolgte.

3.1.4.2 Elektroporation

Ein Aliquot elektrokompeter Zellen wurde auf Eis aufgetaut und mit 20-200 ng/µl Plasmid-DNA vorsichtig vermengt. Nach einer 1-minütigen Inkubation auf Eis wurde die Zellsuspension in vorgekühlte 1,0 mm Eppendorf Elektroporationsküvetten überführt und diese im Elektroporator (*Gene Pulser Xcell*, Bio Rad) an den vorgesehenen Elektroden fixiert.

Standardmäßig wurde der Puls mit den für *E. coli* im Gerät voreingestellten spezifischen Parametern von 1800 V, 25 µF und 200 Ω durchgeführt, die Zeitkonstante sollte nach dem Puls idealerweise 5,0 ms betragen. Waren für bestimmte Elektroporationen gesonderte Parameter erforderlich (wie z.B. für das ET-cloning), so wurden diese manuell in das Gerät eingegeben. Unmittelbar nach dem Strompuls wurde 1 ml warmes SOC Medium in die Küvette pipettiert und die sich darin lösenden Bakterien sofort wieder in ein Eppendorf Reaktionsgefäß überführt. Nach einer Inkubationszeit von 1 Stunde bei 37 °C auf dem Schüttelgerät erfolgte das Ausplattieren von 30-200 µl auf selektiven LB-Agarplatten mittels Drygalskispatel und das Bebrüten über Nacht bei 37 °C.

3.1.5 Anlegen von Glycerolstocks

Zum Zwecke der langfristigen Aufbewahrung von Bakterienkulturen wurden jeweils 750 µl über-Nacht Kultur mit 250 µl 80%-igem Glycerol vermischt und anschließend bei -80 °C eingefroren.

3.2 Arbeiten mit Nukleinsäuren

3.2.1 Plasmidpräparation aus Bakterien

Entsprechend den experimentellen Erfordernissen wurden die Präparationen in unterschiedlichen Maßstäben durchgeführt. Während für rein analytische Zwecke, wie z.B. den Kontrollverdau

einer Ligation oder der Sequenzierung eines klonierten DNA Fragments eine 2 ml über-Nacht Kultur ausreicht (Minipräp), müssen für präparative Zwecke, wie z.B. für DNA-Hybridisierung mittels Southern Blot größere Volumina von 50 ml (Midipräp) bis 500 ml (Maxipräp) an Flüssigkultur angeimpft werden.

3.2.1.1 Minipräparation

Die analytische Präparation wurde eingesetzt um Klonierungsereignisse per Kontrollverdau zu verifizieren und/oder auf den Vektoren befindliche DNA Fragmente für die Sequenzierung vorzubereiten. Hierfür wurde vor allem die TOPO-Ligation (Invitrogen) eingesetzt, welche die Klonierung von PCR Produkten in den *pCRII-TOPO* Vektor sowie deren anschließende Amplifikation in der Bakterienkultur erlaubt.

Zur Durchführung der Minipräp kam das *QIAprep Spin Miniprep Kit* von Qiagen zum Einsatz. Dessen Funktionsweise basiert dabei auf dem Prinzip der alkalischen Lyse kombiniert mit einer anschließenden Säulenaufreinigung der Plasmid-DNA. Das detaillierte Protokoll zur Präparation kann dem dazugehörigen Handbuch (Qiagen Miniprep Handbook) entnommen werden und ist auch im Internet auf der Homepage des Herstellers einsehbar (<http://www1.qiagen.com>, Stand: 26.03.2009).

3.2.1.2 Midi- und Maxipräparation

Größere Mengen an Plasmid-DNA wurden vor allem dann benötigt, wenn die darin enthaltenen Klonierungselemente für spätere Ligationsreaktionen in ausreichender Menge durch Verdau aus dem Vektor herausgeschnitten und aufgereinigt werden mussten, genug DNA für eine Sequenzanalyse mittels radioaktiver Markierung (Southern Blot) benötigt wurde oder ausreichend Plasmid-DNA für eine Transfektion von Säuger-Zelllinien präpariert werden musste.

Für die Präparationen wurden das *Plasmid-Midi-Kit*, bzw. das *Plasmid-Maxi-Kit* von Qiagen eingesetzt. Die entsprechenden Protokolle können den jeweiligen Handbüchern entnommen werden und sind auch im Internet auf der Homepage des Herstellers einsehbar (<http://www1.qiagen.com>, Stand: 26.03.2009).

3.2.1.3 BAC-Präparation

Aufgrund der enormen Größe und Fragilität der BACs, sowie deren geringer Kopienzahl pro Bakterienzelle, konnten die üblichen Midi-und Maxiprep Kits zur Präparation der BACs nicht eingesetzt werden. Qiagen bietet für diese Zwecke ein *Large-Construct Kit* an, welches speziell für die Isolation von BAC-, PAC-, P1- und Cosmid-Konstrukte bis zu einer Größe von 250 kb konzipiert ist und welches für die Präparation der CRH-Cre BACs eingesetzt wurde. Das Proto-

koll kann dem Handbuch des Kits entnommen oder auf der Homepage des Herstellers eingesehen werden (<http://www1.qiagen.com>, Stand: 26.03.2009).

3.2.2 DNA Fällung mittels Ethanolpräzipitation

Um DNA aus wässrigen Lösungen zu fällen wurde das Ausgangsvolumen mit dem doppelten Volumen an 100%-igen Ethanol versetzt und über Nacht auf -20 °C gestellt. Am nächsten Tag wurde das Gemisch für 10 Minuten bei 4 °C und 13000 rpm (Eppendorf Tischzentrifuge) abzentrifugiert und das Pellet mit 70%-igen Ethanol gewaschen. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt wurde das Pellet unter dem Abzug getrocknet und schließlich mit steril filtriertem Elutionspuffer Puffer resuspendiert.

3.2.3 DNA Isolation mittels Chloroform/Phenol Extraktion

Diese Methode wurde vorzugsweise zur Gewinnung von DNA aus Geweben (wie z.B. Leber oder Gehirn) angewendet. Die Organe wurden hierbei in flüssigem Stickstoff zu Pulver homogenisiert und in einem Falcon Tube in NET-Puffer aufgenommen (1ml NET-Puffer pro 0,1 g Homogenisat). Anschließend erfolgte die Zugabe von 1/10 Volumen Proteinase K (10mg/ml) und 1/10 Volumen 10% SDS. Dem Lysat wurde nach ca. 6 Stunden nochmals 1/10 Volumen Proteinase K beigefügt, ansonsten erfolgte die Inkubation bei 56 °C über Nacht. Am nächsten Tag verliefen die weiteren Schritte wie folgt:

- Extraktion mit einem Volumen Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1)
- Zentrifugation für 10 Minuten bei 500 rpm und 4 °C
- Extraktion des abpipettierten Überstandes mit einem Volumen Chloroform/Isoamylalkohol (24:1)
- Zentrifugation für 10 Minuten bei 500 rpm und 4 °C
- Zugabe von 1/10 Volumen 3M NaAcetat, sowie 2 Volumina 100% gekühltem Ethanol zum abpipettierten Überstand

Die DNA präzipitiert bei Raumtemperatur und kann mit einer Pasteurpipette „geangelt“ werden. Nach kurzem Waschen in 70%-igem Ethanol und Lufttrocknung wurde die DNA in Tris-HCl aufgenommen.

3.2.4 DNA Präparation aus Mausschwanzgewebe

Für die Genotypisierung transgener Mauslinien per PCR wurden abgeschnittene Schwanzspitzen in 100 µl 50mM NaOH bei 99 °C für 30 Minuten lysiert. Anschließend wurde die Suspension mit 30 µl 1M Tris-HCl (pH 7,0) neutralisiert und bei 4 °C aufbewahrt. 1-2 µl aus dem Lysat wurden als Template für die diversen Genotypisierungs-PCRs unverdünnt eingesetzt.

3.2.5 Restriktionsverdau von DNA

Die beim Restriktionsverdau eingesetzten DNA Mengen richteten sich nach den jeweiligen experimentellen Erfordernissen. Für einen analytischen Verdau betrug die DNA Menge zwischen 500 ng und 2 µg, für einen präparativen Verdau zwischen 5 µg und 100 µg. Das Gesamtansatzvolumen konnte zwischen 20 µl und 200 µl variieren. Die Reaktionsbedingungen (Puffertyp, Enzymmenge, Inkubationszeit, Hitzeinaktivierung) richteten sich nach den jeweiligen Enzymspezifischen Empfehlungen des Herstellers. Für gewöhnlich betrug die Enzymmenge zwischen 10 und 50 Units pro Ansatz. Analytische Verdaue fanden für ca. eine Stunde bei 37 °C statt, präparative Verdaue wurden bei gleicher Temperatur über Nacht durchgeführt. Es kamen nur Restriktionsenzyme der Firmen Roche oder NEB zum Einsatz. Außerdem wurde darauf geachtet, dass bei einem Doppelverdau Enzyme des gleichen Herstellers benutzt wurden.

3.2.6 Agarose-Gelelektrophorese

Abhängig von der Größe der aufzutrennenden DNA-Fragmente wurden Agarose-Gele hergestellt, deren Agarose Anteil zwischen 0,8 % und 2 % schwankte. Hierzu wurde die entsprechende Gewichtsmenge an Agarose (Invitrogen) in 1 x TAE-Puffer aufgekocht, bzw. hitzegelöst. Abhängig von der erwünschten Gelgröße (klein = 50 ml, mittel = 200 ml, groß = 500 ml) wurde vor dem Befüllen der Gelkammer 0,5 bis 2,5 µl Ethidiumbromid (0,5 µg/ml) zur späteren Sichtbarmachung der DNA beigemischt. Nach der Verfestigung des Agarose-Gels, wurde die verwendete Gelkammer mit 1 x TAE Puffer gefüllt und die zu 1/6 mit Ladepuffer versetzte DNA in die Geltaschen pipettiert. Die Elektrophorese wurde bei einer Stromstärke von 300 mA für 1 bis 1,5 Stunden durchgeführt. Die Stromspannung war abhängig von der Gelgröße, bzw. der Gelkammergröße und betrug zwischen 80 und 140 Volt.

Nach Beendigung der Elektrophorese wurden die DNA-Banden durch UV-Licht sichtbar gemacht und mittels eines digitalen Dokumentationssystems fotografiert und ausgedruckt.

3.2.7 Gelextraktion

3.2.7.1 Gelextraktion von DNA <10kb

Um per Gelelektrophorese aufgetrennte DNA Moleküle zu isolieren, bzw. aufzureinigen wurden diese nach Detektion unter UV Licht mit einem sterilen Skalpell aus dem Gel herausgeschnitten und in ein Eppendorf Reaktionsgefäß überführt. Anschließend wurde die DNA mit Hilfe des *QIAquick Gel-Extraction-Kits* von Qiagen aus dem Gelstück gelöst, bzw. aufgereinigt und über eine Silikatsäule in mitgeliefertem Eluationspuffer oder Ampuwa-Wasser eluiert. Eine detaillierte Anleitung findet sich in dem entsprechenden Kit-Handbuch oder auf der Homepage von Qiagen (<http://www1.qiagen.com>, Stand: 26.03.2009).

3.2.7.2 Gelextraktion von DNA >10 kb

Zur Herstellung transgener Tiere ist es erforderlich, dass das entsprechende Transgen für die Elektroporation in ES-Zellen oder für die Injektion in den männlichen oder weiblichen Pronucleus der Spender-Oocyte aufgereinigt und in genügender Menge vorliegt. Auch im vorliegenden Falle musste das CRH-Cre/CRH-CreERT2 Konstrukt zum Zwecke der zufälligen Insertion in das Mausgenom von dem Fosmid-Backbone gelöst und aufgereinigt werden. Dabei waren aber zwei Probleme zu beachten. Zum einen ist es mit dem *Gel-Extraction-Kit* von Qiagen nicht möglich DNA aufzureinigen, deren Stranggröße 10 kb übersteigt, so dass diese schnelle und einfache Methode nicht für die Gelextraktion der über 45 kb langen CRH-Cre Konstrukte angewendet werden konnte. Zum anderen empfiehlt es sich nicht die zu extrahierenden Banden mittels UV-Licht zu detektieren, da dies zu Mutationen in der DNA (wie z.B. Thymidin-Dimeren, Strangbrüchen) führen kann, und man so im schlimmsten Fall mutierte und/oder beschädigte DNA in die Mauszellen injiziert. Aus dem gleichen Grund darf das Gel vor dem Gießen auch nicht mit Ethidiumbromid versetzt werden, da dessen interkalierende Eigenschaft ähnliche Effekte nach sich ziehen kann.

Letzteres Problem wurde umgangen, indem die DNA Bande des Transgens indirekt detektiert und anschließend quasi „blind“ herausgeschnitten wurde. Dazu wurde der Vektor-Transgen-Verdau auf verschiedene Geltaschen eines ethidiumbromidfreien Gels nebeneinander verteilt und an den beiden äußersten Laufbahnen der Marker aufgetragen (Siehe Abbildung 6). Nach Beendigung der Elektrophorese wurden die beiden äußersten Transgen-Laufbahnen inklusive der Marker-Bahnen vom restlichen Gel abgetrennt, in einer mit 1 x TAE Puffer befüllten Schale mit Ethidiumbromid inkubiert und danach unter UV-Licht analysiert. Die Position des zu extrahierenden Transgenes wurde durch Herausschneiden eines kleinen spitzwinkligen Gelstücks an der entsprechenden Stelle markiert.

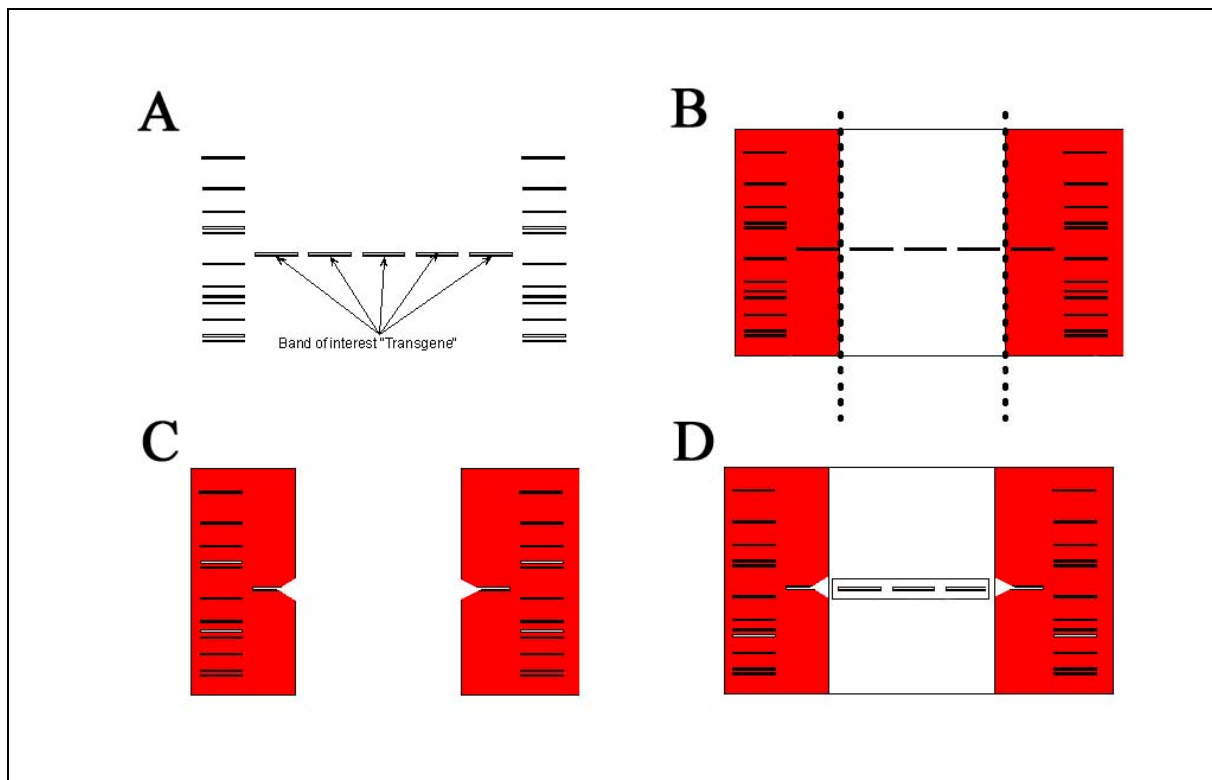


Abbildung 6: Methode zur Gelextraktion linearisierter Transgene. (A) Auftragen des verdauten Transgens auf mehrere Geltaschen, (B) Abschneiden der seitlichen Banden inklusive Marker, (C) Markierung der Transgen-Bande nach Ethidiumbromid-Färbung und (D) Extraktion der ungefärbten Transgen-Banden.

Durch Anpassen der so markierten Randgelstücke an das Mittelstück konnte nun die Position der restlichen im Mittelstück befindlichen Transgen-Banden abgeschätzt und diese so herausgeschnitten werden.

Um die Transgene DNA aus den Agarosegelstücken zu befreien und aufzureinigen, wurde auf die Methode der Elektroeluation zurückgegriffen. Hierzu wurde das herausgeschnittene Gelstück in einen Dialyseschlauch gesteckt, dieser mit 1 x TAE Puffer befüllt und an beiden Enden mit Klemmen verschlossen. Der Schlauch wurde anschließend in einer Gelkammer fixiert und eine Spannung von 60 bis 80 Volt an die Kammer angelegt. Nach einer Eluationsdauer von ca. 5 bis 6 Stunden wurde der nun DNA-enhaltende Puffer abpipettiert, in ein Falcon-Röhrchen überführt und die DNA mittels Ethanolpräzipitation gefällt, sowie in Injektionspuffer oder Tris-HCl gelöst.

3.2.8 DNA Ligation

3.2.8.1 Ligation mit T4 DNA Ligase

Die Ligation von DNA Molekülen mit Hilfe der T4-Ligase (Roche) wurde vor allem während diverser Klonierungsschritte eingesetzt. Um eine erfolgreiche Ligation zu gewährleisten wurden meist drei parallele Ligationsansätze vorbereitet, welche sich nur in dem Verhältnis der einge-

setzten Insertmenge (= die in den Vektor einzufügende DNA) zur eingesetzten Vektormenge unterschieden. Ausgehend von einer eingesetzten Vektormenge von 50 ng konnte die erforderliche Insertmenge nach folgender Formel errechnet werden:

$$\text{Masse des Insert} = x * 50 \text{ ng} * (\text{Länge des Inserts in bp} / \text{Länge des Vektors in bp})$$

wobei $x = 3, 5$ oder 10

Entsprechend den Herstellerempfehlungen wurden die Ligationen in einem Reaktionsvolumen von 20 μl durchgeführt, in das neben der zu ligierenden DNA, jeweils 2 μl T4-Ligase, 2 μl Ligase Puffer und steriles Wasser pipettiert wurden. Die Reaktion fand bei 16 °C über Nacht statt. Die sich daran anschließende Bakterien-Transformationen wurde mit 1-4 μl des Ligationsproduktes durchgeführt.

Alternativ wurde auch das *Rapid DNA Ligation Kit* von Fermentas eingesetzt, welches die Ligationenreaktion auf 5 Minuten verkürzt. Das Protokoll hierzu kann dem Handbuch des Kits entnommen oder auf der Homepage des Herstellers gefunden werden (<http://www.fermentas.com>; Stand 24.03.2009).

3.2.8.2 TOPO-TA Ligation

Das *TOPO-cloning Kit* (Invitrogen) ermöglicht es PCR Produkte in den vom Hersteller entwickelten *pCRII-TOPO* Vektor zu ligieren. Dies wird durch die Tatsache ermöglicht, dass die Taq Polymerase einen 3'-Adenosin Überhang an die PCR Produkte anfügt, worüber diese an die mit 5'-Thymidin Überhängen versehenen Enden des TOPO Vektors ligieren können.

Über ein blau/weiß Screening, basierend auf der Komplementation des auf dem TOPO Vektor befindlichen β -Galaktosidase Gens, können auf mit X-Gal behandelten LB-Agar Platten Kolonien mit erfolgreich ligiertem Insert (= weiß) detektiert, bzw. selektioniert werden.

Weitere Informationen zum TOPO cloning, sowie das Ligationen Protokoll können dem Handbuch des Kits sowie der Homepage des Herstellers entnommen werden (<http://www.invitrogen.com>; Stand: 24.03.2009).

3.2.9 Polymerase Kettenreaktion (Polymerase Chain Reaction)

Mit Hilfe der Polymerase Chain Reaction (PCR) können DNA Sequenzen millionenfach kopiert werden. Dies erlaubt es zum einen DNA Sequenzen in Form von PCR Amplifikaten auf einem Elektrophoresegel sichtbar zu machen (analytische PCR) und damit zu detektieren, zum anderen

können Gene oder andere Sequenzmotive aus ihrem Ursprungsglocus herauskopiert und so für Klonierungsarbeiten und „gene-engineering“ eingesetzt werden (präparative PCR).

3.2.9.1 Standard PCR

Die Amplifikation der Ziel-DNA erfolgt durch die aus dem Bakterium *thermophilus aquaticus* stammende thermostabile Taq Polymerase, welche in der Lage ist entlang eines DNA Einzelstranges in 5'>3' Richtung einen komplementären Gegenstrang zu synthetisieren. Allerdings benötigt die Taq zum Synthesestart ein Oligonukleotid (Primer), welches komplementär an den Einzelstrang bindet und der Taq Polymerase ein freies 3'-OH Ende als Startpunkt bietet. Desweiteren benötigt die Reaktion Desoxynukleotid-Triphosphate (NTP), Magnesiumchlorid und Reaktionspuffer. Die Ansatzgrößen können zwischen 25 µl und 100 µl variieren. Ein typischer 50 µl Ansatz sieht demnach wie folgt aus:

DNA Template (10-50 ng)	1 µl
Primer sense (10µM)	1 µl
Primer antisense (10µM)	1 µl
NTP (10µM)	1 µl
Reaktionspuffer (10x)	5 µl
MgCl ₂ (0,5-5nM)	3 µl
Taq-Polymerase (5U/µl)	0,5 µl
H ₂ O	37,5 µl (add 50 µl)

Die PCR Reaktion selbst läuft in drei unterschiedlichen Schritten ab, die sich 25-bis 40-mal wiederholen und unter speziellen Temperaturbedingungen erfolgen: im ersten Schritt wird die DNA bei 94 °C aufgeschmolzen, d.h. einzelsträngig gemacht. Im zweiten Schritt wird die Temperatur auf die Primer-abhängige Annealing-Temperatur reduziert, welche sich ca. 2 bis 5 °C unterhalb der Schmelztemperatur des Primer befinden sollte und eine spezifische Anlagerung des Primers an seine Zielsequenz gewährleistet. Idealerweise sollte die Annealing Temperatur zwischen 50 °C und 65 °C betragen und die Schmelztemperatur der beiden verwendeten Primer sich nicht um mehr als 5 °C unterscheiden. Im dritten Reaktionsschritt wird die Temperatur auf 72 °C erhöht, da dies die optimale Arbeitstemperatur für die Taq-Polymerase darstellt. Abhängig von der Län-

ge des zu amplifizierenden Sequenzabschnittes wird die Elongationszeit grob auf ca. 1 Minute pro 1 kb Zielsequenz limitiert.

Die Standardeinstellung eines für die PCR benutzen Thermocyclers sieht demnach wie folgt aus:

1 Zyklus	2-5 min	94 °C
25-40 Zyklen	1 min	94 °C
	1 min	50-65 °C
	1 min/kb	72 °C
1 Zyklus	5-10 min	72 °C
1 Zyklus	∞	4 °C

Neben der Taq-Polymerase wurde für präparative PCR Reaktionen auch Herculase® (Stratagene) eingesetzt. Dabei handelt es sich eigentlich um ein Enzymgemisch aus klassischer Taq-Polymerase und Pfu-Polymerase, welches die Anzahl fehlerhaft eingebauter Nukleotide verringert und deshalb gerade bei der Amplifikation langer DNA Sequenzen oder funktionell relevanter Sequenzelemente von Vorteil sein kann.

3.2.9.2 PCR zum Anfügen von DNA Sequenzen

Während der Klonierung der CRH-Cre-/CRH-CreER2-Konstrukte konnten einzelne Konstruktelemente oftmals nicht mit Hilfe von Restriktionsenzymen aus ihrem Ursprungslocus herausgeschnitten und anschließend miteinander ligiert werden. Entweder fanden sich keine geeigneten Schnittstellen an den Enden der jeweiligen Elemente oder die Schnittstellen befanden sich zusätzlich auf den Elementen des Zielvektors selbst. In diesem Falle wurden Primer entworfen, die neben ihrer Bindesequenz für das zu amplifizierende Klonierungselement einen 5'-Überhang enthielten. Dieser Primerüberhang konnte entweder als Restriktionsschnittstelle oder auch als funktionelles Element entworfen werden (die Kozak Sequenz wurde so z.B. an die Cre-Rekombinase angefügt). Als PCR Produkt erhält man auf diese Weise die PCR-Zielsequenz an deren Enden sich die Sequenzen des Primerüberhanges befinden.

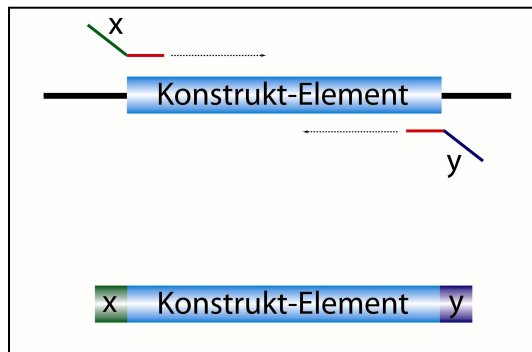
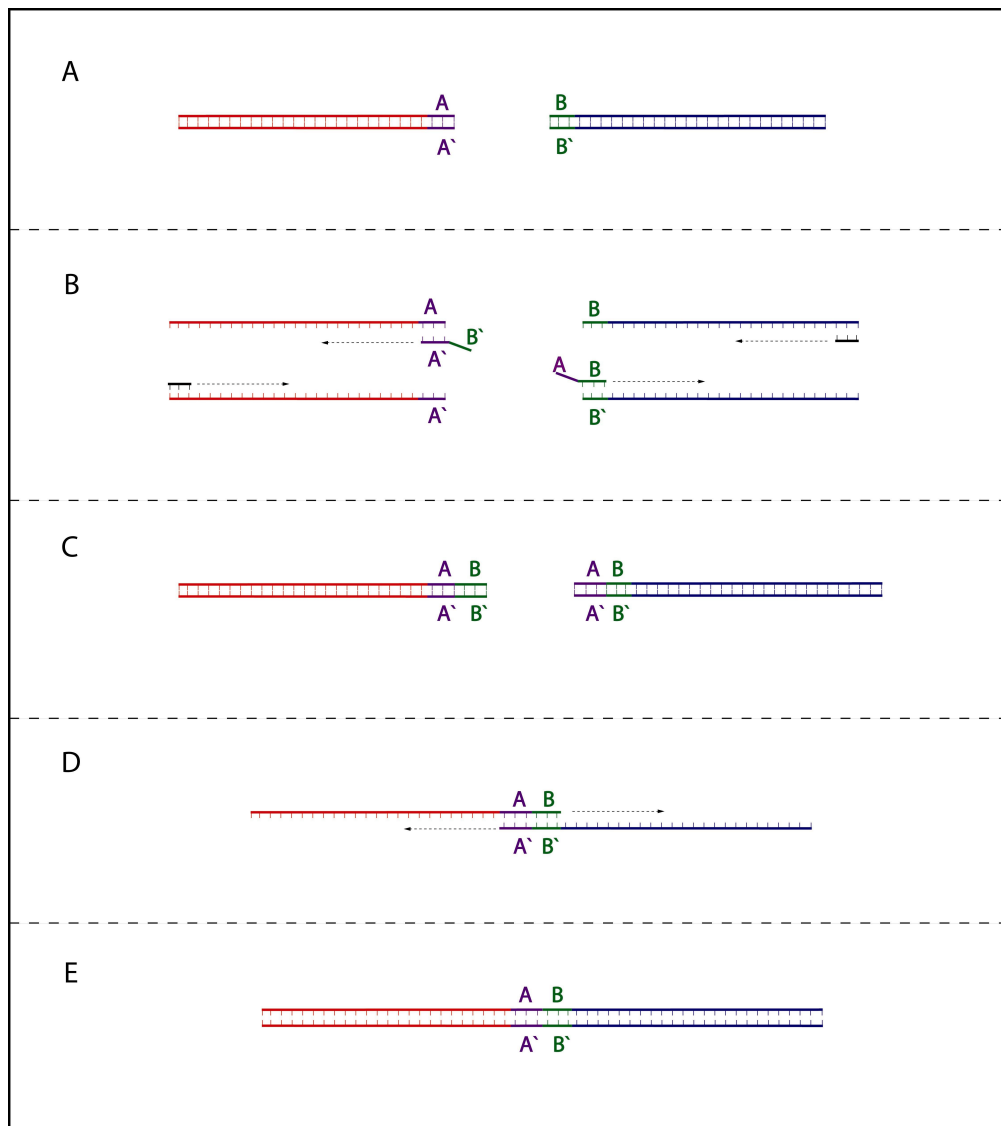


Abbildung 7: Schematische Darstellung der Addition von DNA-Sequenzen per PCR.

3.2.9.3 PCR zur Aneinanderfügung von DNA Elementen (overlapping PCR)

Mit der so genannten overlapping-PCR ist es möglich zwei verschiedene DNA Sequenzen miteinander zu fügen ohne dafür auf Restriktionsenzyme, bzw. Ligasen zurückgreifen zu müssen (siehe Abbildung 8). In der vorliegenden Arbeit wurde diese Methode eingesetzt, um ein IRES-Venus Fragment mit einer bpA Sequenz zu verbinden. In zwei ersten PCR Runden werden dazu die zu ligierenden Fragmente amplifiziert. Wichtig dabei ist, dass die Primer, welche an den Verknüpfungsenden der Einzelfragmente binden einen ca. 12 bp langen Primerüberhang besitzen, der komplementär zum Verknüpfungsende des jeweils anderen Fragments ist. Dies führt dazu, dass am Ende der ersten PCR beide beteiligten Fragmente an ihrem 5`-, bzw. 3`-Ende eine zusätzliche Sequenz von 12 bp tragen, die komplementär zu dem 5`-, bzw. 3`-Ende des Partnerfragmentes ist. In einer zweiten PCR werden nun diese beiden PCR Produkte gemeinsam als Template eingesetzt und können nach dem Aufschmelzen über ihre komplementären 12 bp Enden (und damit einer Gesamt-Annealingsequenz von 24 bp) miteinander ligieren. Nach dem Überlappen fungieren die freien Enden als „Pseudoprimer“ und sorgen dafür, dass die beiden überlappenden Stränge zu einem vollständigen Doppelstrang synthetisiert werden. Dieser Doppelstrang kann anschließend mittels zweier Primer, die an den äußeren Enden des Fusionsprodukts binden weiter amplifiziert werden.

Abbildung 8 (nachfolgende Seite): Schematische Darstellung der overlapping-PCR. (A) Ausgangsfragmente, (B) Anfügen der komplementären Ende per PCR, (C) Ausgangsfragmente mit angefügtem komplementären Ende, (D) Hybridisierung der Ausgangsfragmente und (E) finale Elongation zum Fusionsprodukt. Das Fusionsprodukt kann anschließend mittels zweier an den äußeren Enden bindenden Primer amplifiziert werden.



3.2.9.4 Splinkerette PCR

Die Splinkerette PCR (Horn et al., 2007) ist eigentlich eine Kombination aus genomischem Verdau, der Ligation eines Adaptors und einer abschließenden PCR. Man verwendet sie um die chromosomalen Integrationsstellen von „trapping“-Vektoren oder, wie im vorliegenden Fall, Transgenen herauszufinden. Die Idee hinter dieser Methode ist, die chromosomale DNA des transgenen Tieres mit einem relativ häufig schneidenden Enzym (wie z.B. ApoI oder BstY1) zu verdauen, so dass unter den vielen Restriktionsfragmenten auch eines ist, welches das 5`-oder 3`-Ende des Transgenes sowie die sich bis zur nächsten Schnittstelle anschließende chromosomale Sequenz des Integrationsortes aufweist (Abbildung 9). Nun wird an alle Fragmente eine Adaptor ligiert, der eine durch einen „Hairpin-loop“ unzugängliche Primerbindungsstelle besitzt. In einer PCR Reaktion wird der für diese Sequenz spezifische Primer sowie ein für das Transgenende spezifischer Primer eingesetzt. Da der Adaptor Primer wegen des Hairpins nicht binden kann,

erfolgt im ersten Zyklus nur eine vom Transgen-spezifischen Primer ausgehende Elongation, so dass unspezifische Amplifikationen anderer Fragmente verhindert werden. Sobald die komplementäre Bindestellensequenz des Adaptorprimers von der Elongation erfasst wird, steht sie dem Adaptor Primer im neu entstandenen DNA Strang (nun ohne Hairpin) als Bindungsstelle zur Verfügung und forciert somit die Amplifikation des Integrationsort tragenden Fragments. Das aufgereinigte PCR Produkt kann dann mit Hilfe des Transgen-spezifischen Primers sequenziert und die chromosomale Sequenz anschließend in den Online-Mausgenom Datenbanken *NCBI* und/oder *Ensembl* nach möglichen Treffern durchsucht werden.

Die Durchführung der Splinkerette PCR wurde gemäß dem Protokoll von Horn et al. (2007) durchgeführt.

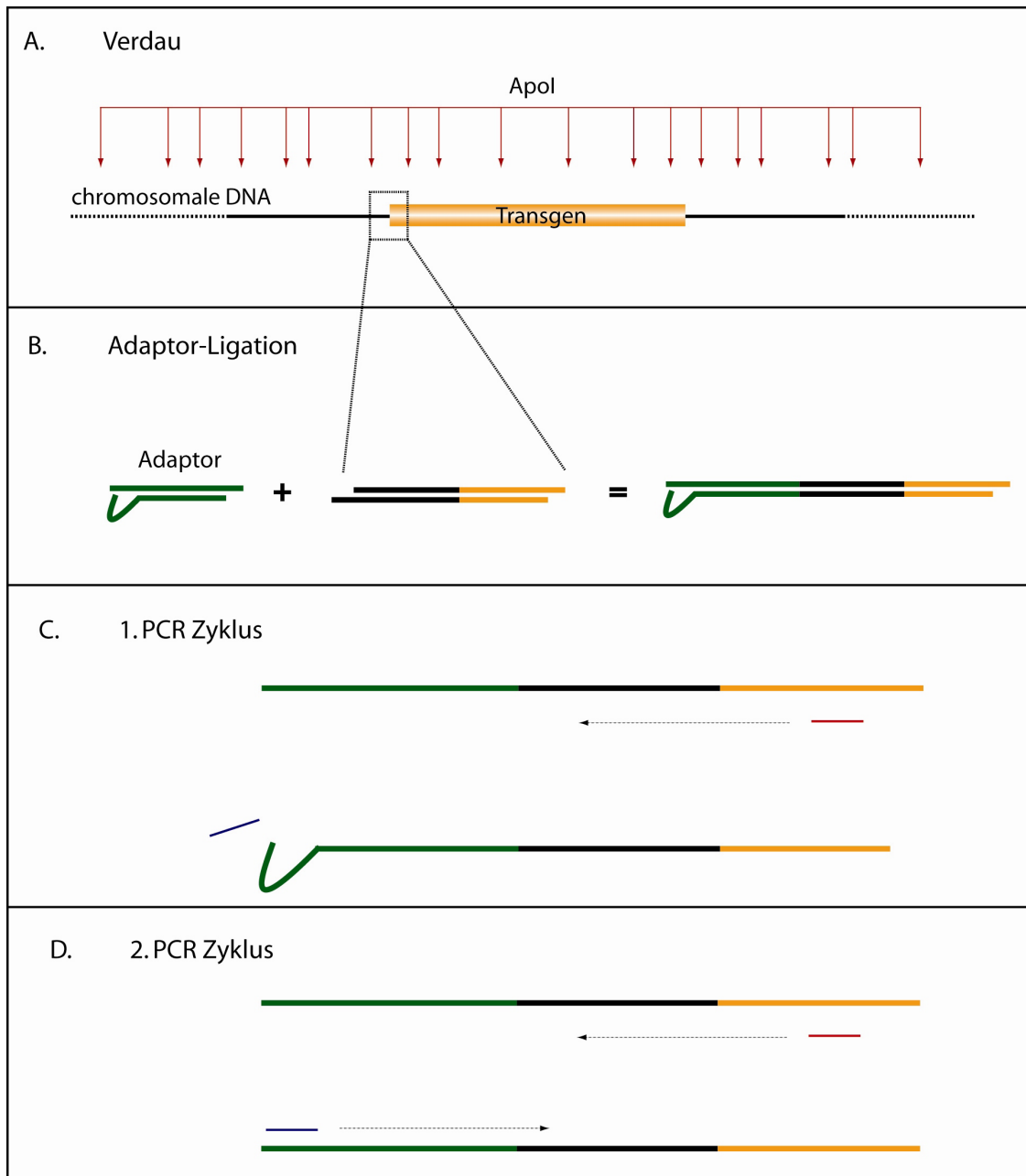


Abbildung 9 (vorhergehende Seite): Schematische Darstellung der Splinkerette-PCR. (A) Verdau der genomischen DNA mit ApoI, (B) Ligation des SPLK-Adaptors, (C) 1. PCR-Zyklus mit Transgen-spezifischem Primer und D) Amplifikation der SPLK-Ligation.

3.2.9.5 Kolonie-PCR

Zum schnellen Durchsuchen von Bakterienkolonien auf Anwesenheit transformierter Plasmide oder erwünschter Rekombinationsereignisse (wie z.B. bei der ET-Klonierung) wurden diese mit einer Impföse oder einer sterilen Pipettenspitze gepickt, in 50 µl steriles Wasser überführt und dort für 2 Minuten bei 90-100 °C aufgekocht. 1-5 µl aus dem Lysat wurden dann als Template in die jeweilige PCR Reaktion eingesetzt.

3.2.10 PCR Aufreinigung

Um PCR Produkte für nachfolgende Reaktionen (Ligationen, Sequenzierungen) von störenden enzymatischen Nebenprodukten zu befreien, wurden diese mit Hilfe des *QIAquick PCR-Purification Kits* von Qiagen aufgereinigt. Das Protokoll kann dem beigegeführten Handbuch des Kits entnommen oder auf der Homepage des Herstellers eingesehen werden (<http://www1.qiagen.com>, Stand: 26.03.2009).

3.2.11 Sequenzierung

Alle für diese Arbeit benötigten Sequenzierungen von Plasmiden, PCR- und Klonierungsprodukten wurden als Auftragsarbeit von der Firma Sequiserve (Vaterstetten) durchgeführt und beruhen auf der fluoreszenzmarkierten Didesoxymethode nach Sanger. Die Ergebnisse der Sequenzierungen wurden als Chromatogramm- und Textdatei erhalten und mit der Software *Vector NTI* (Invitrogen) analysiert.

3.2.12 RED/ET Klonierung

Ein Ziel der vorliegenden Arbeit war es, eine transgene Mauslinie zu erzeugen, welche die Cre-Rekombinase unter der Kontrolle des CRH Promotors exprimieren sollte, um nach einer späteren Kreuzung mit der Mauslinie CRH-COE eine CRH-spezifische CRH-Überexpression zu erhalten. Nach der Konstruktion der Cre-Kassette war es daher notwendig, diese unter die Kontrolle des CRH-Promotors zu stellen, indem das Startcodon-tragende Exon 2 des CRH Gens gegen das Cre-Konstrukt mittels homologer Rekombination ausgetauscht wurde. Der zu modifizierende CRH Locus wurde dabei als BAC und Fosmid-Klon einer Mausgenom-Bibliothek bestellt und konnte so in *E. coli* Kultur amplifiziert und bearbeitet werden. Um den Austausch von Exon 2

des CRH Gens gegen das Cre-Konstrukt zu bewerkstelligen, wurde das Verfahren der RED/ET Rekombination angewandt, welches in Form eines Kits (*Counter-Selection BAC Modification Kit*) der Firma Gene Bridges erhältlich ist. Um die homologe Rekombination überhaupt zu ermöglichen, muss das Konstrukt, welches eingefügt werden soll (Zielvektor) an seinen beiden Enden mit Sequenzen versehen werden, die homolog zu den flankierenden Sequenzen des Zielbereichs sind (= homologe Arme). Die Zielsequenz selbst (im vorliegend Fall ein BAC/Fosmid-Klon, welcher den murinen CRH Locus trägt) wird als BAC oder Fosmid-Insert in *E. coli* beherbergt und kann durch die auf dem Vektor-Backbone liegende Chloramphenicol Resistenz selektiert werden. Wichtiger Bestandteil des Kits ist das *Red/ET recombination protein expression plasmid pSC101-BAD-gba^{tet}*. Dieses Plasmid kann durch L-Arabinose zur Expression der Phagen-Proteine RecE und RecT induziert werden, welche dann durch Herbeiführung eines Strangbruches und Einzelstrangstabilisierung die homologe Rekombination katalysieren. Das Plasmid besitzt außerdem eine Tetracyclin-Resistenz und kodiert für ein Temperatur-sensitives RepA-Protein, welches die Replikation des Plasmids bei 30 °C ermöglicht. In der praktischen Ausführung wurde das BAC/Fosmid tragende Wirtsbakterium zuerst mit dem Expressionplasmid transformiert und nach positiver Selektion (mit Tetracyclin und Chloramphenicol) mit dem linearisierten Cre-Konstrukt elektroporiert. Nach Arabinose-Induktion erfolgte die Rekombination in nicht-selektivem Flüssigmedium für ca. 70 Minuten bei 37 °C. Da das Cre-Konstrukt eine eigene Neomycin/Kanamycin Selektionskassette trägt wurden die Bakterien auf Chloramphenicol-Kanamycin Platten ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C bebrütet. Das Temperatur-sensitive Rep A Protein verliert bei dieser Temperatur seine Funktionalität, so dass das Expressionsplasmid in den wachsenden Bakterien Kolonien sukzessiv verloren geht. Erfolgreiche Rekombinationsereignisse wurden anschließend per PCR und Southern Blot validiert. Das ausführliche Protokoll zur RED/ET Klonierung kann dem Handbuch des *Counter-Selection BAC Modifications Kits* entommen oder auf der Homepage des Herstellers eingesehen werden (<http://www.genebridges.com>; Stand 30.03.2009).

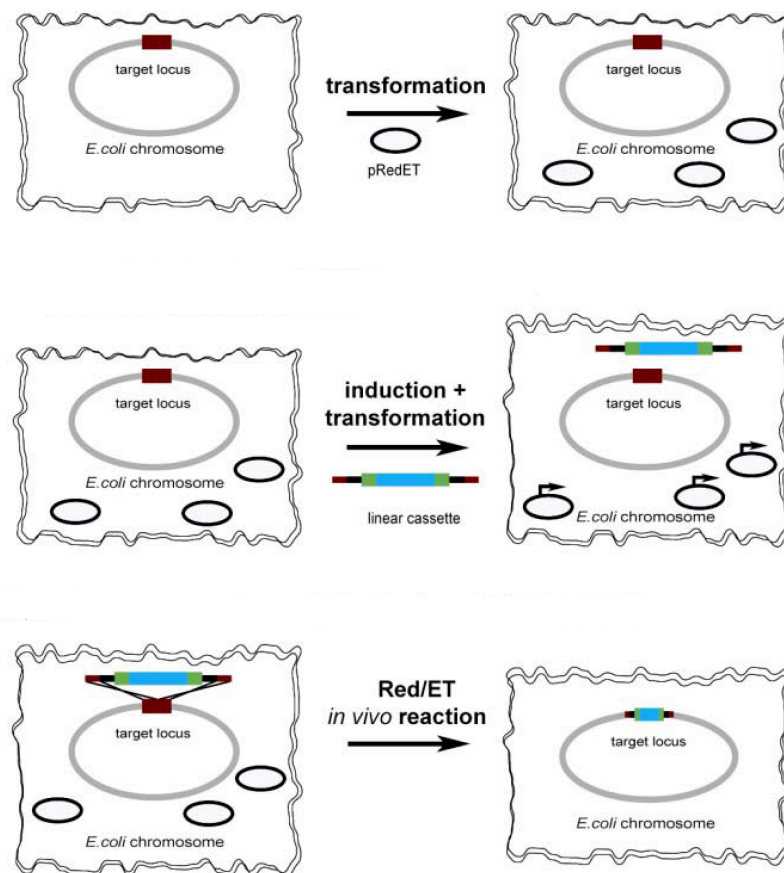


Abbildung 10: Schematische Darstellung der RED/ET Klonierungs-Technik.

3.2.13 Radioaktive DNA-Hybridisierung

Die Anwesenheit bekannter DNA Sequenzen in einem Genom oder DNA-Gemisch kann mit Hilfe radioaktiv markierter, Zielsequenz-homologer DNA Sonden überprüft werden. Innerhalb der vorliegenden Dissertation wurde die radioaktive Hybridisierung eingesetzt, um positive Rekombinationsereignisse der RED/ET Klonierung zu validieren und um ES-Zellen mit erfolgreich integriertem CRH-Cre Konstrukt zu detektieren.

3.2.13.1 DNA Isolation

Für Fosmid und BAC-Klone wurde das *Qiagen Maxi-Prep Kit*, bzw. *Large-Construct Kit* zur DNA Präparation verwendet.

ES-Zellen wurden in 96-well Titerplatten über Nacht mit speziellem Lysis-Puffer bei 56 °C inkubiert und die DNA per Ethanol-fällung präzipitiert.

3.2.13.2 Restriktionsverdau und Elektrophorese

5-10 μg DNA wurden mit 30 bis 60 Units des entsprechenden Restriktionsenzymys über Nacht bei 37 °C verdaut und am darauffolgenden Tag auf ein 0,8 %-iges Agarosegel aufgetragen.

Die Laufzeit des Gels betrug ca. 6 Stunden bei 300mA und 50 V.

3.2.13.3 DNA Transfer (Southern Blot)

Um die im Gel befindliche DNA einzelsträngig zu machen, wurde das Gel zweimal für je 15 Minuten unter leichtem Schütteln in Denaturierungspuffer inkubiert. Anschließend erfolgte ein Neutralisierungsschritt für ebenfalls zweimal 15 Minuten in Neutralisierungspuffer, gefolgt von 10 Minuten Äquilibration in 20x SSC.

Für den Transfer der DNA auf eine Nylon Membran (*Hybond N⁺*, GE Healthcare) wurde der Southern Blot wie folgt aufgebaut:

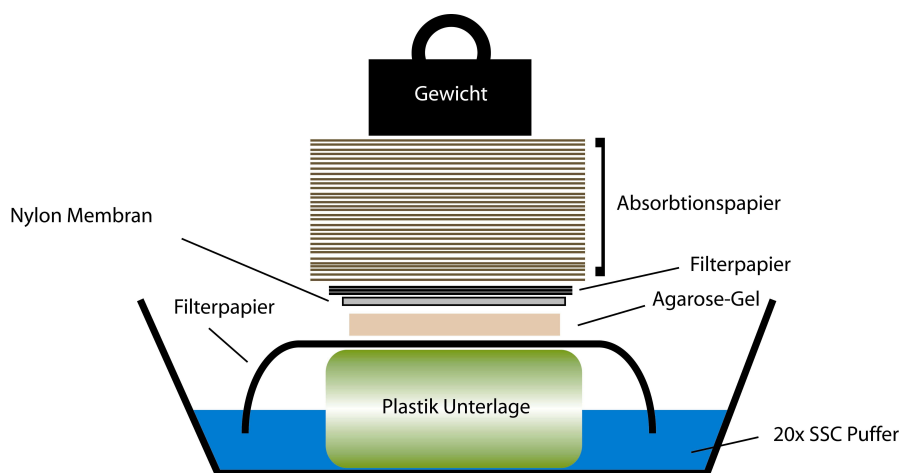


Abbildung 11: Aufbau des Southern Blots.

Die Transferzeit betrug dabei zwischen 12 und 20 Stunden. Nach dem Abbau des Blots wurde die Orientierung des Gels an der Nylonmembran markiert und die DNA durch UV-Bestrahlung auf der Membran immobilisiert. Um zu kontrollieren, ob die DNA auf die Nylonmembran übertragen wurde, wurde das Gel unter UV-Licht auf An-, bzw. Abwesenheit von DNA-Banden hin untersucht.

3.2.13.4 Radioaktive Markierung der Hybridsierungs-Sonde

Ausgangsmaterial der Sondenmarkierung bildet das aufgereinigte PCR Amplifikat der zu detektierenden DNA Sequenz. Für die Markierung selbst wurde das *Megaprime DNA labelling system*

der Firma Amersham verwendet. 25 ng der DNA Sonden werden dabei mit 5 μl random-Primern bei 95 °C für 5 Minuten aufgeschmolzen und nach dem Abkühlen auf Eis mit 2 Einheiten Klenow-Fragment, Reaktionpuffer und 50 μCi radioaktiv markierten [α - ^{32}P]-dCTP (GE Healthcare) bei 37 °C für 30 Minuten inkubiert. Der 50 μl Reaktionsansatz stellte sich demnach folgendermaßen dar:

DNA Probe	x (25 ng)
ad 28 μl H ₂ O	ad 28 μl
random Primer	5 μl
5 Minuten bei 95 °C	
auf Eis abkühlen lassen	
Megaprime reaction buffer	10 μl
[α - ^{32}P]-dCTP	5 μl
Klenow Fragment	2 μl
Inkubation für 30 Minuten bei 37 °C	

Die nun radioaktiv markierte Sonde wurde anschließend auf *Microspin S-300* Säulen (Amersham) pipettiert und durch Zentrifugation bei 3000 rpm für 1 Minute von nicht eingebauten Nucleotiden separiert. Um die Radioaktivität der Sonde zu bestimmen, wurde 1 μl der aufgereinigten Sonde in 2 ml Szintillationsflüssigkeit gegeben und in einem Beta-Counter gemessen. Für die weitere Hybridisierungsreaktion kamen dabei nur Sonden zum Einsatz, die eine Aktivität von ≥ 500000 counts/ μl aufwiesen.

3.2.13.5 Hybridisierung der radioaktiv markierten Sonde

Zunächst wurde die DNA-Membran für ca. 30 Minuten in 5-10 ml „Rapid-Hyb“ Hybridisierungspuffer bei 65 °C prähybridisiert. Parallel dazu wurde das komplette Volumen der radioaktiven Probe zusammen mit 100 μl Lachsspermien-DNA für 5 Minuten bei 95 °C denaturiert und auf Eis abgekühlt. Anschließend wurde dieses Gemisch in das die Membran und den Hybridisierungspuffer enthaltende Reaktionsgefäß hinzugegeben und über Nacht bei 64 °C in einem Rotationsofen hybridisiert.

Am darauffolgenden Tag wurde die Membran für jeweils 20 Minuten mit Blot-Waschpuffer 1, bzw. Blot-Waschpuffer 2 gewaschen und auf Filterpapier getrocknet. Zur Detektion des radioaktiven Signals wurde die Membran in eine Klarsichtfolie verpackt, in einer Filmkassette fixiert und mit einem Röntgenfilm exponiert. Abhängig von der Signalstärke konnte die Expositionsdauer einige Stunden bis mehrere Tage andauern. Die Entwicklung des Filmes erfolgte unter Rotlicht in einem automatisierten Entwicklungsgerät.

3.2.14 Kolonie Abklatsch (Colony Lift)

Eine Variante der radioaktiven Hybridisierung ist der so genannte Kolonie Abklatsch (im englischen Sprachgebrauch: Colony Lift), mit dem alle auf einer LB-Agar Platte gewachsenen Bakterienkolonien analysiert werden können.

In der vorliegenden Arbeit wurde diese Methode angewendet, um während des RED/ET Klonierens rekombinante Bakterienkolonien detektieren zu können. Im Unterschied zum bereits beschriebenen Hybridisierungsprotokoll muss beim Colony Lift kein vorhergehender präparativer Verdau durchgeführt werden und selbst der eigentliche Southern Blot ist nicht notwendig. Stattdessen reicht es aus eine kreisförmige Nylonmembran auf eine vorgewärmte Bakterienplatte abzurollen und sie nach einigen Sekunden wieder abziehen, wobei die Bakterienkolonien an der Membranoberfläche kleben bleiben. Wichtig ist dabei, die Nylonmembran vorher so zu markieren, dass die Orientierung auf der Agar-Platte nach der Entwicklung des Filmes rekonstruierbar ist. Nach dem Abziehen der Membran wird diese nacheinander auf mit Denaturierungspuffer, Neutralisierungspuffer (je 2 x 10 Minuten) und 20 x SSC (1 x 5 Minuten) getränktem Filterpapier gelegt. Anschließend kann die DNA durch UV-Bestrahlung immobilisiert und für die Hybridisierung mit einer radioaktiv markierten Sonde eingesetzt werden.

3.2.15 RNA-Isolation

Als Ausgangsmaterial für diverse RT-PCRs, sowie der 5'RACE und der 3'RACE wurde RNA sowohl aus kultivierten Säugerzell-Linien (HEK293) als auch aus corticalem Gehirngewebe mit Hilfe von TRIzol® isoliert. Die Homogenisierung der Zellen erfolgte im Fall von Säugerzell-Linien durch direkte Zugabe von 1 ml TRIzol® auf eine 10 cm² Kulturschale, gefolgt von mehrmaligem Aufziehen und Ausstoßen durch eine Kanüle. Gehirngewebe wurde dagegen mit Hilfe eines Dispergiergeräts in 1 ml TRIzol homogenisiert und anschließend per Ultraschall sonifiziert. Anschließend gestaltete sich das Protokoll wie folgt:

Separation

- Inkubation der Proben für 5 Minuten bei Raumtemperatur
- Hinzufügen von 0,2 ml Chloroform/1 ml TRIzol®
- Vortexen, anschließend Inkubation für 3 Minuten bei Raumtemperatur
- Zentrifugation für 15 Minuten bei 13000 rpm und 4 °C

Präzipitation

- Transfer des Überstandes in eine neues Reaktionsgefäß
- Hinzufügen von 0,5 ml Isopropanol/1ml TRIzol®
- Inkubation für 10 Minuten bei Raumtemperatur
- Zentrifugation für 10 Minuten bei 13000 rpm und 4 °C
- Verwerfen des Überstandes

Waschen und Lösen

- Hinzufügen von 1 ml 70% Ethanol/1ml TRIzol®
- Vortexen
- Zentrifugation für 5 Minuten bei 9000 rpm und 4 °C
- Überstand verwerfen
- Lufttrocknung für ca. 20 Minuten bei 37 °C
- Lösen des Pellets in 40 µl H₂O
- Lagerung bei -80 °C

3.2.16 Reverse Transkription

Zum Umschreiben der schnell degradierenden RNA in stabile cDNA und deren Verwendung als PCR Template wurde eine reverse Transkription mit *SuperScript™ II Reverse Transcriptase* (Invitrogen) durchgeführt. Ausgehend von einem Oligo(dT)₁₂₋₁₈ Primer, der an den Poly-A Schwanz der mRNA bindet, erfolgte eine ca. 50-minütige Transkription, sowie ein anschließender RNase H Verdau, um cDNA-komplementäre RNA Moleküle zu entfernen.

Ein genaues Protokoll findet sich in den Herstellerangaben.

Für anschließende PCR Reaktionen wurden jeweils 2 µl cDNA eingesetzt.

3.2.17 RACE-PCR

RACE steht für „rapid amplification of cDNA-ends“ und bezeichnet eine Methode mit der es möglich ist, das 5'-Ende (5'RACE) oder das 3'-Ende (3'RACE) einer cDNA zu amplifizieren und anschließend per Sequenzierung zu analysieren. Voraussetzung dabei ist, dass die Sequenz eines Teilbereichs der mRNA/cDNA bekannt ist und somit ein oder mehrere für diese Region spezifische Primer eingesetzt werden können.

Die 3'RACE-PCR startet, ausgehend von dem für eukaryotische RNA typischen polyA-Schwanz, mit einer reversen Transkription der mRNA unter Verwendung eines Oligo dT-Primers. Anschließend erfolgt die Komplettierung des Gegenstranges mit einem spezifischen, in einer bekannten Region bindenden Primer. Die weitere Amplifikation erfolgt mit dem eben genannten spezifischen Primer, sowie einem Primer, der an die Oligo Anker-Sequenz bindet.

Im Gegensatz zur 3'RACE-PCR startet die 5'RACE-PCR die reverse Transkription der RNA mit einem spezifischen Primer (Abbildung 12). An die 5'Enden der synthetisierten cDNA Moleküle wird dann mit Hilfe der Terminalen Transferase ein Poly-A (oder auch Poly-C) Schwanz angefügt, der einem Anker-Primer als Ausgangspunkt für die „Rückreaktion“ dient, so dass die cDNA doppelsträngig vorliegt. Die Amplifikation des 5'cDNA Bereiches erfolgt mit einem zweiten Anker-Primer, sowie einem zweiten spezifischen Primer, die beide ein wenig weiter innen binden und dadurch die Spezifität der PCR weiter erhöhen (nested PCR).

Sowohl für die 3'RACE-PCR als auch für die 5'RACE-PCR wurde das *5'3'RACE Kit, 2nd Generation* von Roche eingesetzt. Das detaillierte Protokoll kann aus dem Handbuch des Kits entnommen oder auf der Homepage des Herstellers eingesehen werden (<http://www.roche-applied-science.com>; Stand 30.03.2009).

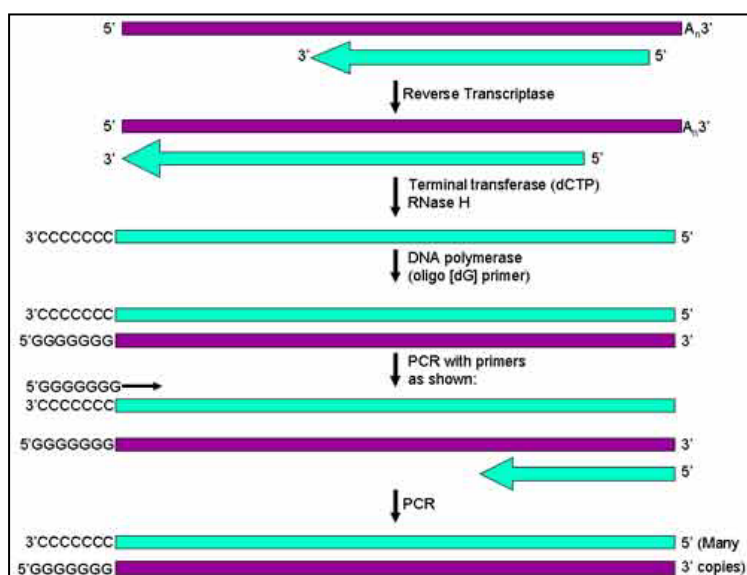


Abbildung 12: Schematische Darstellung einer 5'-RACE PCR.

3.2.18 Konzentrationsbestimmung von DNA und RNA

Bei der Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren wird die Tatsache genutzt, dass deren Absorptionsmaximum im Mittel bei 260 nm liegt und die Absorption gemäß dem Lambert-Beerschen Gesetz proportional zur Konzentration der absorbierenden Substanz (in Lösung) ist. Somit lassen sich DNA/RNA Konzentrationen mit Hilfe eines UV-Photometers und folgender Berechnungsformel bestimmen:

$$c (\mu\text{g}/\mu\text{l}) = \frac{\text{OD}_{260\text{nm}} * \text{Verdünnung} * \text{Koeffizient}}{1000}$$

, wobei

- Koeffizient (Doppelstrang DNA) = 50
- Koeffizient (Einzelstrang DNA) = 37
- Koeffizient (RNA) = 40

Für optimale Messungen sollte sich die optische Dichte (OD) in einem Bereich zwischen 0,1 und 1,0 befinden, da das Verhältnis zwischen Absorption und Konzentration hier im linearen Bereich liegt. Darüber hinaus kann der Quotient aus der Absorption bei 260 nm und 280 nm als Indikator für die Reinheit der DNA herangezogen werden und sollte idealerweise $A_{260}/A_{280} \geq 1,8$ und $\leq 2,0$ sein. Werte unterhalb von 1,8 weisen auf Kontamination mit Proteinen hin, während Werte überhalb von 2,0 eine Folge möglicher Verunreinigung mit RNA sein können.

3.3 In-Situ-Hybridisierung

Mittels der In-Situ-Hybridisierung kann das Expressionsmuster von Genen auf Gewebeschnitten analysiert werden. Hierzu wird die entsprechende mRNA des Gens mit einer radioaktiv markierten Sonde hybridisiert und kann so anschließend auf einem Röntgenfilm qualitativ und quantitativ untersucht werden. Die Arbeitsprozesse dieser Technik gliedern sich auf in: radioaktive Markierung der Sonde, Vorbehandlung der Gewebsschnitte, Hybridisierung der Sonde, Waschen der Schnitte und Entwicklung des Röntgenfilms.

3.3.1 Radioaktive Markierung der Sonde

Alle für die In-Situ-Hybridisierung eingesetzten Sonden lagen als Inserts des *pCRII-TOPO* Vektors vor. Um für die In-Situ-Hybridisierung eingesetzt werden zu können, wurden die Sonden

mit Primern amplifiziert, welche an die flankierenden, auf dem Vektor befindlichen Sequenzmotive Sp6 und T7 binden. Etwa 2 µl der aufgereinigten PCR wurden als Template für die *in vitro* Transkription radioaktiv markiert. Entsprechend der Sonden-Orientierung im Vektor war während der *in vitro* Transkription der Probe darauf zu achten, welche Polymerase hierzu verwendet wurde, um einen zur mRNA komplementären anti-sense Strang zu erhalten. Der Reaktionsansatz für die *in vitro* Transkription sah wie folgt aus:

amplifizierte Sonde	2 µl
H ₂ O-DEPC	ad 30 µl
10x Transkriptionspuffer	3 µl
NTP-Mix (ATP/CTP/GTP jeweils 10mM)	3 µl
0,5 M DTT	1 µl
RNAse-Inhibitor, 40U/µl (Roche)	1 µl
[α-thio- ³⁵ S]-UTP (12,5 mCi, GE Healthcare)	6 µl
T7 oder Sp6 RNA Polymerase (20U/µl)	1 µl
Σ = 30 µl	

Der Ansatz wurde für insgesamt 3 Stunden bei 37 °C inkubiert. Nach einer Stunde wurden 0,5 µl RNA Polymerase nachpipettiert. Das DNA Template wurde durch Zugabe von 2 µl RNase-freier DNaseI (Roche) gefolgt von einer 15-minütigen Inkubation bei 37 °C degradiert. Die Aufreinigung der Sonde erfolgte über eine Silikatsäule mit dem *RNeasy Minikit* von Qiagen. Das Protokoll kann dem Handbuch des Kits entnommen oder auf der Homepage des Herstellers eingesehen werden (<http://www1.qiagen.com>; Stand 31.02.2009). Das Endvolumen des Sondenansatzes betrug 100 µl, woraus 1 µl in 2 ml Szintillationsflüssigkeit transferiert und zur Bestimmung der Radioaktivität im Beta-Counter gemessen wurde.

3.3.2 Vorbehandlung der Gefrierschnitte

Die für die In-Situ-Hybridisierung eingesetzten Gefrierschnitte hatten durchgängig eine Dicke von 20 µm und wurden bis zu ihrer Verwendung bei -20 °C aufbewahrt. 30 Minuten vor Beginn der Vorbehandlung wurden die Schnitte bei 37 °C aufgetaut. Anschließend wurde folgendes Protokoll angewendet:

1.	10 Minuten, 4 °C	4 % PFA/PBS
2.	3 x 5 Minuten	1 x PBS/DEPC
3.	10 Minuten	0,1 M Triethanolamin-HCl (pH 8,0)
4.	2 x 5 Minuten	2 x SSC/DEPC
5.	1 Minute	60 % Ethanol/DEPC
6.	1 Minute	75 % Ethanol/DEPC
7.	1 Minute	95 % Ethanol/DEPC
8.	1 Minute	100 % Ethanol
9.	1 Minute	CHCl ₃ (Chloroform)
10.	1 Minute	100 % Ethanol
Trocknen der Schnitte bei Raumtemperatur für mindestens 1 Stunde		

3.3.3 Hybridisierung der radioaktiv markierten Sonde

Die radioaktiv markierte Sonde wurde mit Hybridisierungsmix so gemischt, dass eine Aktivität von 35000 bis 70000 counts per minute (cpm)/ μ l erreicht wurde. Der Ansatz wurde dann für 2 Minuten bei 95 °C erhitzt und kurz auf Eis abgekühlt. Pro Objektträger wurden zwischen 95 und 100 μ l der Hybridisierungslösung vorsichtig und unter Vermeidung von Luftblasen aufpipettiert. Die Objektträger wurden mit Deckgläschen versehen, in eine feuchte Hybridisierungskammer transferiert und dort über Nacht in einem Ofen bei 56 °C inkubiert.

3.3.4 Waschen der Gefrierschnitte nach der Hybridisierung

Die Objektträger wurden aus dem Ofen, bzw. der Hybridisierungskammer geholt und die Deckgläschen vorsichtig entfernt. Anschließend wurden die Objektträger nach folgendem Protokoll gewaschen:

1.	4 x 5 Minuten	Raumtemperatur	4 x SSC
2.	20 Minuten	37 °C	NTE (20 μ g/ml RNaseA)
3.	2 x 5 Minuten	Raumtemperatur	2 x SSC/1 mM DTT
4.	10 Minuten	Raumtemperatur	1 x SSC/1 mM DTT

5.	10 Minuten	Raumtemperatur	0,5 x SSC/1 mM DTT
6.	2 x 30 Minuten	64 °C	0,1 x SSC/1 mM DTT
7.	2 x 10 Minuten	Raumtemperatur	0,1 x SSC
8.	1 Minute	Raumtemperatur	30 % Ethanol in 300 mM NH ₄ OAc
9.	1 Minute	Raumtemperatur	50 % Ethanol in 300 mM NH ₄ OAc
10.	1 Minute	Raumtemperatur	70 % Ethanol in 300 mM NH ₄ OAc
11.	1 Minute	Raumtemperatur	95 % Ethanol
12.	1 Minute	Raumtemperatur	100 % Ethanol
Trocknen der Schnitte bei Raumtemperatur für mindestens 1 Stunde			

3.3.5 Entwickeln

Zur schnellen Überprüfung der Signalstärke und -qualität wurden die Objektträger in einer Filmkassette fixiert und mit einem Röntgenfilm exponiert. Die Expositionszeit betrug dabei je nach Signalstärke zwischen 24 Stunden und 7 Tagen. Zur genaueren Untersuchung und abschließenden Entwicklung wurden die Objektträger zunächst in eine Fotoemulsion (*NTB2*, Kodak) getaucht und über Nacht in einer Dunkelkammer getrocknet. Entsprechend der auf dem Röntgenfilm abgeschätzten Signalstärke wurden die Objektträger dann in einer Trocken-Box für 1-7 Wochen bei 4 °C aufbewahrt. Zur Entwicklung wurden diese anschließend für 1 Stunde bei Raumtemperatur stehen gelassen und dann für 3 Minuten in eine Entwicklerlösung (Kodak) getaucht. Die restliche Entwicklerlösung wurde für 30 Sekunden in Wasser abgespült und die Objektträger danach für 6 Minuten in Fixierlösung (Kodak) gestellt. Außerhalb der Dunkelkammer wurden die Gefrierschnitte für 25 Minuten unter fließend kaltem Wasser gespült, von verbliebenen Fotoemulsionsresten befreit und luftgetrocknet.

3.3.6 Nissl Färbung

Zur Sichtbarmachung der neuronalen Zellkörper, bzw. besseren anatomischen Einordnung der In-Situ-Signale wurde meist noch eine Nissl-Färbung mit Kresylviolett durchgeführt:

1.	10-25 Minuten	Kresylviolett
2.	2 Minuten	H ₂ O
3.	2 x 2 Minuten	70 % Ethanol
4.	15-30 Sekunden	96 % Ethanol/Essigsäure
5.	2 x 1 Minuten	96 % Ethanol
6.	2 x 2 Minuten	100 % Ethanol
7.	2 x 5 Minuten	Xylol
Einbetten der Schnitte in DPX		

3.4 Doppel-In-Situ-Hybridisierung

Um festzustellen in wie weit sich die Expression zweier Gene überlappt, bzw. kolokalisiert ist werden bei der Doppel-In-Situ zwei unterschiedliche Sonden eingesetzt, die zur späteren Differenzierung der Signale unterschiedlich markiert werden müssen. Eine Sonde wird dabei wie in der beschriebenen In-Situ-Hybridisierung radioaktiv markiert („heiße Sonde“), während in die andere Sonde Digoxigenin (DIG) -markiertes dUTP inkorporiert wird („kalte Sonde“), welches von einem DIG-spezifischen, Enzym-gekoppelten Antikörper erkannt und über dessen Substratumsatzung detektiert werden kann.

3.4.1 Herstellung der DIG-markierten Sonde

3.4.1.1 DIG-Markierung der Sonde

Für die In Inkorporation der Sonde mit DIG-11-dUTP wurde das *DIG RNA Labeling Kit* von Roche eingesetzt und gemäß dem beigefügten Protokoll folgender Ansatz vorbereitet:

amplifizierte Sonde	2 µl
10 x DIG RNA labeling mix	2 µl

10 x Transkriptionspuffer	2 μ l
T7 oder Sp6 RNA Polymerase	2 μ l
RNAse Inhibitor	1 μ l
H ₂ O	ad 20 μ l
$\Sigma = 20 \mu$ l	

Das Protokoll der *in vitro* Transkription sowie die Aufreinigung der markierten Probe ist dabei identisch mit der radioaktiven Sondenmarkierung.

3.4.1.2 Konzentrationsbestimmung der DIG Sonde

Um die Effizienz der DIG-Markierung festzustellen wurde ein so genannter Tropfentest durchgeführt. Hierzu wurden aus der markierten Sonde, sowie aus einer Referenz RNA (im *DIG RNA Labeling Kit* enthalten) Verdünnungsreihen angelegt und diese auf eine Nylonmembran (*Hybond N⁺*, Amersham) zu je gleichen Volumina aufgetropft und durch UV-Bestrahlung auf der Membran fixiert. Anschließend erfolgte die immunologische Detektion mit einem Phosphatasegekoppelten anti-Digoxigenin Antikörper unter der Verwendung von Nitroblau-Tetrazolium-Salz/5-bromo-4-chloro-3-indolyl-Phosphat (NBT/BCIP) als Substrat, welches nach der enzymatischen Umsetzung als blaues Präzipitat sichtbar wird. Durch Vergleich der Signalintensität von Probe und Referenz RNA, läßt sich dann unter Berücksichtigung der Verdünnungsfaktoren auf die Stammkonzentration der Sonde zurückrechnen.

Das Protokoll des Tropfentests, sowie alle beteiligten Reagenzien sind im Handbuch des *DIG RNA Labeling Kits* zu finden. Die immunologische Detektion wurde mit Hilfe des *DIG Nucleic Acid Detection Kits* (Roche) bewerkstelligt. Das dazugehörige Protokoll kann ebenfalls dem Handbuch des Kits entnommen werden. Die benötigten Puffer (washing buffer, maleic buffer, blocking buffer und detection buffer) stammen aus dem *DIG Wash and Block Buffer Set* von Roche.

Alle Protokolle können auch auf der Homepage des Herstellers eingesehen werden (<http://www.roche-applied-science.com>; Stand 31.03.2009).

3.4.2 Vorbereitung der Gefrierschnitte

Die Vorbereitung der Gefrierschnitte für die Doppel-In-Situ ähnelt der Vorgehensweise bei der „heißen“ In-Situ-Hybridisierung, unterscheidet sich aber in einigen Zwischenschritten:

1.	15 Minuten, 4 °C	4 % PFA/PBS,
2.	2 x 5 Minuten	1 x PBS/DEPC
3.	15 Minuten	1% H ₂ O ₂ in 100% MeOH
4.	8 Minuten	0,2 M HCl/DEPC
5.	2 x 5 Minuten	1 x PBS/DEPC
6.	10 Minuten	0,1 M Triethanolamin-HCl (pH 8,0)
7.	5 Minuten	1 x PBS/DEPC
8.	1 Minute	60 % Ethanol/DEPC
9.	1 Minute	75 % Ethanol/DEPC
10.	1 Minute	95 % Ethanol/DEPC
11.	1 Minute	100 % Ethanol
Trocknen der Schnitte bei Raumtemperatur für mindestens 1 Stunde		

3.4.3 Hybridisierung der Sonden

Das Prozedere wird so durchgeführt wie bei der Hybridisierung einer „heißen“ In-Situ-Sonde (siehe: [Hybridisierung der radioaktiv markierten Sonde](#)).

Beachtet werden muss aber, dass nun zwei Sonden, die radioaktiv markierte und die DIG-markierte, mit Hybridisierungsmix vermischt werden. Dabei wurde die „heiße“ Sonde wie gewohnt auf 35000 bis 70000 cpm/μl eingestellt, während die „kalte“ Sonde auf 1 μg/ml verdünnt wurde.

3.4.4 Waschen der Gefrierschnitte nach der Hybridisierung

Nach der Inkubation über Nacht bei 56 °C und der Entfernung der Deckgläschen wurden die Gefrierschnitte wie folgt weiterbehandelt:

1.	20 Minuten	42 °C	4 x SSC/0,05 % Tween 20/1 mM DTT
2.	20 Minuten	42 °C	2 x SSC/50 %/Formamid/0,05 % Tween 20/1 mM DTT
3.	20 Minuten	42 °C	1 x SSC/50 %/Formamid/0,05 % Tween 20/1 mM DTT
4.	30 Minuten	62 °C	0,1 x SSC/0,05 % Tween 20/1 mM DTT

5.	30 Minuten	37 °C	NTE/0,05 % Tween 20 mit 200 µl RNase A
6.	15 Minuten	30 °C	NTE/0,05 % Tween 20 mit 15 mM Iodoacetamid
7.	2 x 5 Minuten	30 °C	NTE/0,05 % Tween 20
8.	1 Stunde	30 °C	4 % BSA in TNT
9.	3 x 5 Minuten	30 °C	TNT
10.	30 Minuten	30 °C	NEN-TNB
11.	über Nacht	4 °C	anti-DIG(Fab)-POD (Roche) in TNB, 1:400

Anders als bei der DIG-Konzentrationsbestimmung wurde bei der Doppel-In-Situ selbst ein Peroxidase-gekoppelter DIG Antikörper verwendet (*Anti-Digoxigenin-POD Fab fragments*, Roche). Der Grund hierfür war, dass dadurch ein Amplifikationssystem zur Signalverstärkung eingesetzt werden konnte: unter Verwendung des TSA™-Biotin Systems (PerkinElmer) präzipitiert unter der enzymatischen Aktivität der Peroxidase biotinyliertes Tyramid in unmittelbarer Nähe des Erstantikörpers. Ein Streptavidin-Phosphatase-Konjugat (*Streptavidin-AP Konjugat*, Roche) kann nun wiederum an das Biotin binden und mit seiner Phosphatase Aktivität ein geeignetes Substrat präzipitieren.

3.4.5 Entwicklung des DIG Signals

Zu Beginn wurden die Gefrierschnitte nach folgendem Protokoll mit dem TSA™ Amplifikationssystem inkubiert:

3 x 5 Minuten	30 °C	TNT
15 Minuten, im Dunkeln	30 °C	TSA Mix, 1:50 verdünnt in Amplifikations-Lösung
3 x 5 Minuten	30 °C	Wasch-Puffer (Roche)
1 Stunde	30 °C	Streptavidin-AP Konjugat, 1:400 in 1 x Block-Puffer (Roche)
3 x 5 Minuten	30 °C	Wasch-Puffer

TSA und Amplifikations-Lösung stammen aus dem *TSA™-Biotin System Kit* von PerkinElmer. Das Tyramid-Biotin Reagenz wurde gemäß der Gebrauchsanleitung des Kits in 0,3 ml DMSO gelöst. Die verwendeten Puffer von Roche stammen aus dem *DIG Wash and Block Buffer Set*. Nachdem die Gefrierschnitte für 5 Minuten in 10 mM Tris-HCl (pH 8,2 - 8,5) transferiert worden waren, folgte im Anschluß die Visualisierung des Signals mit *Vector® Red* als enzymatischem Substrat. Die Signalentwicklungszeit betrug zwischen 10 und 30 Minuten und wurde durch 10-minütiges Waschen in 1 x PBS gestoppt. Das Protokoll für die Farbreaktion findet sich im Handbuchs des Kits (*Vector® Red Alkaline Phosphatase Substrate Kit I*, Vector Laboratories), sowie auf der Homepage des Herstellers (<http://vectorlabs.com>; Stand: 31.03.09). Zum Schluß wurden die Schnitte für 20 Minuten in 2,5 % Glutaraldehyd/PBS fixiert, 3-mal für 5 Minuten in 0,1 x SSC gewaschen und für 1 Stunde im Dunkeln getrocknet. Zur Visualisierung des radioaktiven Signals konnten die Objektträger anschließend gemäß dem Protokoll für die „heiße“ In-Situ-Hybridisierung mit Fotoemulsion behandelt und entwickelt werden (Siehe Kapitel 5.3.6).

3.5 In-Situ Quantifizierung

Um die relativen Expressionsunterschiede eines Gens in unterschiedlichen Zuständen oder verschiedenen Tieren zu erfassen, wurden die entwickelten Röntgenfilme der In-Situ-Hybridisierungen herangezogen. Die Filme wurden dabei eingescannt und ihre Farbinformation mit dem Bildbearbeitungsprogramm *Adobe Photoshop* auf Grauwerte reduziert. Mit dem Programm *ImageJ* konnten anschließend die Signalstärke der jeweils zu untersuchenden anatomischen Bereiche in Form von mittleren Grauwerten normalisiert und miteinander verglichen werden (Abbildung 13). Jeder Messwert ergab sich dabei aus der Subtraktion zwischen dem gemessenen Grauwert der Signalregion und dem Hintergrundsignal (Gehirnregion ohne spezifisches In-Situ Signal). Jede Messung wurde zweimal wiederholt und jede anatomische Struktur wenn möglich auf zwei verschiedenen Gehirnschnitten einer Serie analysiert. Bilaterale anatomische Strukturen (z.B. Amygdala, PVN) wurden gemeinsam in getrennten Messungen erfasst.

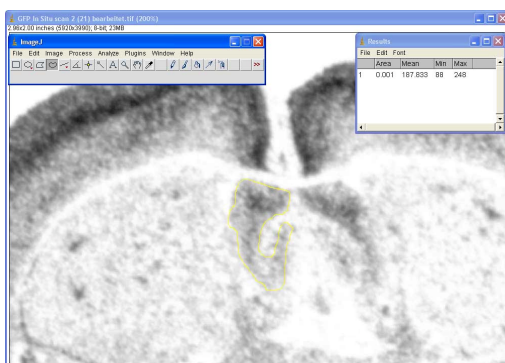


Abbildung 13: Screenshot der Arbeitsoberfläche des Programms ImageJ. Die zu analysierenden anatomischen Regionen wurden durch Umrahmung gekennzeichnet und anschließend deren mittlerer Grauwert berechnet (Kasten oben rechts).

3.6 Immunohistochemie

Innerhalb der vorliegenden Arbeit wurden zwei verschiedene Proteine mittels spezifischer Antikörper detektiert, bzw. lokalisiert. Zum einen wurde ein Cre-Rekombinase-spezifischer Antikörper (polyklonal) eingesetzt, um die Funktionalität der Cre-Kassette des CRH-Cre Transgens in HEK293-Zellen zu testen. Versuche die Cre-Rekombinase mit diesem Antikörper auch auf Gehirnschnitten zu detektieren blieben erfolglos. Zum anderen wurde mit Hilfe eines GFP Antikörpers auf murinen Gewebeschnitten (Hoden) die Anwesenheit des im CRH-Cre Transgen enthaltenen Venus-Reporter Proteins, einem GFP Derivat, überprüft. Entsprechend der Verschiedenartigkeit der Antikörper kamen unterschiedliche Protokolle zum Einsatz.

3.6.1 Anti-Cre Immunohistochemie

Zur Detektion von Cre in transfizierten HEK-Zellen wurden diese in einer 24-well Platte auf mit Lysin beschichteten Glasplättchen kultiviert und 24-48 Stunden nach der Transfektion für 10 Minuten mit 4 % PFA fixiert. Im Anschluss wurde nach folgendem Protokoll verfahren:

Zerstörung endogener Peroxidase Aktivität	15 Minuten	PBS/MetOH 1:2 + H ₂ O ₂ (30 %) 1:100
Waschen	3 x 10 Minuten	0,2 % PBST
Blocken	30 Minuten	5 % NSS in 0,2 % PBST
1. Antikörper: anti-Cre (rabbit)	über Nacht, 4 °C	1:1000 bis 1:3000 in 5 % NSS
Waschen	3 x 10 Minuten	0,2 % PBST
2. Antikörper: anti-rabbit, biotinyliert	30 Minuten	1:400 in 0,2 % PBST
Waschen	3 x 10 Minuten	0,2 % PBST
Amplifikation mit AB-Komplex	30 Minuten	1:100 in 0,2 % PBST
Waschen	3 x 10 Minuten	0,2 % PBST
Waschen	2 x 10 Minuten	1 x PBS
Färbereaktion mit DAB	2-10 Minuten	2 Tabletten in 5 ml H ₂ O
Stoppen	5 Minuten	1 x PBS

Anschließend wurden die Glasplättchen vorsichtig mit einer Pinzette aus den 24-well Platten entfernt, abgetupft und mit der beschichteten Seite nach unten auf mit Einbettmedium vorbereitete Objektträger gelegt.

Für die Signalamplifikation wurde das *Vectastain® Elite ABC Kit* (Linaris) verwendet. Dieses besteht aus einem Avidin-Biotin-Komplex, an welchem zusätzlich eine Peroxidase gekoppelt ist. Die Peroxidase wiederum wandelt 3,3'-Diaminobenzidin (DAB) in ein sichtbares, braunes Präzipitat um. Das DAB-Substrat wurde mit dem *Sigma Fast DAB Peroxidase Substrate Tablet Set* (Sigma) hergestellt und besteht aus zwei verschiedenen Reaktionstabletten, die in 5 ml sterilem Wasser gelöst werden. Die Lösung ist anschließend sofort einsetzbar.

3.6.2 Anti-GFP Immunohistochemie

Die GFP-Immunohistochemie wurde auf Gewebeschnitten von (mit 4 % PFA) perfundierten Tieren durchgeführt. Nach der Präparation des Gewebes wurde dieses für 1 Stunde in 4 % PFA bei 4 °C nachfixiert und anschließend über Nacht in 20 % Sucrose überführt. Dieser Schritt diente dazu die Struktur des Gewebes beim späteren Einfrieren zu bewahren. Das entsprechende Gewebe wurde hierzu nach der Präparation auf Alufolie platziert und auf Trockeneis eingefroren. Mit dem Kryostaten erfolgte anschließend das Herstellen von 20-40 µm dünnen Gefrierschnitten, die auf Objektträger aufgezogen wurden. Zur Durchführung der Immunohistochemie wurden die Ränder der Objektträger mit Fettstift umrahmt, so dass alle benötigten Lösungen in relativ geringen Mengen auf die Schnitte pipettiert werden konnten. Das Protokoll für die GFP Immunohistochemie sah wie folgt aus:

Waschen	3 x 10 Minuten	1 x PBS
Blocken	1-2 Stunden	10 % NGS/1 % PBST
1. Antikörper: anti GFP (chicken)	über Nacht, RT	1:2000 in 1 % NGS/0,3 % PBST (pH 7,4)
Waschen	3 x 10 Minuten	1 x PBS (pH 7,4)
2. Antikörper: anti chicken	2 Stunden, RT	1:300 in 1 % NGS/0,3 % PBST (pH 7,4)
Waschen	6 x 15 Minuten	1 x PBS (pH 7,4)

Die Gefrierschnitte wurden anschließend mit wässrigem Mounting-Medium eingebettet (*VECTASHIELD Mounting Medium*) und dauerhaft im Dunkeln bei 4 °C aufbewahrt. Da der Zweitantikörper mit einem roten Fluoreszenzfarbstoff konjugiert ist (Alexa 594, Invitrogen), konnte das Antikörper-vermittelte Proteinsignal im Fluoreszenzmikroskop deutlich von der grünen Eigenfluoreszenz des Venus-Proteins abgegrenzt werden.

3.7 LacZ-Färbung

Das von dem LacZ Gen codierte Enzym β -Galaktosidase kann das Substrat X-Gal in den tiefblauen Farbstoff 5,5'-Dibrom-4,4'-dichlor-indigo oxidieren und wird in der Molekularbiologie daher oft als Reportergen eingesetzt. In der vorliegenden Arbeit wurde das Expressionsmuster der Dlx5/6-Cre- und CRH-Cre-transgenen Mäuse unter anderem durch Verpaarung mit so genannten ROSA26-Reportermäusen eruiert. In den Nachkommen dieser Verpaarung führt die spezifische Aktivität der Cre-Rekombinase zu einer Transkription des LacZ Gens, so dass durch die Sichtbarmachung der β -Galaktosidase Aktivität mittels LacZ-Färbung indirekt das Expressionsmuster der Cre-Aktivität angezeigt wird. Daneben wurde die LacZ-Färbung auch auf HEK293 Zellen angewendet, welche im Rahmen der Funktionsanalyse für die Cre-Rekombinase mit einem β -Gal Reporterplasmid transfiziert wurden.

Vor der Anwendung der LacZ-Färbung muss das zu untersuchende Gewebe fixiert werden. HEK293 Zellen wurden hierzu für 10 Minuten mit LacZ-Fix behandelt. Bei Mäusen erfolgte eine 5-7 minütige intrakardiale Perfusion mit LacZ-Fix, gefolgt von einem einminütigen Nachspülen mit PBS. Das Gehirn wurde nach der Präparation für eine Stunde in LacZ-Fix nachfixiert und dann über Nacht in 20 % Sucrose bei 4 °C transferiert. Anschließend erfolgte das Anfertigen von ca. 20 bis 40 μ m dünnen Gefrierschnitten auf denen schließlich die LacZ-Färbelösungen aufgetragen werden konnten. Die restlichen Körperorgane wurden nach der Entnahme ebenfalls nachfixiert konnten aber, wie die HEK293 Zellen, anschließend sofort mit der LacZ-Färbelösung inkubiert werden. Die enzymatische Umsetzung des X-Gal Substrats fand über Nacht im Dunkeln bei 37°C statt. Eine Intensivierung der Blaufärbung konnte durch abermaliges Nachfixieren in LacZ-Fix über Nacht bei 4 °C erreicht werden. Abschließend wurden die Objektträger 5 Minuten in Xylol getaucht und mit DPX eingebettet. Organe wurden zu längerfristigen Aufbewahrung in 0,5 % PFA/PBS transferiert.

3.8 Arbeiten mit Säuger-Zelllinien

3.8.1 Kultur von Human-Embryo-Kidney (HEK293) Zellen

HEK293 Zellen wurden in *Dulbecco's modified Eagle-Medium* (DMEM), welches mit 2 mM L-Glutamin und 10 % fötalem Kälberserum supplementiert war, auf 10 cm-Zellkulturschalen in einem Brutschrank bei 37 °C sowie 5 % CO₂-Gehalt kultiviert. Die Routinearbeiten der Zellkultur, wie z.B. das Auftauen, Subkultivieren und Zählen der Zellen wurden gemäß den Standards durchgeführt, wie sie bei Spector et al. (Spector, 1998) beschrieben werden.

3.8.2 Transfektion von HEK293 Zellen

HEK293 Zellen wurden eingesetzt um die hergestellten transgenen Konstrukte in Säugerzellen auf deren Expressions- und Spleißingverhalten zu testen. Hierzu wurden die entsprechenden Konstrukte in den Expressionsvektor pcDNA 3.1 (Invitrogen) kloniert und wie im folgenden beschrieben in HEK293 Zellen transfiziert.

3.8.2.1 Vorbehandlung der Deckgläschen

Für die Transfektionen wurden die HEK293 Zellen in 24-well-Platten kultiviert. Damit die Zellen für die spätere mikroskopische Untersuchung auf Objektträger übertragen und fixiert werden konnten, erfolgte die Kultivierung auf Glasplättchen mit 12 mm Durchmesser, welche in die Vertiefungen der 24-well Platten gelegt wurden. Zum besseren Anheften der HEK293 Zellen an die Glasplättchen, wurden diese folgendermaßen mit Poly-D-Lysin (PDL) behandelt:

1. Waschen	5 Minuten	CHCl ₃ (Chloroform)
2. Waschen	2 x 5 Minuten	100 % EtOH
3. Trocknen	über Nacht	Trockenschrank (70 °C)
4. Aufteilen der Glasplättchen auf 24-well Platte		
5. Waschen	10-30 Sekunden	H ₂ O
6. Beschichten	über Nacht, 37 °C	PDL, 1:20 in H ₂ O
7. Waschen	10-30 Sekunden	H ₂ O
8. Trocknen	ad libitum	Inkubator (37 °C)

3.8.2.2 Transfektion von HEK293-Zellen mit *Lipofectamine*TM 2000

24 Stunden vor der Transfektion wurden die HEK293-Zellen einer dicht bewachsenen 10 cm-Platte trypsinisiert und auf die 24-well Platten verteilt. Um eine für die Transfektion optimale Konfluenz von ca. 70 bis 80 % zu erreichen, wurden auf einer 24-well Platte ca. 6×10^4 Zellen/well ausgebracht, während auf die andere Platte ca. 10^5 Zellen/well ausgesät wurden. Am nächsten Tag wurden entsprechend der Herstellerangaben pro Transfektion, bzw. pro well 800 ng Plamid-DNA in 50 μ l *Opti-MEM* Medium (Gibco) pipettiert und für 15 Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen. Parallel dazu wurden pro Transfektion 1 μ l *Lipofectamine*TM 2000 (Invitrogen) Reagenz, ein kationischen Lipid, mit 49 μ l *Opti-MEM* versetzt und für 10 Minuten bei Raumtemperatur belassen. Schließlich wurden beide Ansätze zu einem Volumen von 100 μ l pro Transfektion vereint und nach einer Inkubationszeit von 15 Minuten bei Raumtemperatur vorsichtig auf die HEK293-Zellen pipettiert. Die Transfektionsdauer betrug je nach Experiment zwischen 24 und 48 Stunden.

3.8.3 Kultur von embryonalen Stammzellen

Neben der Pronucleus-Injektion war eine Strategie zur Generierung von transgenen CRH-Cre Mäusen die Elektroporation des Cre-Konstrukts in pluripotente embryonale Stammzellen (ES-Zellen). Dieses Verfahren bietet gegenüber der Pronucleus-Injektion den Vorteil, dass während der Kulturphase positive Klone, d.h. Klone in deren Genom sich das Transgen inseriert hat, mittels eines auf dem Konstrukt befindlichen Neomycin-Resistenzgens selektioniert werden können. Zudem kann dadurch bereits *in vitro* eine Analyse der Integration (bezüglich Integrationsort oder Vollständigkeit der Integration) vorgenommen werden.

Die Arbeiten in der ES-Zellkultur wurden gemäß den Standards ausgeführt, wie sie für Zellkulturen im Allgemeinen bei Spector et al. (Spector, 1998), als auch für ES-Zell Kulturen im Speziellen bei Nagy et al. (Nagy, 2003) beschrieben und empfohlen werden.

3.8.3.1 Kultivierung von Feeder-Zellen

Da die ES-Zellen während der Kultivierung nicht differenzieren dürfen, müssen sie zusammen mit so genannten Feeder-Zellen herangezogen werden. Dabei handelt es sich um embryonale Maus-Fibroblasten (EMFI), welche zum einen den undifferenzierten Zustand der ES-Zellen aufrecht erhalten, diese zum anderen aber auch mit Wachstumsfaktoren versorgen. Die Feeder-Zellen wurden auf 15 cm Zellkulturschalen in speziellem Feeder-Medium bei 37 °C und 5 % CO₂ gehalten und nach ein- bis zweimaligem Passagieren mit 150 μ l Mitomycin C (MMC, 1 mg/ml PBS) pro Platte mitotisch inaktiviert.

Anschließend wurden die inaktivierten Zellen (MMC Feeder-Zellen) mit Trypsin vereinzelt und zu einer Konzentration von 2×10^5 Zellen verdünnt. Aus diesem Ansatz wurden die EMFI Zellen zu einer Endkonzentration von ca. 1×10^4 Zellen/cm² auf die benötigten Zellkulturschalen, bzw. Platten ausplattiert. Den Zellen wurde über Nacht die Möglichkeit zur Adhäsion gegeben, bevor sie mit ES-Zellen in ES-Zell Medium kokultiviert wurden.

3.8.3.2 Elektroporation und Selektion der ES-Zellen

Ein Kryoröhrchen mit TBV2 ES-Zellen (ca. 5×10^6 Zellen/ml) wurde aufgetaut und nach der Resuspension des Pellets auf zwei 10 cm Zellkulturschalen mit MMC Feeder-Zellen ausgebracht. Die TBV2-Zellen wurden in selektionsfreiem ES-Zellmedium bei 37 °C und 5 % CO₂ expandiert und im Verhältnis 1:4 auf neue 10 cm MMC Feederplatten subkultiviert.

Am Tag der Elektroporation (ca. 36 Stunden nach der letzten Passagierung) wurden die ES-Zellen mit Trypsin suspendiert und die Pellets auf eine Zellzahl von ca. 1×10^7 Zellen/ml verdünnt. 20 µg des linearisierten Transgen-Konstruktes wurden nun in eine vorgekühlte Elektroporationsküvette vorgelegt und dann mit 800 µl ES-Zellsuspension vermischt. Die Elektroporation fand in einem *Gene Pulser* von Bio Rad statt; die Pulsparameter betragen 0,24 kV und 500 µF. Nach der Elektroporation wurden die Küvetten für ca. 10 Minuten auf Eis gestellt und die Zellsuspension einer Küvette anschließend in 2 ml ES-Zellmedium überführt. Jeweils 1 ml daraus wurde auf eine 10 cm MMC-Feederplatte passagiert, auf welche zuvor bereits 9 ml ES-Zellmedium vorgelegt worden waren. Zwei Tage nach der Elektroporation wurde das ES-Zellmedium gegen Selektionsmedium ausgetauscht. Das Selektionsmedium besteht aus „normalem“ ES-Zellmedium, dem zusätzlich das Antibiotikum Geneticin (G418) in einer Endkonzentration von 200 µg/ml beigegeben wurde. Neben den G418-resistenten EMFI-Zellen können nur diejenigen ES-Zellen im Selektionsmedium überleben, welche das Transgen und damit das auf dem Transgen befindliche Neomycin-Resistenz Gen (= Selektionsmarker) in ihr Genom inseriert haben. Nachdem die ES-Zellen ca. eine Woche lang in Selektionsmedium kultiviert wurden, konnten die restlich verbliebenen Transgen-positiven Klone unter einem Binokular mit Hilfe einer Pipette vorsichtig abgeschabt, aufgesaugt und in die Vertiefungen einer konischen 96-well Platte transferiert werden. Dort wurden die Zellen anschließend trypsiniert und auf eine vorbereitete MMC Feeder Platte im 96-well Format übertragen und weiter in Selektionsmedium kultiviert.

3.8.3.3 Splitten und Einfrieren der ES-Zell-Klone

Vor dem Einfrieren wurden die auf den 96-well Platten befindlichen ES-Zell-Klone zweimal passagiert. Da die einzelnen Klone nach dem Picken in unterschiedlicher Zellzahl vorlagen und

auch die Wachstumskurve von Klon zu Klon etwas variabel ist, mussten die unterschiedlichen Konfluenzen durch individuelles Passagieren synchronisiert werden. Ansonsten bestünde die Gefahr, dass einige Klone bereits anfangen sich zu differenzieren, während andere noch nicht konfluent genug für das Splitten auf eine neue Platte sind. Je nach Konfluenz wurden deshalb die ES-Zell-Klone im Verhältnis 1:2, 1:3 oder 1:4 auf eine neue 96-well Platte passagiert. Nach dem gleichen Schema wurde auch das zweite Splitten durchgeführt. Um die ES-Zell-Klone mit Hilfe eines Southern Blots auf positive Integrationsereignisse hin überprüfen zu können, wurden die TBV2-Zellen zur Hälfte auf Gelatine-Platten und zur Hälfte auf MMC-Feederplatten gesplittet. Gelatineplatten bieten den Vorteil, dass darauf nur die ES-Zellen nicht aber die mitotisch inaktivierten MMC-Feeder-Zellen expandieren können, so dass deren Anteil an der nachfolgend präparierten DNA vernachlässigbar ist. Während die Gelatineplatten für die anschließende DNA Präparation zur maximalen Konfluenz weiterkultiviert wurden, wurden die auf den MMC-Feederplatten befindlichen ES-Zell-Klone mit Trypsin vereinzelt und in 70 µl Selektionsmedium, sowie 100 µl Einfriermedium pro 96-er well auf Eis resuspendiert. Die Platten wurden dann mit Parafilm verschlossen, in mehrere Lagen Papiertücher eingewickelt und in einer Kryobox bei -80 °C eingefroren. Zum Einfrieren der Gelatineplatten wurden diese zweimal mit PBS gewaschen und anschließend ohne Einfriermedium versiegelt und bei -80 °C eingefroren.

3.8.3.4 Analyse der ES-Zell-Klone

Die auf den Gelatineplatten dicht gewachsenen TBV2-Klone wurden nach Absaugen des Mediums über Nacht mit Lysis Puffer bei 56 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Platten für 2 Minuten bei 2500 rpm abzentrifugiert und die DNA mit Präzipitationslösung (150 µl 5 M NaCl in 10 ml eiskaltem 100 % Ethanol) gefällt, gefolgt von einem 30-minütigen Schwenken der Platte bei Raumtemperatur. Abermals wurde zentrifugiert und die Platten dann dreimal mit 70 % Ethanol gewaschen. Nach dem Trocknen konnte dann direkt der Restriktionsverdau in die einzelnen Vertiefungen der Platten aufgetragen werden. Die verdaute DNA wurde schließlich auf ein 0,8 %-iges Gel aufgetragen und per Southern Blot und radioaktiver DNA Hybridierung auf die Anwesenheit des Transgens hin überprüft.

3.8.3.5 Expansion und Injektion positiver Klone

Nach Analyse der radioaktiven Hybridisierung wurden 5-6 Klone für die Blastocysten-Injektion ausgewählt. Es wurden dabei vor allem die Klone bevorzugt, bei denen neben der Anwesenheit des Transgens auch eine vollständige Integration mit intaktem 5'- und 3'-Ende vorhanden war. Die ausgewählten Klone wurde sodann in ihren 96-well Platten aufgetaut und sukzessive über 48-well-, 12-well- und 6-well Platten auf 6 cm und schließlich 10 cm Platten expandiert. Am

Injektionstag wurden die ES-Zellen einer 10 cm Platte trypsiniert, das Pellet nach der Zentrifugation in 1,5 ml ES-Zellmedium resuspendiert und bis zur Injektion auf Eis gestellt. Die Blastocysten-Injektion der ES-Zell-Klone wurde von Mitarbeitern der Abteilung Entwicklungsgenetik (IDG) des Helmholtz Zentrums München (Neuherberg) durchgeführt.

3.9 Erzeugung, Zucht und Analyse der transgenen Mauslinien

3.9.1 Pronucleus-Injektion

Bei der Pronucleus-Injektion wird die linearisierte Konstrukt-DNA direkt in eine befruchtete Eizelle injiziert. Hierzu nutzt man den Umstand, dass in befruchteten Eizellen, die sich noch im Einzellstadium befinden, sowohl der männliche als auch der weibliche Vorkern (Pronucleus) sichtbar werden. Da der männliche Vorkern meist etwas größer ist, wird die DNA mit Hilfe einer Haltekapillare und eines Mikromanipulators bevorzugt in diesen injiziert (Schenkel, 1995).

Vorteil dieser Methode ist, dass das aus der Eizelle hervorgehende Founder-Tier das Transgen im besten Falle bereits in allen Körperzellen trägt und somit auch über die Keimbahn weitergeben kann. Nachteil ist, dass nicht alle aus der Pronucleus-Injektion stammenden Tiere, das Transgen tatsächlich in das Genom inserieren und die Tiere deshalb vor weiteren Verpaarungen mittels PCR und/oder radioaktiver DNA Hybridisierung auf Anwesenheit des Transgens hin überprüft werden müssen.

Innerhalb der vorliegenden Arbeit wurden sowohl das CRH-Cre als auch das induzierbare CRH-Cre Konstrukt (CRH-CreERT2) in Pronuclei injiziert. Die als Fosmid-Insertion vorliegenden Konstrukte wurden dafür als Maxipräp isoliert, mittels der flankierenden Not-I Restriktionsschnittstellen vom Fosmid-Rückgrat befreit, bzw. linearisiert und schließlich per Elektroelution und Ethanolpräzipitation aufgereinigt. Mit steril filtriertem Injektionspuffer wurde die DNA Konzentration auf 2 ng/μl und 5 ng/μl eingestellt und konnte so für die Injektion eingesetzt werden.

Alle Pronucleus-Injektionen wurden von Mitarbeitern des Instituts für Entwicklungsgenetik (IDG) des Helmholtz Zentrums München (Neuherberg) durchgeführt.

3.9.2 Blastocysten-Injektion

Die Blastocyste stellt bereits ein fortgeschrittenes Entwicklungsstadium dar und besteht aus einer inneren und äußeren Zellmasse sowie einem flüssigkeitsgefüllten Hohlraum, dem Blastocoel. Während der Blastocysteninjektion werden mit Hilfe einer Haltepipette und eines Mikromanipu-

lators ca. 7-10 transgene ES-Zellen in das Blastocoel gespritzt und bilden zusammen mit den Zellen der Blastocyste das zelluläre Fundament für die weitere Entwicklung des Embryos. Die aus der Injektion hervorgehenden Tiere weisen dementsprechend einen Chimärismus auf, d.h. ein Teil ihrer Körperzellen entspringt aus den Blastocystenzellen und ein Teil stammt von den transgenen ES-Zellen ab. Durch Verwendung eines Fellfarbenmarkers im Genom der TBV2-ES-Zellen läßt sich der Chimärismus-Grad anhand der Fellfarbe des Tieres abschätzen. Nichtsdestotrotz läßt sich daraus nicht ableiten, ob die Keimzellen der Chimäre ebenfalls von ES-Zellen abstammen und damit das Transgen in die nächste Generation weitergeben können. Dies läßt sich erst nach Genotypisierung der darauffolgenden F1 Generation sicher bestimmen.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde sowohl das CRH-Cre als auch das induzierbare CRH-Cre (CRH-CreERT2) Konstrukt in ES-Zellen elektroporiert und Transgen-positive ES-zellen anschließend in Blastocysten injiziert. Nach Generierung der Chimären wurden diese mit Flp-Deleter Mäusen verpaart, um die im Konstrukt enthaltene Selektionskassette (die zugleich auch die Transkription von Cre verhindert) zu entfernen und anhand der Nachkommen die Keimbahntransmission zu überprüfen.

3.9.3 Mauslinien

Folgende Mauslinien, bzw. Kreuzungen wurden im Rahmen der Dissertation erzeugt:

Verpaarung	Dlx5/6-Cre	X	CRH-COE
Expression	GABA-spezifisch (Interneuronen)		ROSA26, ubiquitär
Effekt	Expression von Cre		Cre-abhängige Expression von transgenem CRH
Zweck	spezifische Überexpression von CRH in GABA-ergen Interneuronen		

Verpaarung	Dlx5/6-Cre	X	ROSA26-Reporter
Expression	GABA-spezifisch (Interneuronen)		ROSA26, ubiquitär
Effekt	Expression von Cre		Cre-abhängige Expression von β -Galaktosidase
Zweck	GABA-spezifische Expression von β -Gal > Expressionsanalyse		

Verpaarung	CRH-Cre	X	hACTB-Flpe
Expression	CRH-spezifisch		Aktin β Promotor, ubiquitär
Effekt	Expression von Cre		Expression von Flp
Zweck	Deletion der Stopkassette/Selektionskassette		

Verpaarung	CRH-Cre	X	ROSA26-Reporter
Expression	CRH-spezifisch		ROSA26, ubiquitär
Effekt	Expression von Cre		Cre-abhängige Expression von β -Galaktosidase
Zweck	CRH spezifische Expression von β -Gal > Expressionsanalyse		

Verpaarung	CRH-Cre	X	flogCR1
Expression	CRH-spezifisch		CRH-R1 spezifisch
Effekt	Expression von Cre		Cre-abhängiger KO von CRH-R1 und GFP Reporter
Zweck	Kontrolle der CRH-Spezifität des CRH-Cre Transgens		

Verpaarung	CRH-Cre	X	CRH-COE
Expression	CRH-spezifisch		ROSA26, ubiquitär
Effekt	Expression von Cre		Cre-abhängige Expression von transgenem CRH
Zweck	CRH spezifische Überexpression von CRH		

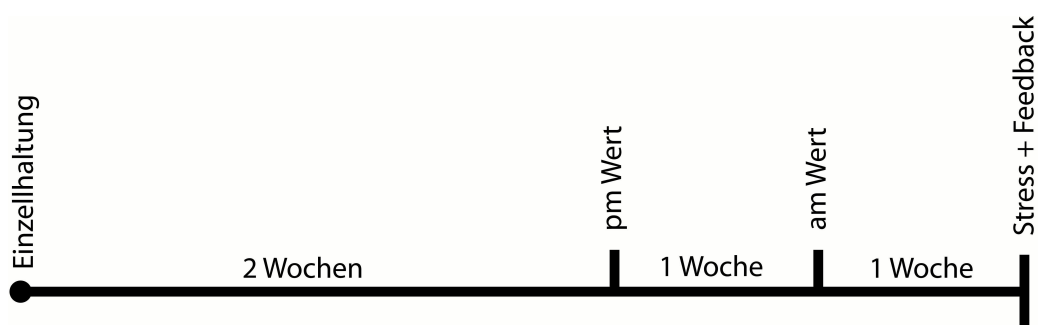
3.9.4 Anfertigen von Gefrierschnitten

Die zu untersuchenden Tiere wurden mit einer Überdosis Isofluran getötet und anschließend sofort dekapitiert. Nach der Entnahme des Gehirns (oder auch anderer Körperorgane) wurde das entsprechende Gewebe auf einer Alufolie liegend auf Trockeneis eingefroren. Das Organ konnte anschließend längerfristig bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert werden oder anschließend sofort zu Gefrierschnitten weiterverarbeitet werden. Hierzu wurde es mit Einbettmedium (*Tissue Tek*, Polysciences) auf

einen Objekthalter fixiert und in den Kryostaten (Microtome HM 560, Microm) eingespannt. Bei einer Temperatur zwischen -16 und -20 °C wurden Schnitte mit einer Dicke von 20 µm angefertigt, auf *SuperFrost/plus* (Fisher Scientific) Objektträger aufgezogen und auf einer Wärmeplatte bei 37 °C kurz angetrocknet. Die Lagerung der Schnitte erfolgte in Objektträgerkästen bei -20 °C.

3.9.5 Blutentnahme und Corticosteron-Messung

Zwei Wochen vor der ersten Messung wurden je 12 Versuchstiere und 12 Kontrolltiere (zwischen 12 und 16 Wochen alt) aus der Gruppenhaltung in die Einzelhaltung überführt und dort unter möglichst störungsfreien Bedingungen gehalten. Zur Blutentnahme wurden die Tiere kurz mit Isofluran betäubt, mit einem Kapillarröhrchen (Ø 0,9 mm) retrobulbär punktiert und darüber ca. 100-300 µl Vollblut abgenommen. Die Zeitspanne zwischen erstem Körperkontakt zu dem Tier und der Blutabnahme dauerte dabei nicht länger als eine Minute. Für die Erhebung der basalen Corticosteron-Werte erfolgte die Blutentnahme zwischen 9:00 und 10:00 (basaler Vormittagswert), bzw. zwischen 15:30 und 16:30 (basaler Nachmittagswert). Für die Erhebung der Corticosteron-Werte unter Stress-Bedingungen wurden die Tiere vormittags (zwischen 9:00 und 11:00) für 10 Minuten in einem 50 ml Falcon-Röhrchen immobilisiert und ihnen anschließend Blut entnommen. Feedback-Proben wurden 60 oder 90 Minuten nach Beendigung der Immobilisierung durch Dekapitieren der Tiere erhalten. Zwischen zwei aufeinanderfolgenden Messungen wurde den Tieren eine Woche Zeit zur Erholung gegeben. Eine typische Messreihe sah demnach wie folgt aus:



Das entnommene Blut wurde in EDTA-beschichteten, eisgekühlten Eppendorf-Gefäßen gesammelt und für 15 Minuten bei 10000 g und 4 °C zentrifugiert. Das Blutplasma wurde anschließend als Überstand in neue Reaktionsgefäße überführt und bis zur Messung bei -80 °C aufbewahrt. Die Bestimmung der Corticosteron-Konzentrationen wurde mit einem kommerziell erhältlichen RIA Kit durchgeführt (MP Biomedicals).

3.9.6 Verhaltensphänotypisierung

Für alle Verhaltensphänotypisierungen wurden jeweils 12 männliche Tiere pro Genotyp in einem Alter von 3-5 Monaten getestet. Die Tiere wurden eine Woche vor Beginn der Testreihe in Einzelhaltung überführt und dort möglichst ungestört gehalten.

Alle Experimente wurden während der Licht-Phase (09:00-13:00; Beleuchtungsdauer: 06:00-18:00) vorgenommen. Die Testreihen wurden in folgender Reihenfolge durchgeführt:

Open-Field > Elevated-Plus-Maze > Dark-Light-Box > Forced-Swim Test

3.9.6.1 Open-Field Test

Der Open-Field Test (OF) nach Walsh and Cummins (Walsh and Cummins, 1976) wurde einerseits zur Bestimmung des Lokomotionsverhaltens und andererseits als zusätzliche Möglichkeit zur Erfassung von Angst-ähnlichem Verhalten eingesetzt. Beim OF handelt es sich um eine kreisrunde Arena mit einem Durchmesser von 60 cm, welche von einer 40 cm hohen Wand umgeben ist. Für den Lokomotionstest wurde die Versuchfläche mit 15 lux relativ schwach bestrahlt. Jedes Tier wurde für 5 Minuten im OF getestet. Dabei wurde die Gesamtlaufstrecke, die Anzahl der so genannten „rearings“, sowie die Zeitspanne, die von dem Tier im aversiveren inneren Bereich (\varnothing 30 cm) und geschützteren Wandbereich der Arena zugebracht wurde aufgezeichnet. Um den OF auch zur Detektion von Angst-ähnlichem Verhalten zu benutzen, wurde die Beleuchtungsstärke auf 150 lux erhöht, so dass durch den nun aversiveren Innenbereich des OF ein verstärkter „approach-avoidance“-Konflikt erzeugt wurde. Nach jedem Versuch wurde das OF sorgsam desinfiziert und abgetrocknet.

3.9.6.2 Elevated-Plus-Maze Test

Der Elevated-Plus-Maze Test (EPM) wurde zur Erfassung von Angst-ähnlichem Verhalten bei Mäusen durchgeführt und beruht auf dem so genannten „approach-avoidance“-Konflikt (Pellow et al., 1985; Lister, 1987; Hogg, 1996). Dieser besteht einerseits aus dem Drang der Maus unbekannte Umgebungen zu explorieren und andererseits aus dem entgegengesetzten instinktivem Vermeiden von ungeschützten und stark illuminierten Arealen.

Der Aufbau des EPM bestand aus zwei sich X-förmig überkreuzenden Plastik-Plattformen in 40 cm Höhe, die zusammen vier gegenüberliegende Arme bildeten. Jeweils zwei der sich gegenüberliegenden Arme ($30 \times 5 \times 0,5$ cm) waren offen, d.h. wiesen keinerlei Begrenzungen an ihren Rändern auf und waren hell illuminiert (ca. 300 lux). Die zwei anderen Arme waren geschlossen bzw. an ihren Rändern mit Seitenwänden versehen ($30 \times 5 \times 15$ cm) und schwach beleuchtet (ca.

50 lux). Die Plattform am Kreuzungspunkt der vier Arme hatte eine Abmessung von 5×5 cm und wurde mit ca. 300 lux ausgeleuchtet. Jedes Tier wurde für 5 Minuten im EPM getestet.

Dazu wurde die Maus zu Beginn eines jeden Versuchs so auf die zentrale Plattform gesetzt, dass sie einem der beiden geschlossenen Arme zugewandt war. Anschließend wurde die Anzahl der Eintritte in einen geschlossenen, bzw. offenen Arm gezählt, sowie die darin verbrachte Zeit.

Ein Eintritt in einen Arm wurde dann als vollständig gewertet, wenn sich die vorderen Extremitäten und die Schultern des Tieres innerhalb der definierten Armfläche befanden. Um eine olfaktorische Beeinflussung der nachfolgend getesteten Tiere zu vermeiden, wurde nach jedem Versuch das EPM sorgsam desinfiziert und abgetrocknet.

3.9.6.3 Dark-Light-Box Test

Bei der Dark-Light-Box (DaLi) handelt es sich ebenfalls um einen Verhaltenstest zur Evaluierung von Angst-ähnlichem Verhalten bei Nagetieren (Bourin and Hascoet, 2003). Wie beim EPM und OF beruht er auf der natürlichen Aversion der Maus/Ratte sich in hell erleuchteten Arealen aufzuhalten einerseits und dem spontanen Explorationsverhalten in unbekannter Umgebung andererseits (Crawley and Goodwin, 1980).

Die DaLi bestand aus einer quaderförmigen Box, welche in ein helles Kompartiment ($30 \times 20 \times 25$ cm, 700 lux) und ein dunkles Kompartiment ($15 \times 20 \times 25$ cm, 10 lux) eingeteilt war. Beide Kompartimente waren durch einen 4 cm langen Tunnel (70 lux) miteinander verbunden. Nach Platzierung des Maus innerhalb des dunklen Kompartiments, wurde für 5 Minuten die Zeit gemessen, die das Tier in jedem der beiden Kompartimente zubrachte, sowie die Anzahl der jeweiligen Ein-, bzw. Austritte.

3.9.6.4 Forced-Swim Test

Der Forced-Swim Test (FST) ist eine klassische Versuchsanordnung für den Test von Antidepressiva in Ratten und Mäusen und zur Eruierung von Verhaltensaspekten, die beim Menschen mit Depression in Zusammenhang gebracht werden (Porsolt et al., 1977a; Porsolt et al., 1977b; Cryan and Holmes, 2005; Jacobson and Cryan, 2007) und wird deshalb allgemein als Modell zur Erhebung von Depressions-ähnlichem Verhalten eingesetzt. Der Versuchsaufbau sieht aus wie folgt: Ein glattwandiger Glaszylinder (\varnothing 12 cm, 24 cm hoch) wurde zu $2/3$ mit 23 °C warmen Wasser gefüllt. Die zu testende Maus wurde dann für 6 Minuten in den Glaszylinder gesetzt und die Verhaltensreaktionen aufgezeichnet. Es wurde dabei unterschieden zwischen „swimming“ (schwimmen), „floating“ (sich treiben lassen) und „struggling“ (aktiver Versuch der aversiven Situation zu entkommen). Die Latenzzeit und Zeitdauer dieser Verhaltensweisen wurde aufgezeichnet und ausgewertet. Dabei wird erhöhtes „struggling“ mit einer aktiven Bewältigungsstra-

tegie, bzw. anti-depressionsähnlichem Verhalten in Zusammenhang gebracht (Cryan and Holmes, 2005).

3.9.7 Statistik

Alle statistischen Auswertungen wurden mit Hilfe des Programms *GraphPad Prism4* (GraphPad Software) durchgeführt. Für die statistische Absicherung der ermittelten Corticosteron-Werte, sowie der In-Situ-Quantifizierungen wurde dabei ein ungepaarter Student t-Test angewendet. Die Ergebnisse der Verhaltensphänotypisierung wurden mit dem Mann-Whitney-U Test auf Signifikanz überprüft. Unterschiede galten dabei als signifikant, wenn $p < 0,05$. Alle Daten wurden als Mittelwerte \pm Standardabweichung dargestellt.

4 Ergebnisse

4.1 Generierung und Analyse der Linie CRH-COE_{Dlx}

4.1.1 Generierung konditional CRH überexprimierender Mäuse

Um eine Mauslinie zu generieren, die CRH in GABA-ergen Interneuronen exprimiert, wurden Weibchen der Linie Dlx5/6-Cre (Monory et al., 2006) mit homozygoten CRH-COE Männchen verpaart. Die aus diesen Verpaarungen hervorgegangenen Nachkommen wurden mittels PCR auf Anwesenheit der Cre-Rekombinase (Primer: *Cre-F/Cre-R*; Produkt = 574 bp) sowie auf Modifikation des ROSA26 (R26) Locus hin genotypisiert (Primer: *ROSA-1/ROSA-5/ROSA-6/ROSA-7*). Der Wildtyplocus wurde dabei mit den Primern *ROSA-1* und *ROSA-6* detektiert (Produkt = 398 bp). Der (im Schwanzgewebe) inaktiv modifizierte R26 Locus (mit Stopkassette) wurde vom Primerpaar *ROSA-1/ROSA-7* erkannt (Produkt = 646 bp). Eine vorzeitige, nicht erwünschte Aktivierung der CRH-Expressionseinheit ließe sich durch eine Deletion der Stopkassette im für die Genotypisierung verwendeten Schwanzgewebe nachweisen. Zu diesem Zweck wurde das Primerpaar *ROSA-1/ROSA-5* (Produkt = 505 bp) verwendet. Um zu geringe DNA-Konzentrationen als Ursache möglicher Negativergebnisse ausschließen zu können, wurden dem Cre-PCR Ansatz standardmäßig Primer für das Gen Cathepsin Q beigefügt (Primer: *CTSQ-up/CTSQ-down*; Produkt = 1098 bp).

Cre-positive, heterozygote CRH-COE_{Dlx} Tiere (R26^{+Crh}Dlx5/6-Cre, fortan bezeichnet als CRH-COE^{het}) wurden anschließend mit Cre-negativen, CRH-COE heterozygoten Tieren verpaart um homozygote, CRH-überexprimierende CRH-COE_{Dlx}-Nachkommen (R26^{Crh/Crh}Dlx5/6-Cre, fortan bezeichnet als CRH-COE^{hom}), sowie homozygote, Cre-negative Kontrolltiere (R26^{Crh/Crh}, fortan bezeichnet als CRH-COE^{con}) zu erhalten.

4.1.2 Expressionsanalyse

4.1.2.1 Analyse der CRH-Überexpression mittels In-Situ-Hybridisierung

CRH-COE^{hom} Tiere wurden verwendet, um die Expression von CRH mRNA und Cre mRNA mittels In-Situ-Hybridisierung zu analysieren. Die Spezifität des Dlx5/6 Promotors der die Expression der Transkriptionsfaktoren *Distalless-Homeobox5* und *Distalless-Homeobox6* steuert, beschränkt sich bekanntermaßen auf GABA-erge Interneuronen und wurde bereits bei Monory et al. (Monory et al., 2006) und Zerucha et al. (Zerucha et al., 2000) beschrieben. Somit wurde be-

züglich der CRH-Überexpression eine Übereinstimmung zwischen dem CRH-Expressionsmuster und dem bekanntem Dlx5/6 Expressionsmuster erwartet.

Bezüglich des CRH-Expressionmusters zeigten CRH-COE^{con} Tiere die stärksten Signalintensitäten im Bereich des Cortex, des Hippocampus, des PVN, der zentralen Amygdala, im Bettkern der Stria Terminalis und im Bulbus olfactorius (Abbildung 14A und Abbildung 15A, C) Bei all diesen Strukturen handelt es sich um bekanntermaßen CRH-exprimierende Gehirnregionen (Swanson et al., 1983). Im Vergleich dazu wiesen CRH-COE^{hom} Tiere erhöhte CRH mRNA Signale vor allem im Bereich des limbischen Systems, der Basalganglien (wie dem Striatum und dem Globus pallidus), Teilen des Hypothalamus, dem Septum, dem Nucleus reticularis thalami und dem Bettkern der Stria terminalis auf (Abbildung 14B und Abbildung 15A, D). CRH-Überexpression konnte aber auch im Cortex, im Hippocampus und im Bulbus olfactorius festgestellt werden. Erwartungsgemäß wurde keinerlei Cre mRNA in den Cre-negativen Kontrolltieren detektiert (Abbildung 15B, E). In den CRH-COE^{hom} Tieren konnte Cre mRNA in den gleichen anatomischen Strukturen gefunden werden, in denen auch CRH mRNA lokalisiert wurde (Abbildung 14C und Abbildung 15B, F). Kleinere Unterschiede in den Signalmustern sind dabei einerseits durch die konsekutive Schnittfolge bedingt, sowie andererseits durch die nicht exakt identische Ausrichtung der Gehirne während des Schneidens. Zudem spiegelt die Cre-Expression die Dlx5/6 Aktivität im adulten Gehirn wieder, während das Muster der CRH-Expression ein Abbild der kumulativen (weil irreversiblen) Aktivierung des R26 Locus ist.

Zusammenfassend bleibt festzuhalten, dass das Muster der CRH-Überexpression in CRH-COE_{Dlx} Mäusen wie erwartet dem Verteilungsmuster GABA-erger Interneuronen des Vorderhirns entspricht.

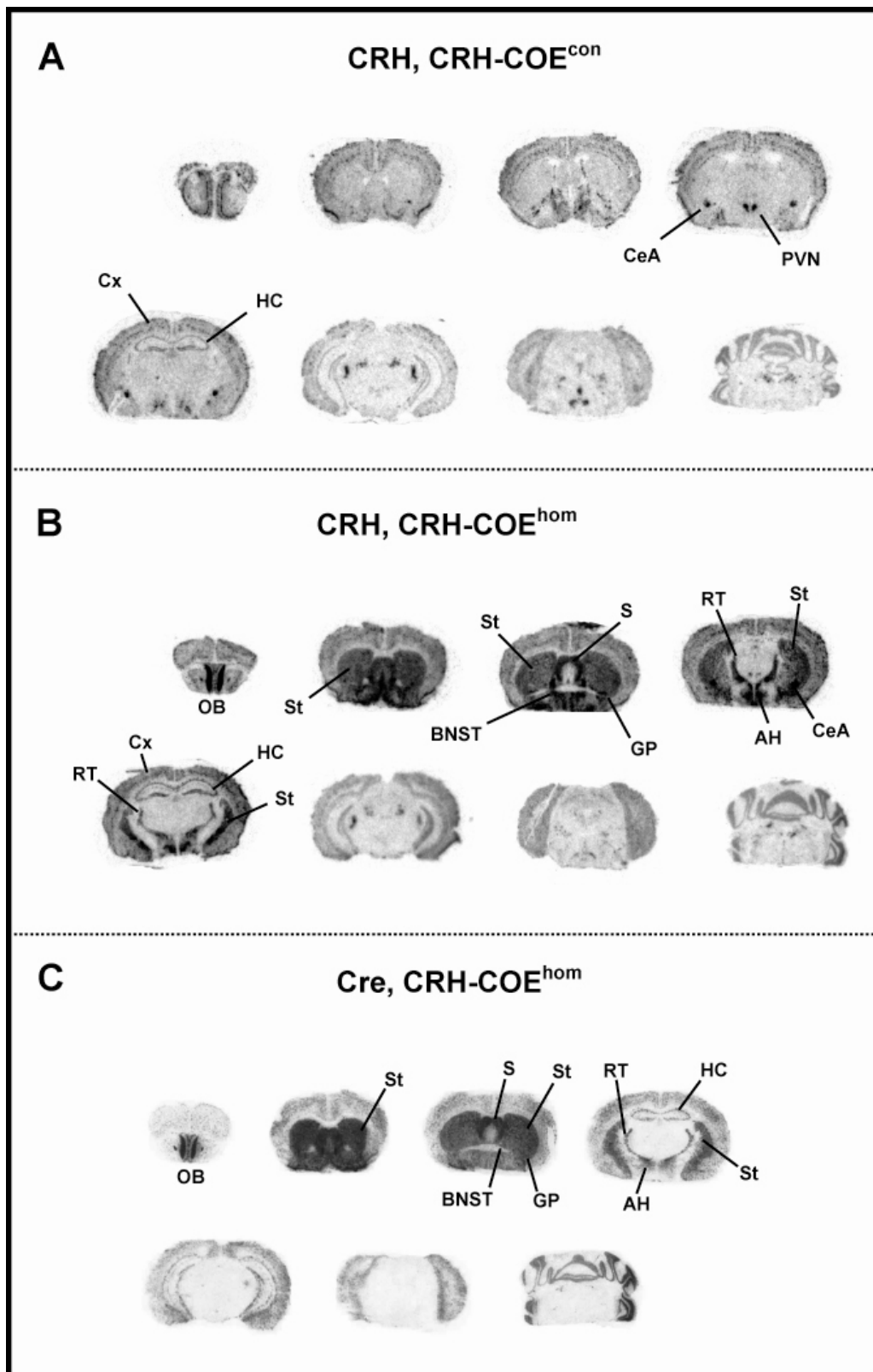


Abbildung 14: Übersichtsdarstellung der Expression von CRH mRNA und Cre mRNA auf Coronalen Schnitten von CRH-COE^{hom} Mäusen und Kontrolltieren der Linie CRH-COE_{Dlx}.

(A) CRH mRNA Expression eines Kontrolltieres von rostral (links) nach kaudal (rechts), die das Expressionsmuster von endogenem CRH widerspiegelt. (B) CRH mRNA und (C) Cre mRNA Expression eines CRH-COE^{hom} Tieres. Abkürzungen: AH, anteriorer Hypothalamus; BNST, Bettkern der Stria Terminalis; CeA, zentrale Amygdala; Cx, Cortex; GP, Globus pallidus; HC, Hippocampus; OB, Bulbus olfactorius; PVN, Nucleus paraventricularis; RT, Nucleus reticularis thalami; S, Septum; St, Striatum.

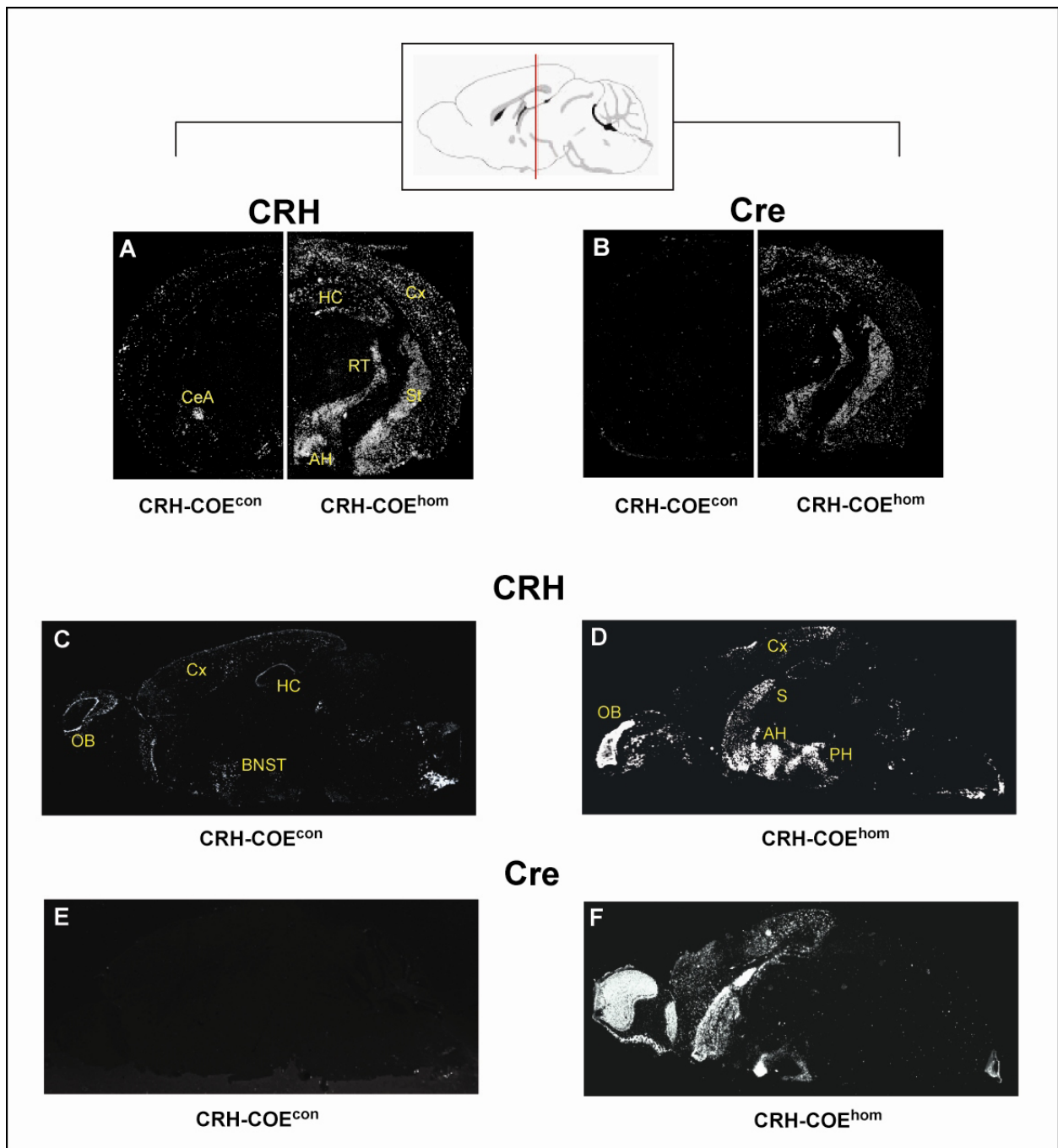


Abbildung 15: Übersichtsaufnahmen (Dunkelfeld) der CRH mRNA (A,C,D) und Cre mRNA (B,E,F) Expression auf Coronal- (A,B) und Sagittalschnitten (C,D,E,F) von CRH-COE^{hom} und CRH-COE^{con} Mäusen der Linie CRH-COE^{Dlx}.

Abkürzungen: Abkürzungen: AH, anteriorer Hypothalamus; BNST, Bettkern der Stria Terminalis; CeA, zentrale Amygdala; Cx, Cortex; HC, Hippocampus; OB, Bulbus olfactorius; PH, posteriorer Hypothalamus; RT, Nucleus reticularis thalami; S, Septum; St, Striatum.

4.1.2.2 Analyse der Dlx5/6-Cre Aktivität mittels LacZ-Färbung

Prinzipiell ist es möglich die Aktivität der Cre-Rekombinase direkt mit Hilfe des in die CRH-Expressionseinheit integrierten LacZ-Reportergens zu analysieren. Da das LacZ-Reportergen als Fusionstranskript mit der exogenen CRH mRNA exprimiert wird, erfolgt nach der Cre induzierten Deletion der Stopkassette die Transkription eines CRH-IRES-LacZ Fusionstranskripts. Die IRES Sequenz zwischen CRH und LacZ erlaubt dabei die unabhängige Translation des LacZ Gens. In der Praxis lässt sich jedoch häufig beobachten, dass die Translationseffizienz einer IRES-Sequenz generell geringer ist als die des vorangestellten Transkripts, was sich wiederum negativ auf die Sensitivität der LacZ-Färbung auswirkt. Aus diesem Grund wurden Dlx5/6-Cre Mäuse mit der Reporterlinie ROSA26 verpaart (Soriano, 1999). Diese Linie ist homozygot für ein transgenes Konstrukt, das mit dem der CRH-COE Linie nahezu identisch ist mit dem Unterschied, dass bei ROSA26 Reportermausen lediglich ein LacZ-Reportergen in den R26 Locus integriert wurde. Der ROSA26 Promotor kontrolliert somit nur die Expression des LacZ-Gens, welches aber ebenfalls durch eine mit loxP-Sequenzen flankierte Stopkassette inaktiviert ist. Alle Nachkommen aus dieser Verpaarung sind heterozygot für den ROSA26 Locus und 50 % davon tragen zusätzlich die Dlx5/6-Cre ($R26^{+/LacZ}Dlx5/6-Cre$). In diesen Tieren wird die Stopkassette entfernt und somit β -Galaktosidase aktiviert. Sowohl Gehirnschnitte als auch periphere Organe, bzw. Gewebe (Herz, Leber, Niere, Milz, Dünn- und Dickdarm, Thymus, Geschlechtsorgane, Pankreas, Nebenniere, Haut, Fettgewebe, Hypophyse, Lunge) dieser Tiere wurden mittels LacZ-Färbung hinsichtlich ihrer Cre-Aktivität überprüft.

Abbildung 16 zeigt, dass das durch die LacZ-Färbung erhaltene Cre-Expressionsmuster mit dem Expressionsprofil der detektierten Cre mRNA und CRH mRNA übereinstimmt. Die spezifische X-Gal Färbung ist gut sichtbar im Bereich des Striatums, des Septums, des Globus pallidus, des Bulbus olfactorius und des Hypothalamus. Cortex und Hippocampus sowie die Bereiche des Thalamus weisen dagegen nur eine relativ schwache Färbung auf. Die Identität eines paarig angelegten Expressionsbereiches im Hinterhirn (Abbildung 16R) mit relativ starker Signalintensität konnte bis zu diesem Punkt nicht zweifelsfrei aufgeklärt werden und gab Anlass zu weiteren Untersuchungen (siehe nachfolgendes Kapitel). Die Untersuchung der peripheren Organe, bzw. Gewebetypen brachte keinerlei Cre-Expression zum Vorschein. Ausgenommen davon sind Organe mit bekanntermaßen unspezifischem X-Gal Hintergrundsignal, wie Darm, Magen und Knochengewebe (z.B. die mit der Hypophyse herauspräparierte Sella turcica).

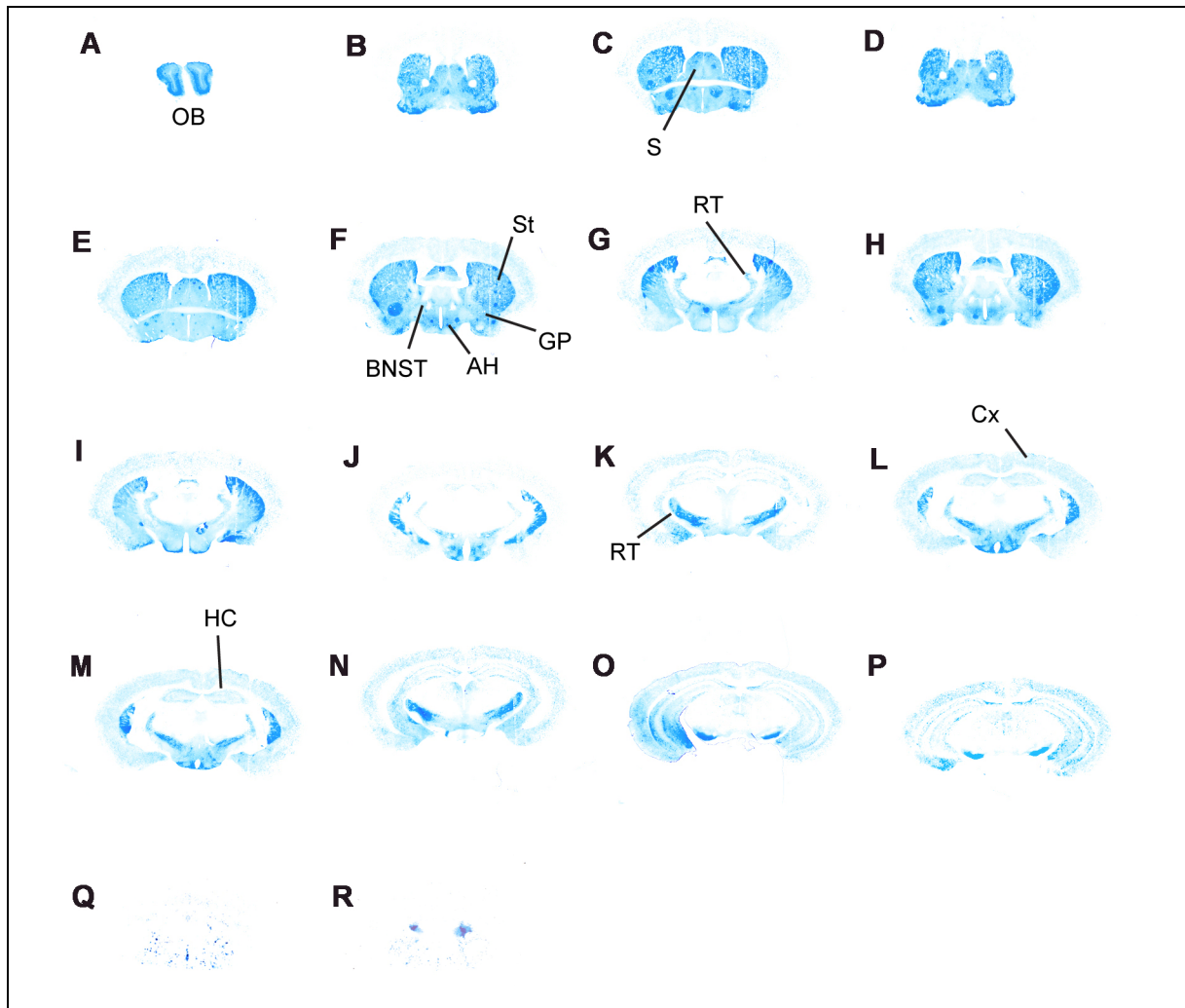


Abbildung 16: LacZ-Färbereihe auf Coronschnitte eines $R26^{+/LacZ}Dlx5/6$ -Cre Tieres.

Abkürzungen: AH, anteriorer Hypothalamus; BNST, Bettkern der Stria Terminalis; Cx, Cortex; GP, Globus pallidus; HC, Hippocampus; OB, Bulbus olfactorius; RT, Nucleus reticularis thalami; S, Septum; St, Striatum.

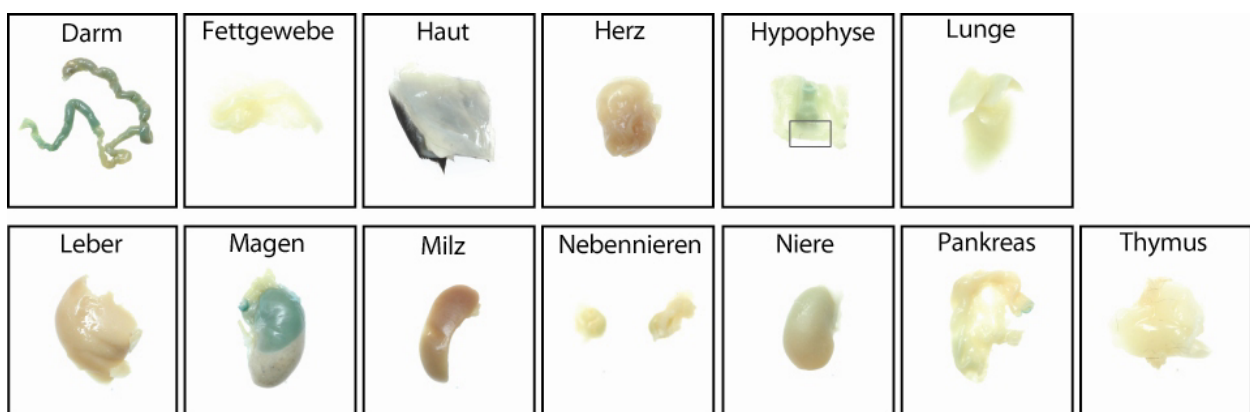


Abbildung 17: Organe/Gewebeprobe aus einem $R26^{+/LacZ}Dlx5/6$ -Cre Tier, die mittels LacZ-Färbung auf periphere Expression von Dlx5/6-Cre hin überprüft wurden.

Die Hypophyse wurde zusammen mit dem umgebenden Knochengewebe der Sella turcica herauspräpariert und ist deshalb durch die rechteckige Umrandung hervorgehoben. Die entsprechenden Organe eines Kontrolltieres zeigten keine spezifische LacZ-Färbung (Daten nicht gezeigt). Die Größenrelationen der Organe sind nicht maßstabsgerecht dargestellt.

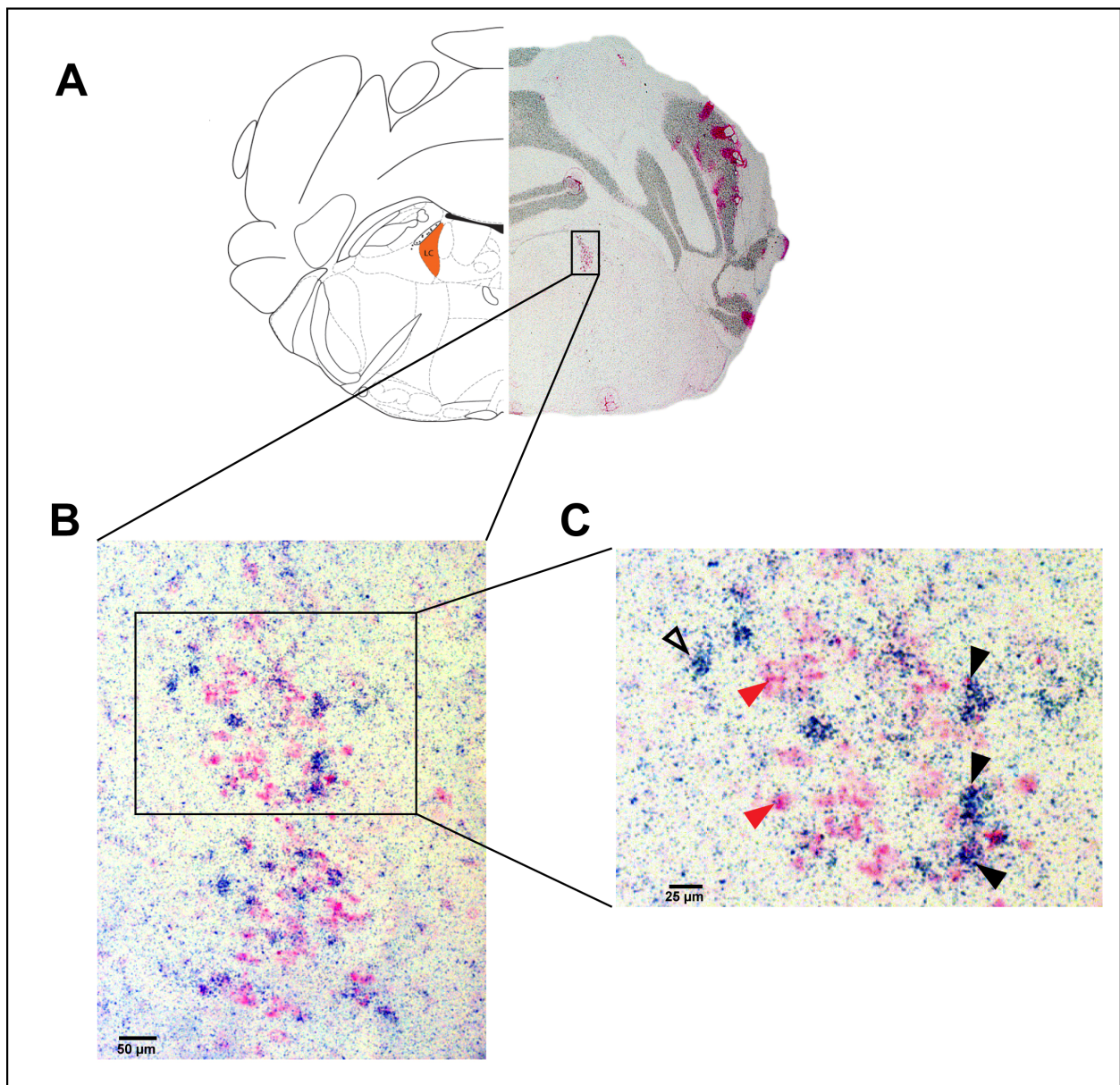


Abbildung 19: Doppel-In-Situ mit Cre- und TH-Sonde auf Coronalen Schnitten eines CRH-COE^{hom} Tieres der Linie CRH-COE_{Dlx}.

(A) Übersichtsbild und (B) 20-fache Vergrößerung des Hinterhirnbereichs, auf dem eine Kolokalisation von Cre- und TH-Signalen festgestellt werden konnte. Innerhalb des Teilausschnittes (C) lassen sich einzelne TH-Signale (roter Pfeilkopf), Cre-Signale (schwarz umrandeter Pfeilkopf) und kolokalisierte Doppelsignale (schwarze Pfeilköpfe) erkennen. Bei den roten Flecken im Randbereich des Coronalchnittes (A) handelt es sich um Begleitartefakte der Vector®-Red Farbreaktion.

Wie in Abbildung 19 zu sehen, zeigt sich auf Coronalen Schnitten des Hinterhirnbereichs ein distinktes TH-Signal, welches bezüglich seiner Form und anatomischen Lokalisation dem Locus coeruleus entspricht. Innerhalb dieser Struktur fanden sich Signale der radioaktiv markierten Cre-Sonde, die mit den TH-Signalen überlappten und damit eine Kolokalisation von Tyrosinhydroxylase und Cre-Rekombinase anzeigten. Dabei ergab sich die Kolokalisation nur in einem Teil der TH-positiven Zellen (ca. 30 % aller TH-positiven Zellen). Die restlichen Zellen waren

entweder nur Cre-positiv oder nur TH-positiv (ca. 9 %, bzw. 70 % der Zellen in denen ein Cre- oder TH-Signal detektiert werden konnte). Auf Seiten der Cre-exprimierenden Zellen waren 73 % sowohl Cre- als auch TH-positiv. Entsprechend zeigte sich in den übrigen 27 % nur das Signal der Cre-Sonde.

4.1.3 Verhaltensphänotypisierung der CRH-COE_{Dlx} Linie

Die Auswirkungen der zentralen CRH-Überexpression in homozygoten CRH-COE_{Dlx} (CRH-COE^{hom}) Mäusen auf Lokomotion sowie angst- und depressionsrelevante Verhaltensmuster wurde unter Anwendung der klassischen Verhaltensparadigmen „Open-Field“ (OF), „Elevated-Plus-Maze“ (EPM), „Dark-Light-Box“ (DaLi) und „Forced-Swim Test“ (FST) untersucht. Für die Tests wurden stets männliche CRH-COE^{hom} und CRH-COE^{con} Geschwistertiere verwendet.

Um Lokomotionsunterschiede als Störvariable ausschließen zu können, wurde vorab der OF-Test unter nicht-aversiven Bedingungen (Beleuchtungsstärke = 15 lux) durchgeführt. Es konnte dabei kein Unterschied zwischen CRH-COE^{hom} und CRH-COE^{con} Tieren festgestellt werden (Abbildung 20A, linker und mittlerer Graph).

Im EPM (zur Detektion von Angst-ähnlichem Verhalten) verbrachten die CRH-COE^{hom} Mäuse signifikant mehr Zeit auf dem offenen Arm als CRH-COE^{con} Mäuse ($P < 0,001$) und fielen durch eine ebenfalls signifikant verkürzte Latenzzeit ($P < 0,001$) zum Betreten des offenen Arms auf (Abbildung 20B). Ergänzend zum EPM wurde ein modifizierter OF-Test durchgeführt. Die für Mäuse nicht aversive Beleuchtung von 15 lux wurde dabei auf 150 lux erhöht, so dass das Betreten des Mittelbereichs für die Tiere eine aversive Situation darstellte. Im Gegensatz zum OF-Test bei 15 lux betraten CRH-COE^{hom} Tiere bei 150 lux die innere Zone des OF nun signifikant ($P < 0,05$) häufiger als CRH-COE^{con} Tiere (Abbildung 20A, rechter Graph).

Komplettiert wurde die Messung des Angst-ähnlichen Verhaltens durch die DaLi-Box. Obwohl beide Genotypen prozentual ähnlich viel Zeit im hellen Kompartiment verbringen, betreten CRH-COE^{hom} Mäuse das helle Kompartiment signifikant häufiger ($P < 0,05$) und mit einer geringeren Latenzzeit ($P < 0,05$) (Abbildung 20C).

Im FST, der allgemein zur Erhebung von Depressions-ähnlichem Verhalten angewendet wird, konnten weder beim „struggling“ noch beim „floating“ Unterschiede festgestellt werden (Abbildung 20D). Die Wiederholung des FST am darauffolgenden Tag zeigte zwar deutlich geringere „struggling“- und höhere „floating“- Zeiten im Vergleich zum Vortag, doch kann dieser Effekt auf die Habituation der Mäuse an die Testsituation zurückgeführt werden. Die „floating“-Zeit der CRH-COE^{hom} an Tag 2 war signifikant höher als die der Kontrollen ($P < 0,05$),

doch konnte dieser Unterschied in einer Wiederholung des FST nicht reproduziert werden (siehe Anhang 3).

Bei einer unabhängigen Wiederholung von OF, EPM und FST mit einer zweiten CRH-COE^{hom}-, bzw. Kontroll-Gruppe konnten die in Abbildung 20 dargestellten Ergebnisse vollständig reproduziert werden (Anhang 3) (weitere Parameter die im Rahmen der Verhaltenstests abgegriffen wurden können im Anhang 1 gefunden werden). Zusammenfassend läßt sich somit feststellen, dass CRH-COE_{Dlx} Mäuse einen robustes Angst-ähnliches Verhalten im EPM, in der DaLi-Box und im aversiven OF zeigen. Hinweise auf Lokomtionsunterschiede oder ein verändertes Depressions-ähnliches Verhalten konnten dagegen nicht festgestellt werden.

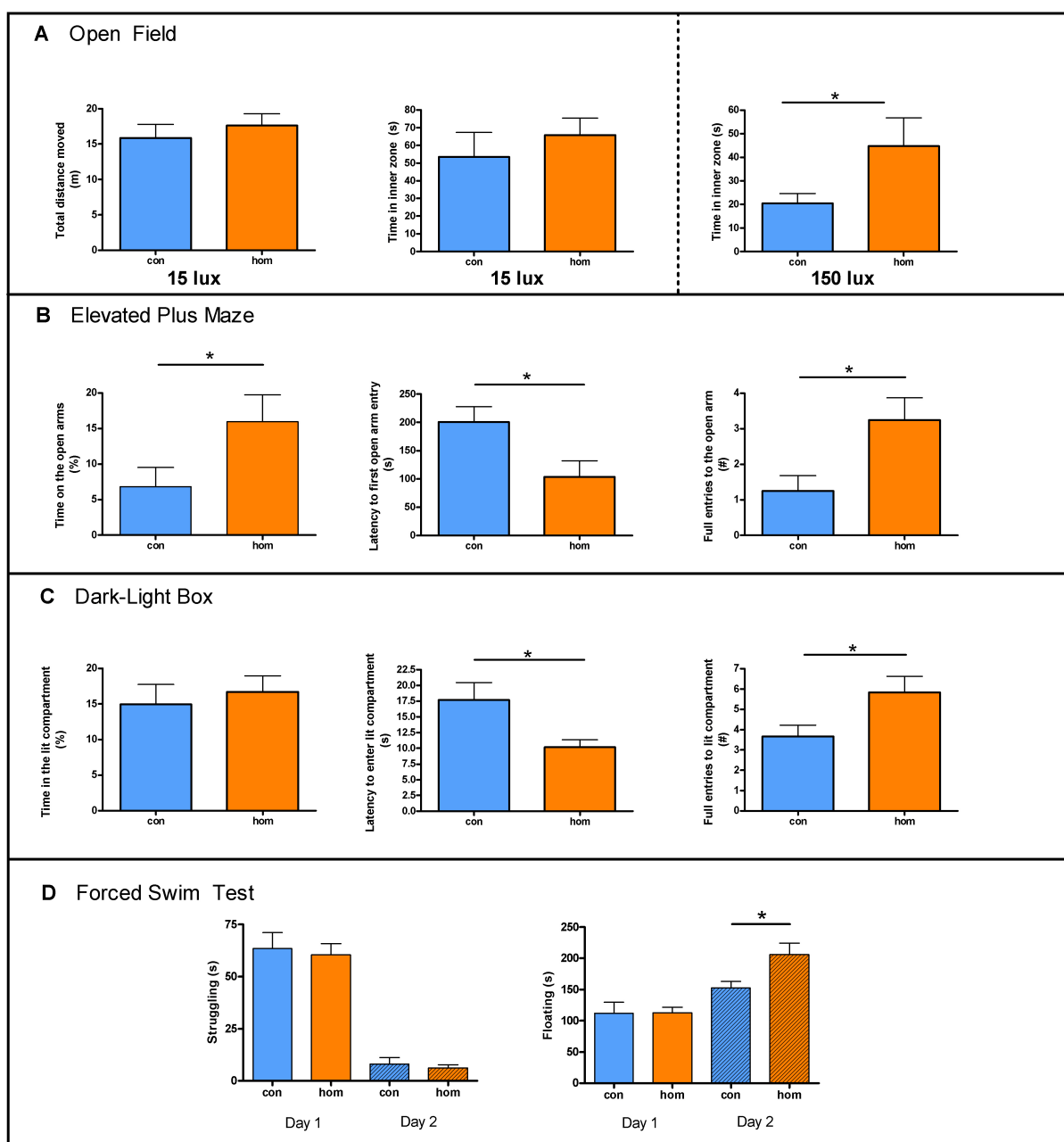


Abbildung 20 (vorhergehende Seite): Ergebnisse der Verhaltenstypisierung von CRH-COE^{hom} Männchen und CRH-COE^{con} Kontrolltieren der Linie CRH-COE_{Dlx}.

Dargestellt sind die Ergebnisse des: (A) „Open-Field-Tests“ unter Normalbedingungen (15 lux, linker und mittlerer Graph) und aversiven Bedingungen (150 lux, rechter Graph), (B) „Elevated-Plus-Maze“ als prozentuale Zeit, die auf dem offenem Arm verbracht wurde (linker Graph), Latenzzeit bis zum ersten Betreten des offenen Arms (mittlerer Graph) und Anzahl der vollen Eintritte in den offenen Arm (rechter Graph), (C) „Dark-Light-Box“ als prozentuale Zeit, die im hellen Kompartiment verbracht wurde (linker Graph), Latenzzeit bis zum Betreten des hellen Kompartiments (mittlerer Graph) und Anzahl der kompletten Eintritte in das helle Kompartiment (rechter Graph) und (D) „Forced-Swim Test“ als „struggling“-Zeit (linker Graph) und „floating“-Zeit (rechter Graph).

4.1.4 Überprüfung der HPA-Achsen Aktivität

Der mögliche Einfluss der CRH Überexpression auf die Aktivität, bzw. Responsivität der HPA-Achse wurde durch Messung der basalen und Stress-induzierten Plasma Corticosteron-Werte überprüft. CRH-COE^{het} und CRH-COE^{hom} Männchen zeigten dabei keinerlei Unterschiede zu CRH-COE^{con} Kontrolltieren hinsichtlich ihrer basalen Vormittags- und Nachmittagswerte (Abbildung 21A). Wurden die Versuchstiere für 10 oder 15 Minuten durch Immobilisation gestresst, so ließen sich bei CRH-COE^{hom} Tieren statistisch signifikant höhere Corticosteron-Konzentrationen beobachten ($P < 0,05$) als bei den entsprechenden Kontrolltieren. Bei der anschließenden Messung eine Stunde nach Beendigung des Stress (Feedback) konnte dieser Unterschied jedoch nicht mehr festgestellt werden (Abbildung 21B). CRH-COE^{hom} Weibchen wiesen bezüglich der Basal- und Stresswerte (inklusive Feedback) keinerlei Unterschiede zu den Kontrolltieren auf (Anhang 2).

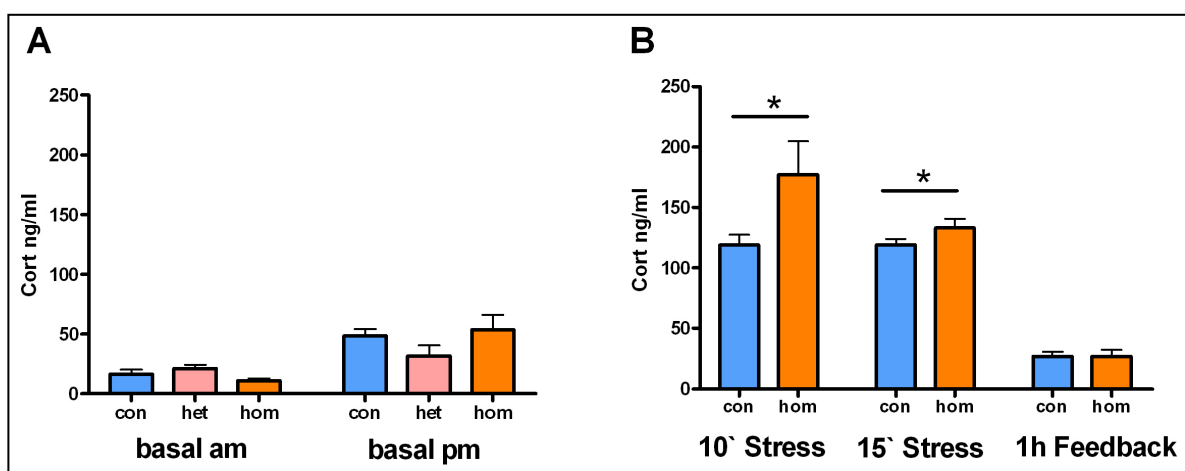


Abbildung 21: Plasma Corticosteron-Konzentrationen in männlichen CRH-COE^{het} (het) CRH-COE^{hom} (hom) und CRH-COE^{con} (con) Mäusen der Linie CRH-COE_{Dlx} unter (A) Basalbedingungen (am = vormittags, pm = nachmittags) und (B) unmittelbar nach 10, bzw. 15 Minuten Stress sowie eine Stunde nach dem Ende des Immobilisationsstress.

4.1.5 Quantifizierung der CRH/CRH-R1/CRH-R2 Expression

Die Überexpression von exogenem CRH in GABA-ergen Interneuronen kann zu kompensatorischen Veränderungen des CRH/CRH-Rezeptor Systems führen, was wiederum die Ausprägung von Verhaltensphänotypen bedingen oder beeinflussen kann. Um zu überprüfen, ob und wenn ja in welchem Umfang dies in CRH-COE_{DLX} Tieren der Fall ist, wurde die Expression von endogenem CRH, CRH-R1 und CRH-R2 in homozygot CRH-überexprimierenden Mäusen und in Kontrolltieren (jeweils 6 Tiere pro Genotyp) per In-Situ-Hybridisierung detektiert und die durchschnittlichen Signalstärken beider Genotypen miteinander verglichen. Für die Quantifizierung wurden dabei die anatomischen Bereiche miteinbezogen, die aufgrund ihrer Signalstärke gut erfasst werden konnten und/oder die potentiell verhaltensspezifisch relevant sind (z.B. Amygdala, Hippocampus, Cortex).

Im Ergebnis zeigt die In-Situ-Quantifizierung eine signifikante Hochregulierung des endogenen CRH in der zentralen Amygdala ($P < 0,001$), nicht aber im PVN. Sowohl CRH-R1 als auch CRH-R2 zeigten dagegen eine signifikante Erhöhung im Hippocampus; CRH-R1 in allen untersuchten Teilbereichen des Hippocampus (CA1; $P < 0,001$; CA3, $P < 0,05$; Gyrus dentatus, $P < 0,05$), CRH-R2 nur in CA1 und Gyrus dentatus. (jeweils $P < 0,05$). In den übrigen analysierten subcorticalen Bereichen (laterales Septum, Nucleus reticularis thalami, basolaterale und mediale Amygdala) sowie im Cortex konnten keinerlei Veränderungen der CRH-R1/CRH-R2 mRNA Expression in homozygoten CRH-COE_{DLX} Tieren festgestellt werden.

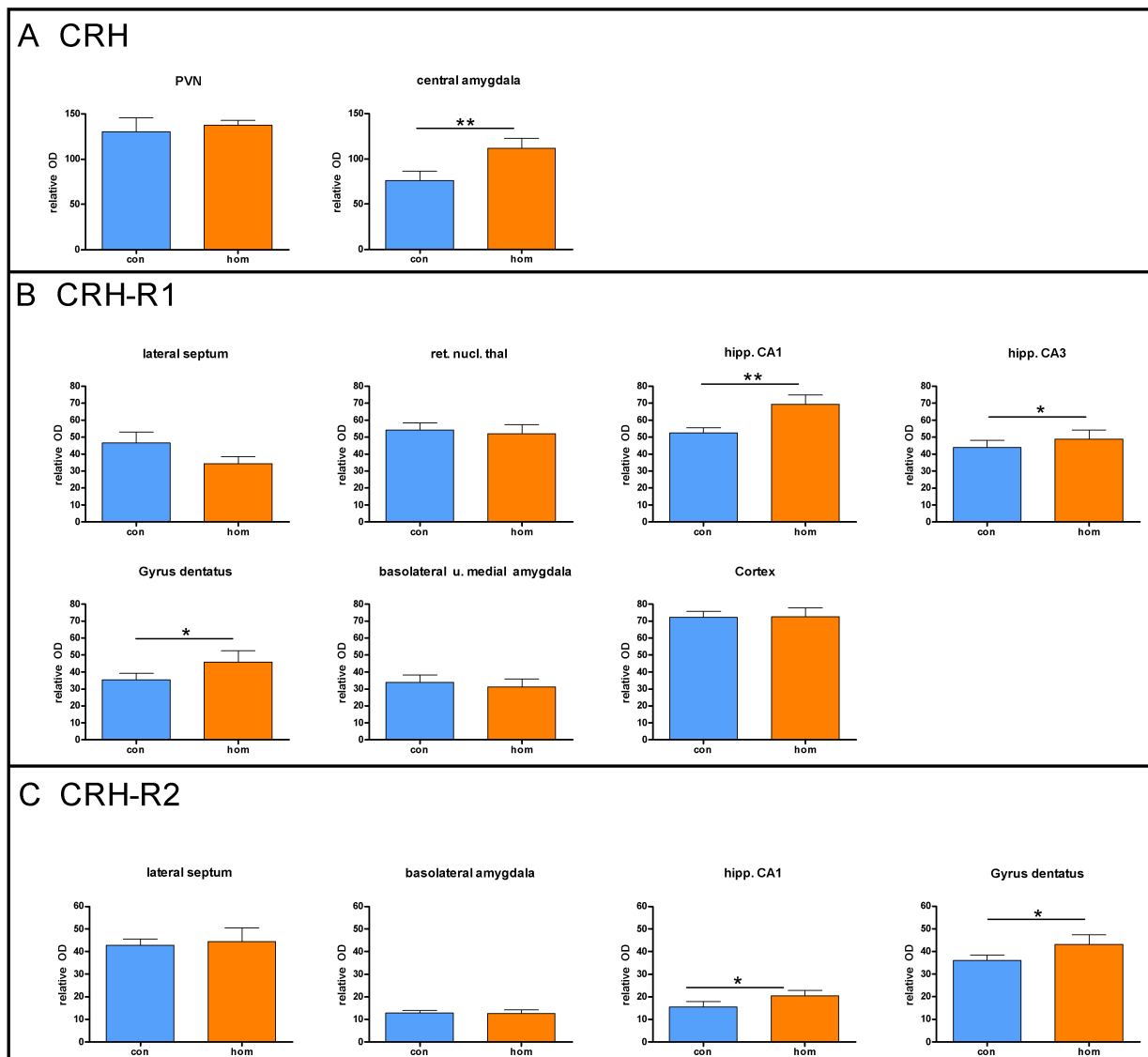


Abbildung 22: Ergebnisse der Expressionsquantifizierung von (A) endogenem CRH (B) CRH-R1 sowie (C) CRH-R2 in CRH-COE^{hom} und CRH-COE^{con} Tieren der Linie CRH-COE^{Dlx}. CRH-COE^{hom} (hom) und CRH-COE^{con} (con) Tiere wurden hinsichtlich ihrer Expression im (A) Bereich des Nucleus paraventricularis, der zentralen Amygdala und (B, C) des lateralen Septums, des Nucleus reticularis thalami, der Hippocampusregionen CA1 und CA3, des Gyrus dentatus, der basolateralen und medialen Amygdala sowie des Cortex untersucht.

4.2 Generierung und Analyse der Linie CRH-Cre

4.2.1 Strategie zur Erzeugung des CRH-Cre Transgens

Ein Ziel der vorliegenden Arbeit war es eine neue Cre-Mauslinie zu generieren, welche die Cre-Rekombinase unter der Kontrolle des CRH Promotors exprimiert. Anschließend sollte diese CRH-Cre Maus mit Mäusen der Linie CRH-COE gekreuzt werden, um letztendlich Tiere zu generieren, die CRH allein in CRH-spezifischen Zellen überexprimieren (CRH-COE_{Crh}).

Die Strategie zur Erfüllung dieses Vorhabens teilte sich grob in drei Phasen:

1. Herstellung einer Cre-Expressionskassette, die neben der Cre-Rekombinase alle für die Funktionalität und Analyse der Cre-Expression relevanten Motive und Elemente enthält.
2. Erstellung des CRH-Cre Expressionsvektors. Dies sollte mit Hilfe eines aus einer genomischen Bibliothek stammenden, den CRH-Locus enthaltenden DNA Fragments geschehen, wobei das Exon 2 des CRH Gens gegen die Cre-Kassette ausgetauscht werden sollte.
3. Linearisierung des so entstandenen CRH-Cre Vektors sowie dessen anschließende Elektroporation in ES-Zellen und/oder Pronucleus-Injektion zur Gewinnung transgener Tiere.

Folgende Überlegungen spielten bei der Ausarbeitung dieser Strategie eine Rolle:

Zu Phase 1: der Austausch der Cre-Kassette gegen das Protein-codierende Exon 2 des CRH Gens sollte bewirken, das Exon 1 unter der Kontrolle des CRH-Promotors an die Cre-Rekombinase gespleißt wird und somit Cre CRH-spezifisch transkribiert und translatiert wird. Zu diesem Zweck war es erforderlich die Cre-Rekombinase mit einem Spleiß-Akzeptor zu versehen. Des weiteren musste bedacht werden, dass für eine Elektroporation des fertigen Konstrukts in ES-Zellen ein Selektionsmarker benötigt werden würde, dessen Expression unter der Kontrolle eines eigenen, unabhängigen Promotors stattfinden sollte. Um eine Selektion sowohl in Bakterien (während der Klonierung) als auch in ES-Zellen zu ermöglichen, musste es sich dabei um einen kombinierten prokaryotischen und eukaryotischen Promotor handeln. Zudem musste nach dem Selektionsmarker ein Transkriptionsstop-Signal eingefügt werden, welches gewährleisten sollte, dass der starke eukaryotische Promotor des Selektionsmarkers die Transkription nicht über dessen Ende hinaus auf nachfolgende Kassettenelemente hinausträgt.

Eine Positionierung der Selektionskassette „upstream“ der Cre-Rekombinase sollte die Möglichkeit eröffnen die Rekombinase konditional aktivieren zu können. Da die Selektionskassette mit ihrem Transkriptionsstopp-Signal an dieser Position die Transkription der nachfolgenden Kassetten-Elemente verhindert (und somit als Stopkassette fungiert), kann auch Cre in diesem Zustand nicht exprimiert werden. Durch Flankieren der Selektions-/Stopkassette mit so genannten FRT-Sequenzen, sollte diese von dem Enzym Flp-Rekombinase (ähnlich dem Cre/loxP System) deletiert und dadurch die Cre Expression ermöglicht werden (Branda and Dymecki, 2004).

Die Cre-Rekombinase sollte außerdem noch mit einem Reporter gen verbunden werden, mit dessen Hilfe sich die Expression von Cre indirekt detektieren lassen sollte. Die Möglichkeit eines Fusionsproteins aus Cre und Reporterprotein wurde dabei ausgeschlossen, da derartige Fusionsproteine die Funktionalität des Effektorproteins beeinträchtigen können. Stattdessen sollte eine zwischen Cre und Reporter liegende IRES-Sequenz (internal ribosome entry site) eine gemeinsame Transkription, aber unabhängige Translation der beiden Gene gestatten (Vagner et al., 2001). Schließlich sollten am 5`-und 3`-Ende der Cre-Kassette homologe Arme angebracht werden, die eine homologe Rekombination mit Exon 2 des CRH Gens ermöglichen. Die Sequenz der homologen Arme muss dabei den flankierenden Bereichen von Exon 2 entsprechen und die auszutauschende Sequenz damit einrahmen. Vor dem Anfügen der homologen Arme sollte durch Anfügen einer „multiple-cloning-site“ an das 5`-und 3`-Ende die Möglichkeit geschaffen werden, mit Hilfe von selten vorhandenen Restriktionsschnittstellen verschiedene Homologiearme an die Cre-Kassette anfügen zu können. Die Kassette könnte so auch unter die Kontrolle anderen Promotoren gestellt werden.

Zusätzlich zur Rekombinationskassette mit konventioneller Cre-Rekombinase, sollte parallel dazu eine ähnliche Kassette mit induzierbarer Cre-Rekombinase (CreERT2) konstruiert werden. Bei der CreERT2 handelt es sich um ein Fusionsprodukt aus Cre-Rekombinase und einer Östrogenrezeptor-Bindedomäne (ERT2). Im normalen, nicht-induzierten Zustand wird die CreERT2 über die Östrogenrezeptor-Bindedomäne an Hitzeschockproteine gebunden und verbleibt deshalb im Cytoplasma. Appliziert man den Liganden Tamoxifen so kann der CreERT2-Hitzeschockprotein-Komplex gelöst und CreERT2 zur Ausübung seiner enzymatischen Funktion in den Nukleus der Zelle translokiert werden (Lantinga-van Leeuwen et al., 2006).

Zu Phase 2: Der Austausch von Exon 2 des CRH Gens gegen die Cre-Kassette sollte mittels homologer Rekombination in Bakterien (ET-Klonierung) geschehen. Obwohl die basalen CRH-Promotorelemente bekannt sind (King et al., 2002), ist nicht klar in wie weit weitere regulatorische Elemente (wie z.B. Enhancer oder Silencer) für die Funktionalität der CRH-Expression

notwendig sind. Da sich derartige regulatorische Elemente in den meisten Fällen „upstream“ des Genlocus befinden, sollte die homologe Rekombination auf einem genomischen DNA-Fragment stattfinden, welches neben dem CRH-Locus einen möglichst großen „upstream“ Bereich aufwies. Zu diesem Zweck wurden entsprechende Klone einer BAC-Bibliothek (RPCI24-212D10) und einer Fosmid-Bibliothek (WI1-1975E16) bestellt, deren Charakteristikum darin besteht, dass die entsprechenden BAC-/Fosmid-Vektoren relativ lange genomische Fragmente inklusive des erwünschten Locus tragen können. So trägt der BAC-Klon RPCI24-212D10 ein genomisches DNA-Fragment von ca. 162 kb, wovon sich ca. 123 kb „upstream“ des CRH-Locus befinden. Der Fosmid-Klon WI1-1975E16 trägt dagegen ein DNA-Fragment von ca. 44 kb Größe, wovon ca. 30 kb „upstream“ des CRH Gens liegen. Die homologe Rekombination zur Erzeugung der transgenen CRH-Cre Konstrukte wurde sowohl auf dem BAC-Klon als auch auf dem Fosmid-Klon durchgeführt, um die Erfolgsrate durch Verfolgung dieser beiden Vektorstrategien zu erhöhen.

Zu Phase 3: Um die Chance auf die erfolgreiche Generierung einer transgenen CRH-Cre Mauslinie zu erhöhen, sollten transgene Tiere mittels Pronucleus-Injektion oder ES-Zellmanipulation gewonnen werden. Aus Zeitgründen wurden diesen beiden Strategien schließlich aber nur mit den Fosmid-basierten Vektoren (d.h. den Transgenen, zu deren Erzeugung der Fosmid-Klon WI1-1975E16 verwendet wurde) durchgeführt.

Unter Einbeziehung der erläuterten Anforderungen wurde das Ziel-Modell für die Konstruktion der Cre-Kassette wie in Abbildung 23 formuliert:



Abbildung 23: Ziel-Modell der Cre-/CreERT2 Austausch-kassette.

Abkürzungen: 3' HA, 3' Homologiearm; 3pA, 3-faches Polyadenylierungssignal; 5' HA, 5' Homologiearm; bpA; Polyadenylierungssignal; Cre, Cre-Rekombinase; CreERT2, Tamoxifen-induzierbare Cre-Rekombinase; EM7, prokaryotischer Promotor EM7; FRT; FRT-Sequenz; IRES, internal ribosome entry site; Neo, Neomycin-Resistenzgen; PGK, eukaryotischer Promotor PGK (Phosphoglyceratkinase), SA, Spleiß-Akzeptor; Venus, Venus Reporter gen (gelb fluoreszierende GFP Variante).

Das Konstrukt-Modell besteht dabei entsprechend den Vorgaben aus folgenden Elementen:

- der konventionellen oder der induzierbaren Cre-Rekombinase (Cre/CreERT2), an deren 5'-Ende sich eine Kozak-Sequenz zur Erhöhung der Translations-Effizienz befindet; Größe: 1069 bp (Cre), 1998 bp (CreERT2)
- einem Spleiß-Akzeptor (SA); Größe: 141 bp
- einem Selektionsmarker (Neomycin = Neo); Größe: 804 bp
- dem eukaryotischen Promotor PGK (Phosphoglyceratkinase); Größe: 508 bp
- dem prokaryotischen Promotor EM7; Größe: 67 bp
- einem dreifachen Polyadenylierungs-/Transkriptionsstop-Signal (3pA); Größe: 1026 bp
- einer IRES Sequenz; Größe: 585 bp
- dem Gen für das gelb fluoreszierende „Venus“ Protein (= Reporter); Größe: 720 bp
- einem einfachen Polyadenylierungs-/Transkriptionsstop-Signal (bpA); Größe: 286 bp
- zwei flankierenden FRT-Sequenzen (FRT); Größe: jeweils 34 bp
- einem 5'-und 3'-Homologiearm (5'HA/3'HA); Größe: jeweils 500 bp

Die für die Konstruktion der dargestellten Kassette benötigten Einzelemente befanden sich zu Beginn der Klonierung auf folgenden Vektoren:

Konstruktelement	Ursprungsvektor
Cre	pPGKCrebpA
CreERT2	pCAG-CreER(T2)-bpA SS1
SA	pROSA-ITLD
FRT-PGK-EM7-Neo-FRT	pL451
3pA	pROSA-ITLD
bpA	pROSA-ITLD
IRES-Venus	193 IRES Venus
5'HA, 3'HA	Fosmid-Klon WI1-1975E16

4.2.2 Konstruktion der Cre-Kassette

Für die Herstellung der Cre-/CreERT2-Kassette wurde die in Abbildung 24 dargestellte Klonierungsstrategie gewählt. Nach jedem Amplifikations- oder Ligationsschritt wurden die entsprechenden Reaktionsprodukte per Kontrollverdau und Sequenzierung auf ihre Richtigkeit und Vollständigkeit hin überprüft. Im Einzelnen handelte es sich dabei um folgende Klonierungsschritte:

1. (Abbildung 24A): Amplifikation von 3pA aus dem Vektor pROSA-ITLD mit den Primern *3pA fwd* (mit BstBI-Schnittstelle) und *3pA rev* (mit BbsI-Schnittstelle) und Ligation in *pCRII-TOPO* Vektor. Anschließend Ligation von 3pA zwischen Neo und FRT der Motivfolge [FRT-PGK-EM7-Neo-FRT] (auf dem Vektor pL451) mittels BbsI/BstBI Verdau.
2. (Abbildung 24B): Amplifikation des Spleiß-Akzeptors (SA) aus dem Vektor pROSA-ITLD mit den Primern *SA fwd* (mit multiple-cloning-site: HindIII, SbfI, AscI und SacI) und *SA rev* (mit MluI- und KpnI- Schnittstelle) und Ligation in *pCRII-TOPO*. Parallel dazu Amplifikation der Motivfolge [FRT-PGK-EM7-Neo-3pA-FRT] aus dem Vektor pL451 mit den Primern *FRT-Neo-3pA fwd* (mit MluI- Schnittstelle) und *FRT-Neo-3pA rev* (mit FseI- und XhoI- Schnittstelle) und Ligation in *pCRII-TOPO*. Anschließend Ligation der Motivfolge [FRT-PGK-EM7-Neo-3pA-FRT] an das 3'-Ende von SA (in *pCRII-TOPO*) mittels MluI/XhoI Verdau.
3. (Abbildung 24C): Amplifikation der Motivfolge IRES-Venus aus dem Vektor 193 IRES Venus mit den Primern *IRES-Venus fwd* (mit NdeI- Schnittstelle) und *IRES-Venus rev kom.* (5'-Ende komplementär zu 5'-Sense-Strangende von bpA) und Ligation in *pCRII-TOPO*. Parallel Amplifikation von bpA aus dem Vektor pROSA-ITLD mit den Primern *bpA fwd kom.* (5'-Ende komplementär zu 3'-Antisense-Strangende von Venus) und *bpA rev* (mit multiple-cloning-site: PacI, XmaI, BbvCI und XhoI) und Ligation in *pCRII-TOPO*. Anschließend Ligation von IRES-Venus und bpA mittels „overlapping PCR“ und Ligation des Fusionsprodukts in *pCRII-TOPO*.
4. (Abbildung 24D): Amplifikation von Cre aus dem Vektor pPGKCrebpA mit den Primern *Cre fwd* (mit FseI-, SacI- Schnittstelle und Kozak Sequenz) und *Cre rev* (mit NdeI- und XhoI-Schnittstelle) und Ligation in *pCRII-TOPO*. Anschließend Ligation der Motivfolge [IRES-Venus-bpA] an das 3'-Ende von Cre (in *pCRII-TOPO*) mittels NdeI/XhoI Verdau.

-
5. (Abbildung 24E): Ligation der Motivfolge [Cre-IRES-Venus-bpA] an das 3`-Ende der Motivfolge [SA-FRT-PGK-EM7-Neo-3pA-FRT] (in *pCRII-TOPO*) mittels FseI/XhoI Verdau.
6. (Abbildung 24F): Amplifikation von 3`HA aus dem Fosmid-Klon WI1-1975E16 mit den Primern *CRH-3`HA fwd* (mit XmaI- Schnittstelle) und *CRH-3`HA rev* (mit PacI- Schnittstelle) und Liagation in *pCRII-TOPO*. Anschließend Ligation von 3`HA an das 3`-Ende von bpA mittels XmaI/PacI Verdau.
7. (Abbildung 24G): Amplifikation von 5`HA aus dem Fosmid-Klon WI1-1975E16 mit den Primern *CRH-5`HA fwd* (mit AscI- Schnittstelle) und *CRH-5`HA rev* (mit SbfI) und Ligation in *pCRII-TOPO*. Anschließend Ligation von 5`HA an das 5`-Ende von SA mittels AscI/SbfI Verdau.
8. (Abbildung 24H): Amplifikation von CreERT2 aus dem Vektor pCAG-CreER(T2)-bpA SS1 mit den Primern *CreER2-FseI fwd* (mit FseI- Schnittstelle) und *CreER2-NdeI rev* (mit NdeI- Schnittstelle) und Ligation in *pCRII-TOPO*. Parallel dazu Entfernung der Cre aus der Motivfolge [5`HA-SA-FRT-PGK-EM7-Neo-3pA-FRT-Cre-IRES-Venus-bpA-3`HA] mittels FseI/NdeI Verdau. Anschließend Ligation von CreERT2 zwischen FRT-Sequenz und IRES-site mittels FseI/NdeI.
9. (Abbildung 24I): Trennung der Cre-/CreERT2-Kassette von *pCRII-TOPO* mittels SbfI/XmaI Verdau und anschließend homologe Rekombination mit CRH-Exon 1 im Rahmen der ET-Klonierung.

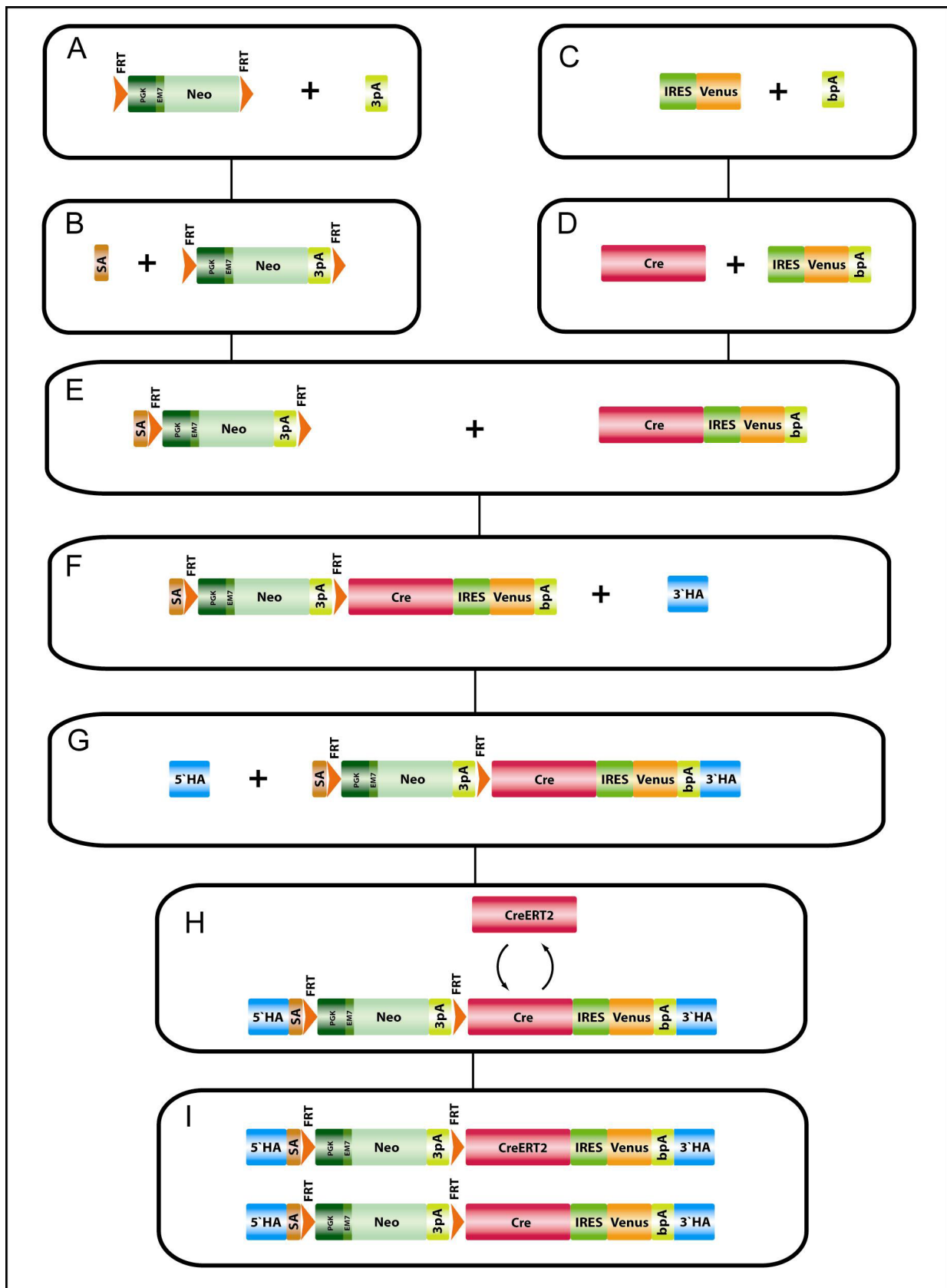


Abbildung 24: Schematische Übersicht der zur Herstellung des CRH-Cre/CRH-CreERT2 transgenen Vektors gewählten Klonierungsstrategie (Erläuterung im Text).

4.2.3 Funktionale Analyse der Cre-/CreERT2-Kassette

Die Cre-/CreERT2-Kassette sollte hinsichtlich ihrer Funktionalität auf drei Aspekte hin überprüft werden:

1. Funktionalität der FRT-Sequenzen: können die FRT-Sequenzen von der FLP-Rekombinase erkannt und die von den FRT-Sequenzen flankierte DNA (bzw. die Selektionskassette) deletiert werden?
2. Expression von Cre/CreERT2 und Venus-Reporter: werden beide Gene in ausreichendem, detektierbarem Maße translatiert?
3. Funktionalität der Cre-/CreERT2-Rekombinase: kann das Enzym loxP-flankierte DNA deletieren? Kann CreERT2 durch Tamoxifen ausreichend induziert werden?
4. Funktionalität des Spleißings: wird das Exon 1 des CRH Gens korrekt an Cre/CreERT2 gespleißt?

Die beschriebenen Aspekte sollten dabei durch Transfektion der Cre-/CreERT2-Kassette in HEK293 Zellen, bzw. der Kotransfektion der Kassetten mit einem Flp-Plasmid eruiert werden.

4.2.3.1 Funktionsanalyse der FRT-Sequenzen

Die Funktionalität der FRT-Sequenzen innerhalb eukaryotischer Zellen sollte überprüft werden indem die Cre-Kassette zusammen mit dem Flp-exprimierenden Plasmid *706-Flp* in HEK293-Zellen kotransfiziert wurde. HEK293-Zellen die sowohl die Cre-Kassette als auch das Flp-Plasmid aufnehmen, sollten aufgrund der Flp-vermittelten Stopkassetten-Deletion Cre sowie das Fluoreszenzprotein Venus exprimieren. Die Expression von Cre konnte somit indirekt über die Detektion der Fluoreszenz festgestellt werden.

Vorab musste die Rekombinationskassette aus dem *pCRII-TOPO* Vektor in den Expressionsvektor *pcDNA3.1(+)* umklontiert werden. Der *pcDNA3.1* Expressionsvektor enthält im 5'-Bereich seiner multiple-cloning-site einen starken CMV-Promotor, der für die Expression inserierter Gene sorgt. Da auf dem *pcDNA3.1* Vektor keine für die Ligation geeigneten Restriktionsschnittstellen gefunden werden konnten (die nicht zugleich auch in den Austauschassetten vorhanden waren), wurde ein „Linker“ entworfen mit dem dieses Problem umgangen werden sollte. Die Sequenz des Linkers wurde dabei so gewählt, dass er an seinem 5'-Ende eine offene (bzw. überhängende) HindIII-Schnittstelle und an seinem 3'-Ende eine offene BamHI-Schnittstelle aufwies. Mit Hilfe dieser Restriktionsschnittstellen konnte der Linker in die multiple-cloning-site

des *pcDNA3.1* Expressionsvektors ligiert werden. Zwischen der HindIII-Schnittstelle und der BamHI-Schnittstelle enthielt der Linker außerdem die Restriktionsschnittstellen SbfI und PacI. Da diese Schnittstellen auch die äußeren Ende der Austauschketten flankieren (gemeint ist das 5'-ende von SA und das 3'-Ende von bpA; die homologen Armen wurden nicht umklont), konnten diese über einen SbfI/PacI Verdau schließlich in den Linker-enthaltenden Expressionsvektor eingefügt werden. Zur Herstellung des Linkers wurden die beiden Oligonukleotide *EV-Linker sense* und *EV-Linker antisense* zu Synthese in Auftrag gegeben. Ein Gemisch aus gleichen molaren Anteilen der beiden Linker Stränge wurde auf 94 °C erhitzt und anschließend auf Raumtemperatur abgekühlt, so dass die beiden Stränge zu einem Linker-Doppelstrang hybridisieren konnten. Die korrekte Ligation des Linkers, bzw. der Austauschketten in *pcDNA3.1* wurde mittels HindIII Kontrollverdau (Fragmentgrößen ohne Kassetteninsertion: 5428 bp; Fragmentgrößen mit Kassetteninsertion: 6787 bp, 2376 bp, 1928 bp) und Sequenzierung validiert. HEK293-Zellen wurden schließlich zum einen nur mit der Cre-Kassette transfiziert und zum anderen mit Cre-Kassette und dem *706-Flp* Plasmid kotransfiziert (Abbildung 25). Während in HEK293-Zellen die nur mit der Cre-Kassette (und ohne Flp-Plasmid) transfiziert worden waren keinerlei Fluoreszenz des Venus-Proteins zu detektieren war (Abbildung 25A), konnten innerhalb der doppelt transfizierten HEK293-Zellpopulation Zellen mit einer deutlichen und spezifischen Fluoreszenz identifiziert werden (Abbildung 25B).

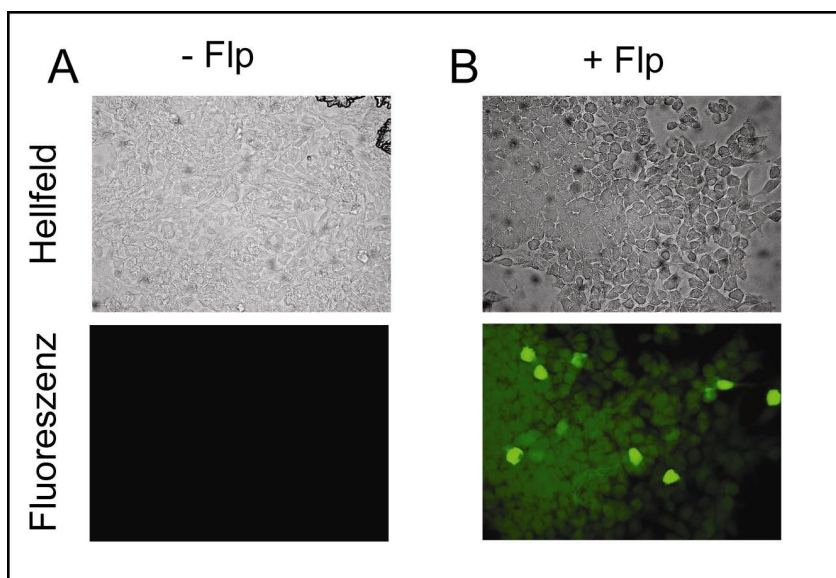


Abbildung 25: Transfektion von HEK293-Zellen mit (A) Cre-Kassette und ohne Flp-Plasmid sowie (B) Kotransfektion von Cre-Kassette und Flp-Plasmid
Gezeigt sind Hellfeld-Aufnahmen der transfizierten Hek293-Zellen und Aufnahmen der Fluoreszenzsignale, die von Venus-Proteinen emittiert werden.

Die Konfluenz der beiden Transfektionsansätze lag in beiden Fällen bei ca. 70 bis 80 %, so dass Zelldichte-Unterschiede als Ursache für mögliche Transfektions-Effizienz Unterschiede ausgeschlossen werden können. Die Transfektionseffizienz selbst wurde (wie in allen anderen Transfektionen) mittels einer parallel durchgeführten Transfektion mit dem GFP-exprimierenden Plasmid *pEGFP-N1* kontrolliert.

4.2.3.2 Analyse der Cre- Expression mittels Immunohistochemie

Die Cre-Kassette, bzw. CreERT2-Kassette sollte in HEK293-Zellen transfiziert werden und die Expression des Cre-Proteins mit Hilfe eines Cre-spezifischen Antikörpers nachgewiesen werden. Da es für die konstitutive Expression der Cre-Rekombinase in *pcDNA3.1* erforderlich war, die Selektionskassette/Stopkassette zu entfernen, wurden beide im *pCRII-TOPO* Vektor befindlichen Kassettentypen (Cre und CreERT2) in den *E. coli* Stamm *294-Flp* transformiert (Buchholz et al., 1996a; Buchholz et al., 1996b). *E. coli 294-Flp* exprimiert konstitutiv Flp-Rekombinase, so dass die Selektionskassette in den transformierten Rekombinationskassetten („RK ohne Stop“) entfernt werden konnte. Bakterienklone, in denen die Selektionskassette entfernt worden war, wurden mittels HindIII Kontrollverdau (Fragmentgrößen mit Selektionskassette: 6787 bp, 2376 bp, 1928 bp; Fragmentgrößen ohne Selektionskassette: 6787 bp, 1566 bp) und Sequenzierung validiert. Anschließend wurden HEK293-Zellen mit [*pcDNA3.1*-RK ohne Stop] und als Negativkontrolle mit [*pcDNA3.1*-RK mit Stop] transfiziert, nach 24 Stunden fixiert und das Cre-Protein über Antikörperfärbung nachgewiesen. Die Detektion des Signals erfolgte mittels AB-Komplex und DAB-Färbung. Da innerhalb dieses Versuchs nur die Anwesenheit des Cre-/CreERT2-Proteins nicht aber seine Funktionalität überprüft werden sollte, war eine Tamoxifen-Induktion der inaktiven CreERT2 nicht notwendig. Es zeigte sich, dass in HEK293-Zellen die mit denjenigen Rekombinationskassetten transfiziert wurden, die ihre Selektions-/Stopkassette noch enthielten keine spezifische DAB-Färbung nachweisbar war (Abbildung 26A, C). Wurden HEK293-Zellen mit Cre- oder CreERT2-Kassette ohne Selektionsmarker transfiziert, so konnten zahlreiche Zellen als DAB-positiv identifiziert werden (Abbildung 26B, D). Diese Beobachtungen weisen zum einen darauf hin, dass die Stopkassette der beiden Rekombinationskassetten die Transkription der Cre-Rekombinase zuverlässig verhindert. Zum anderen konnte die korrekte Translation der Cre-Rekombinase aus der Rekombinationskassette zum Protein nachgewiesen werden. Darüber hinaus läßt sich in Abbildung 26 die unterschiedliche Lokalisation des Cre-, bzw. CreERT2-Proteins erkennen: während das CreERT2-spezifische DAB Signal sich überwiegend im Zytoplasma (also außerhalb des Zellkerns) befindet (Abbildung 26D), erstreckt sich das DAB Signal der Cre-Rekombinase sichtbar auch auf den Kernbereich der HEK293-Zellen (Abbildung 26B).

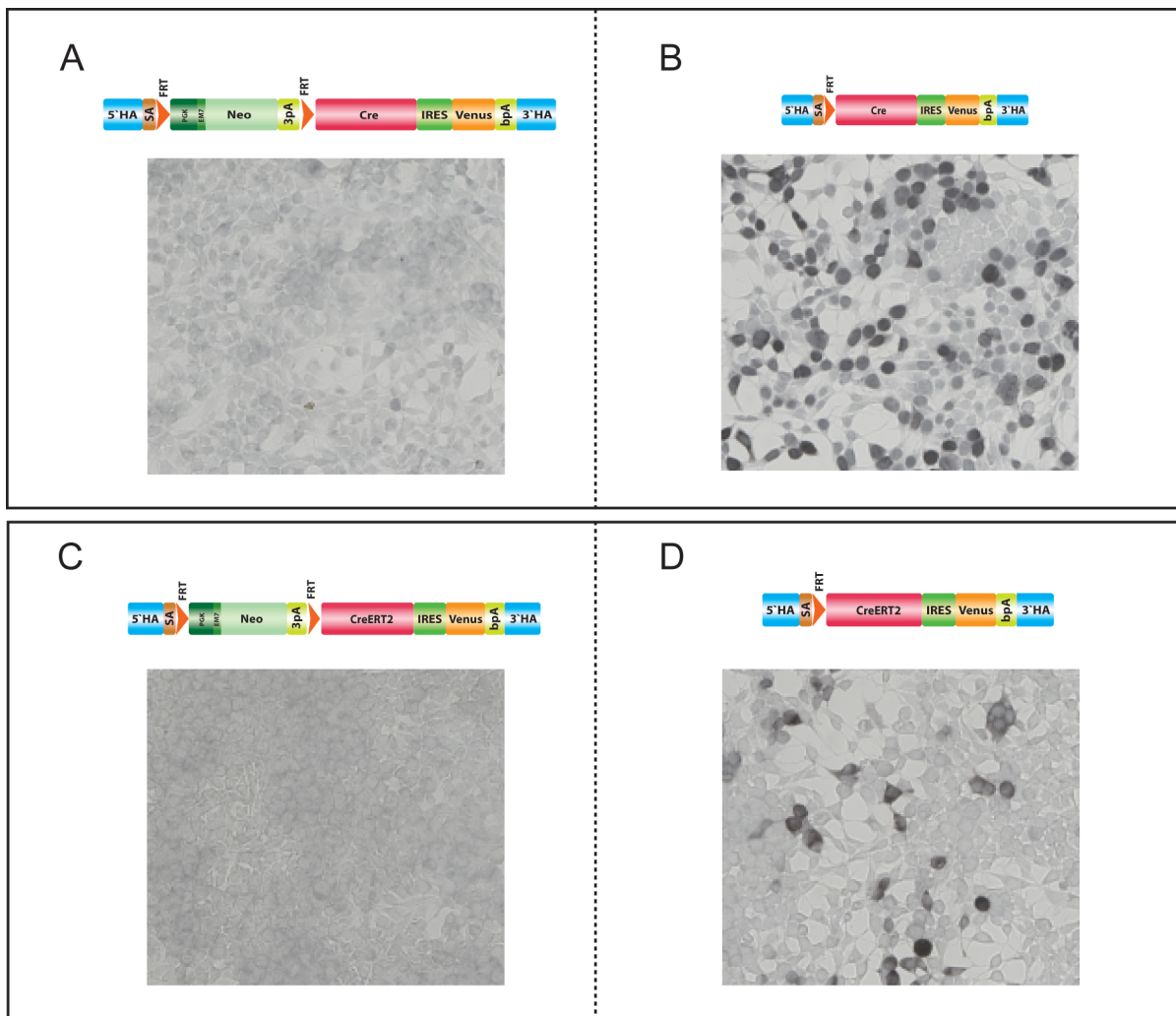


Abbildung 26: Transfektion von HEK293-Zellen mit [pcDNA3.1-Cre] (A) mit und (B) ohne Selektions-/Stopkassette sowie [pcDNA3.1-CreERT2] (C) mit und (D) ohne Selektions-/Stopkassette.

4.2.3.3 Funktionsanalyse der Cre-/CreERT2-Rekombinase

Um zu überprüfen ob die klonierte Cre-/CreERT2-Rekombinase hinsichtlich ihrer enzymatischen Aktivität funktionsfähig ist, wurden Kotransfektionen der Cre-Kassetten mit dem LacZ-Reporterplasmid *pSVpaX1* durchgeführt. Das Reporterplasmid enthält einen P1-Promoter, sowie ein LacZ-Gen, dessen Transkription durch eine loxP-flankierte Stopkassette verhindert wird. Erst die Cre-Rekombinase katalysierte Deletion der Stopkassette ermöglicht die Expression der LacZ-codierten β -Galaktosidase, sowie deren Detektion mittels LacZ-Färbung.

Insgesamt wurden vier verschiedenen Transfektionsansätze durchgeführt:

- Kotransfektion von Cre-Kassette mit Stopkassette und *pSVpaX1*
- Kotransfektion von Cre-Kassette ohne Stopkassette und *pSVpaX1*

- Kotransfektion von CreERT2-Kassette mit Stopkassette und *pSVpaX1*
- Kotransfektion von CreERT2-Kassette ohne Stopkassette und *pSVpaX1*

Um die Funktionalität der CreERT2-Rekombinase feststellen zu können, musste diese während der Transfektion mit Tamoxifen induziert werden. Dazu wurde ca. 24 Stunden nach Transfektion Tamoxifen in einer Endkonzentration von 10 μM zu den HEK293-Zellen pipettiert und die Zellen nach weiteren 24 Stunden untersucht. Detektiert wurde sowohl die LacZ-Färbung als auch die von dem Venus-Reporterprotein emittierte Fluoreszenz. Da die Fluoreszenz von dem X-Gal Farbsignal überlagert wird, mussten die beiden Signale auf verschiedenen HEK293-Zell-Populationen erfasst werden.

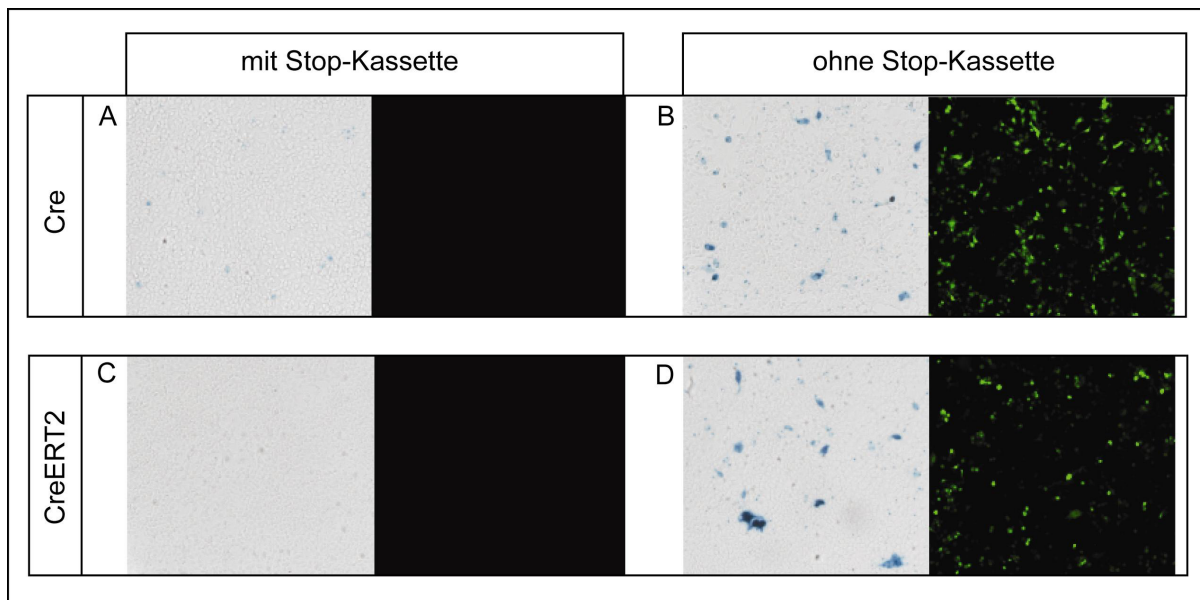


Abbildung 27: Kotransfektion von HEK293-Zellen mit 1. Cre-Kassette inklusive Stopkassette (A) oder ohne Stopkassette (B) und 2. CreERT2-Kassette inklusive Stopkassette (C) und ohne Stopkassette (D). Die jeweiligen Kassetten wurden entweder einzeln transfiziert und die Cre-Expression indirekt über die Fluoreszenz-Emission des Venus-Proteins detektiert (jeweils rechte Bildhälfte) oder mit dem LacZ-Reporter Plasmid *pSVpaX1* kontransfiziert und die Funktionalität der Cre-Rekombinase anschließend anhand der LacZ-Färbung überprüft (jeweils linke Bildhälfte). CreERT2-Aktivität wurde durch Zugabe von Tamoxifen (Endkonzentration: 10 μM) induziert.

Abbildung 27 zeigt die Ergebnisse der Funktionsanalyse. Sowohl mit der Cre-Kassette als auch mit der CreERT2-Kassette (beide ohne Stopkassette) konnten ausreichend HEK-Zellen transfiziert und deren Cre-Expression über die Venus-vermittelte Fluoreszenz sichtbar gemacht werden (Abbildung 27B und D, rechte Bildhälfte). Des Weiteren zeigt sich in einem Teil der HEK-Zellen nach Inkubation mit LacZ-Färbelösung eine deutliche Blaufärbung (Abbildung 27B und D, linke Bildhälfte), was als Zeichen einer erfolgreichen Cre-vermittelten Induktion von *pSVpaX1* gewer-

tet werden kann. Fluoreszenz und Blaufärbung sind nicht zu beobachten, wenn Cre-Kassetten transfiziert wurden, deren Stopkassette noch vorhanden war und die deshalb die Cre-Rekombinase nicht exprimieren konnten (Abbildung 27A, C). Die deutliche geringere Anzahl X-Gal positiver Zellen im Vergleich zu den fluoreszierenden Zellen ist der Tatsache geschuldet, dass HEK293-Zellen für eine positive LacZ-Reaktion zwei Plasmide (*pSVpaXI* und das Cre-tragende Expressionsplasmid *pcDNA3.1*) aufnehmen müssen und die Wahrscheinlichkeit für eine solche Doppeltransfektion geringer ist als die Aufnahme von Cre-*pcDNA3.1* allein.

4.2.3.4 Funktionsanalyse des Spleißens von Exon 1 des CRH Gens an Cre/CreERT2

Da die beim Spleißen stattfindende Prozessierung der prä-mRNA zu reifer mRNA essentiellen Einfluss auf die Expression eines Gens hat (sowohl qualitativ als auch quantitativ) und die Funktionalität eines Proteins mitbestimmt, sollte eruiert werden, ob das Cre-/CreERT2-Konstrukt im späteren transgenen Zustand korrekt an das Exon 1 des CRH Gens gespleißt werden kann. Da der bisher beschriebene, für Transfektionen eingesetzte Expressionsvektor *pcDNA3.1* bis dato nur die Motivfolge [SA-FRT-PGK-EM7-Neo-3pA-FRT-Cre-IRES-Venus-bpA], bzw. [-SA-FRT-PGK-EM7-Neo-3pA-FRT-CreERT2-IRES-Venus-bpA] inseriert hatte, war es zur Untersuchung des Spleißing notwendig, das Exon 1 des CRH Gens inklusive Intron 1 (welches wichtige Erkennungssequenzen für das Spleißosom enthält) zu amplifizieren und an das 5'-Ende der genannten Cre-/CreERT2-Motivfolgen einzufügen. Zu diesem Zweck wurde [CRH-Exon 1 - Intron 1] mit den Primern *CRH Exon 1 fwd* (mit AflII Schnittstelle) und *CRH Exon 1 rev* (mit AscI) amplifiziert und in *pCRII-TOPO* ligiert. Nach der Sequenzierung erfolgte die Ligation von [CRH-Exon 1 - Intron 1] in *pcDNA3.1*-[SA-FRT-PGK-EM7-Neo-3pA-FRT-Cre-IRES-Venus-bpA] und *pcDNA3.1*-[SA-FRT-PGK-EM7-Neo-3pA-FRT-CreERT2-IRES-Venus-bpA] mittels AflII/AscI Verdau. Die Ligation wurde durch einen Kontrollverdau mit EcoRI (Fragmentlänge bei einer erfolgreiche Ligation an die Cre-Kassette: 6400 bp, 2773 bp; Fragmentlänge bei einer erfolgreiche Ligation an die CreERT2-Kassette: 6400 bp, 3708 bp) sowie durch Sequenzierung validiert.

Anschließend erfolgte die Transfektion von HEK293-Zellen mit den wie beschrieben modifizierten Cre-Kassetten (ohne Stopkassette), sowie darauf folgend die Isolierung von RNA aus den mit TRIzol behandelten Zellen. Nach dem Umschreiben der RNA in cDNA mittels RT-PCR wurde die gewonnene cDNA als PCR-Template unter Verwendung der Primer *RK-Cre(2) fwd* und *RT-CRH fwd* eingesetzt.

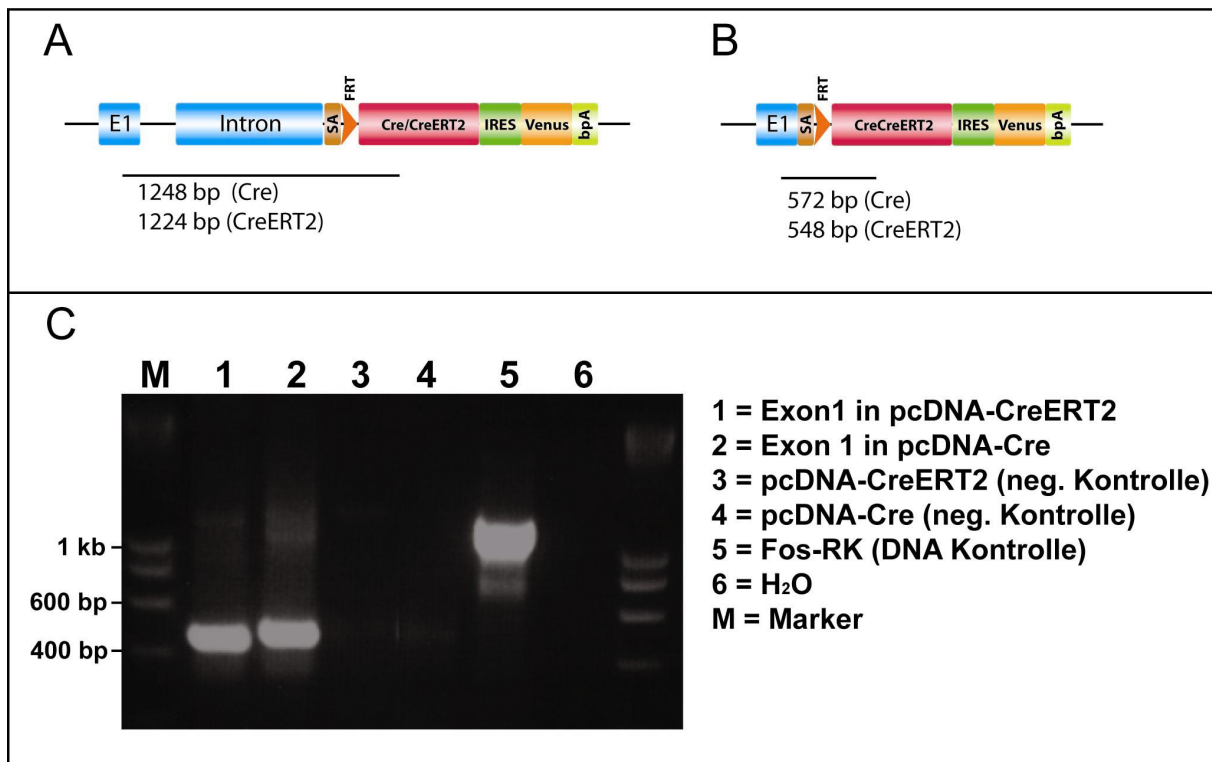


Abbildung 28: Funktionale Analyse des Spleißings per RT-PCR.

Die durch Exon 1 (E1) und Intron 1 ergänzte Cre-/CreERT2-Kassette (A) wurde über den Expressionsvektor *pCDNA3.1* in HEK Zellen transfiziert und die transkribierte RNA isoliert. Nach dem Umschreiben in cDNA konnte so mittels PCR der ungespleißte (A) oder gespleißte (B) Zustand detektiert werden. (C) Ergebnis der auf cDNA durchgeführten PCR (gelelektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte).

Sollte Exon 1 nicht an den Spleiß-Akzeptor der Cre-/CreERT2-Rekombinase gespleißt werden (Abbildung 28A), so erzeugen diese beiden Primer ein Amplifikationsprodukt von 1248 bp (unter Verwendung der Cre-Kassette), bzw. 1224 bp (unter Verwendung der CreERT2-Kassette). Bei korrektem Spleißen (Abbildung 28B) erhält man dagegen PCR-Produkte von 572 bp (Cre) und 548 bp (CreERT2) Länge. Als Negativkontrollen wurden die unmodifizierten Expressionsvektoren ohne Exon 1 Insertion transfiziert. Da zum Zeitpunkt des an dieser Stelle beschriebenen Versuchs die Rekombinationskassetten bereits gegen Exon 2 des Fosmid-Klons WI1-1975E16 ausgetauscht worden waren, wurde die rekombinierte DNA des Fosmid-Klons als DNA Kontrolle eingesetzt (PCR-Produktgröße: 1248 bp).

Die gelelektrophoretische Auftrennung der in den jeweiligen Ansätzen erhaltenen PCR Produkte zeigte abgrenzbare Banden im Bereich deutlich überhalb von 400 bp und unterhalb von 600 bp (Abbildung 28C). Die Bande der Cre-Kassette verlief dabei sichtbar oberhalb der CreERT2-Kassetten Bande. Somit spiegeln beiden PCR-Banden sowohl hinsichtlich ihrer absoluten Länge als auch ihrer Längenrelation untereinander, die Produktgrößen wieder, die bei einem korrekten Spleißen erwartet worden waren.

4.2.4 ET-Klonierung

Der Austausch von Exon 2 des CRH Gens gegen die Rekombinationskassetten mittels ET-Klonierung wurde sowohl für die Cre-Kassette als auch für die CreERT2-Kassette durchgeführt. Da als Zielsequenz der BAC-Klon RPCI24-212D10 und in einem parallelen Ansatz der Fosmid-Klon WI1-1975E16 eingesetzt wurden, ergaben sich nach der homologen Rekombination somit insgesamt vier verschiedene Reaktionsprodukte:

1. Fosmid-Klon mit inserierter Cre-Kassette (Fos-Cre)
2. Fosmid-Klon mit inserierter CreERT2 Kassette (Fos-CreERT2)
3. BAC-Klon mit inserierter Cre-Kassette (BAC-Cre)
4. BAC-Klon mit inserierter CreERT2 Kassette (BAC-CreERT2)

Alle Austauschreaktionen erfolgten dabei für alle vier Produkte nach dem gleichen, in Abbildung 29A für Fos-Cre dargestellten Schema.

Da für die homologe Rekombination linearisierte DNA eingesetzt werden musste, wurden vor der ET-Klonierung die Cre-/CreERT2-Kassette mit den Enzymen SbfI und XmaI (welche sich an den äußeren Flanken des 5', bzw. 3' Homolgiearms befinden) linearisiert, bzw. vom Vektor-Backbone befreit. Rekombinante Bakterienklone wurde in einem ersten Screening mit Hilfe eines „Colony-lifts“, bzw. einer Cre-spezifischen Sonde identifiziert. 5-10 Bakterienkolonien mit positivem Cre-Signal wurden anschließend in einer Colony-PCR auf rekombinationsspezifische Amplifikationsprodukte hin untersucht. Die hierfür eingesetzten Primerpaare binden dabei jeweils unmittelbar „upstream“/„downstream“ vom Insertionslocus und innerhalb der Cre-/CreERT2-Kassette. Folglich kann nur nach einer erfolgreichen Rekombination von beiden Primern ein Produkt gebildet werden. Bei den für die PCR eingesetzten Primerpaaren handelte es sich um die Primer *BAC-3'HA fwd/BAC-3'HA rev2* (PCR 1 in Abbildung 29B), bzw. *BAC-5'HA fwd2/BAC-5'HA rev* (PCR 2 in Abbildung 29B). Die entsprechenden Amplifikationsprodukte der beiden PCRs zeigen dabei nicht nur die Anwesenheit der Rekombinationskassetten und damit die erfolgreiche Insertion derselben an, sondern belegen auch die vollständige Integration des 5'- und 3'-Endes der Kassette. Zusätzlich wurde eine PCR mit Cre-spezifischen Primer für die direkte Detektion der Cre-/CreERT2 Kassette angewendet (PCR 3 in Abbildung 29B), so dass die entsprechenden Klone durch insgesamt drei unabhängige PCRs validiert wurden. Die Cre-/CreERT2-Kassetten von Fosmiden und BACS, deren homologe Rekombination auf diese Weise positiv bestätigt werden konnte, wurden schließlich von beiden Flanken mit den Primern *BAC-3'HA rev2* und *BAC-5'HA fwd2* ansequenziert und auf diese Weise nochmals verifiziert.

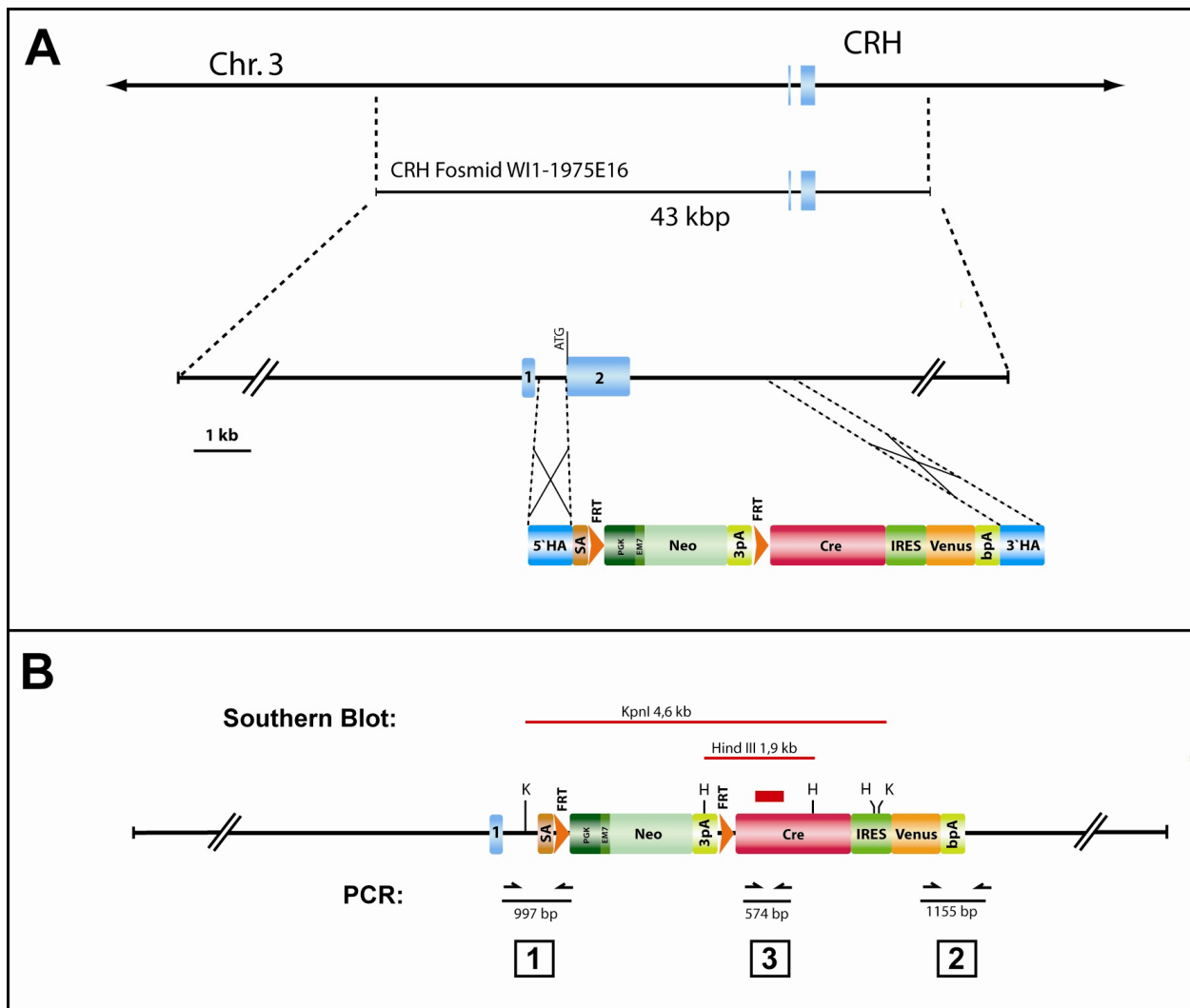


Abbildung 29: (A) Übersichtsdiagramm der im Rahmen der ET-Klonierung durchgeführten homologen Rekombination dargestellt am Beispiel der Insertion der Cre-Kassette in den Fosmid-Klon W11-1975E16. Die Verifizierung der homologen Rekombination (B) erfolgte mittels Southern Blot Hybridisierung (die verwendete Cre-Sonde ist als rotes Rechteck dargestellt, die nach KpnI oder HindIII Verdau detektierten Fragmente als rote Linien) und PCR.

Zu guter Letzt wurden rekombinante Fosmide/BACs, die für die Pronucleus-Injektion oder ES-Zell-Elektroporation ausgesucht wurden, per Southern Blot Hybridisierung auf Anwesenheit der Cre-/CreERT2-Kassette überprüft. Hierzu erfolgte ein Verdau mit dem Enzym HindIII oder KpnI. Mit Hilfe einer radioaktiv markierten Cre-Sonde konnten Kassetten-spezifische Restriktionsfragmente (4,6 kb bei KpnI; 1,9 kb bei HindIII) detektiert und somit die homologe Rekombination abschließend bestätigt werden.

Exemplarisch für die erläuterte Vorgehensweise sind die Ergebnisse der Rekombinationsvalidierung der Cre-Kassette in Fosmid-Klon W11-1975E16 in Abbildung 30 wiedergegeben (die Validierung der übrigen Austauschvarianten sind in Anhang 4 dargestellt). Nachdem im Colony-Lift zwischen 95 % und 100 % der aus der ET-Klonierung hervorgegangenen Bakterienklone eine

positives Cre-Signal zeigten (Abbildung 30A), wurden 5 dieser Klone per PCR analysiert. Alle 5 Klone zeigten auf dem Elektrophoresegelel Fragmentlängen, die mit den erwarteten, rekombinanten Produktlängen (Abbildung 29B) in Einklang gebracht werden konnten (Abbildung 30B). Bei PCR 1 (Abbildung 30B, links) war neben der erwarteten Bande von ca. 1,1 kb jeweils auch immer eine zweite etwas niedriger laufende Bande zu beobachten. Da dieses Nebenprodukt aber auch in allen anderen Verifikations-PCRs auftauchte, ist davon auszugehen, dass einer der beiden verwendeten Primer eine weitere Sequenz im Bereich des Insertionslocus erkennt. Da weder im nicht-rekombinanten Fosmid-Klon (K_1) noch in der auf dem *pCRII-TOPO*-Vektor befindlichen Cre-Kassette (K_2) beide für PCR 1 und PCR 2 benötigten Primer-Bindungsstellen vorhanden sind, konnte innerhalb dieser Kontrollansätze auch keine Amplifikation stattfinden. K_2 enthält jedoch beide Cre-Bindungsstellen, so dass in PCR 3 neben den rekombinanten Fosmiden auch K_2 eine distinkte Cre-Bande aufwies. Fos-Cre Klon Nummer 4 wurde als Kandidat für Pronucleus-Injektion und ES-Zell-Elektroporation ausgewählt und im Southern Blot nochmals überprüft. Sowohl im KpnI Verdau als auch im HindIII-Verdau zeigten sich die erwarteten Signalbanden mit einer Länge von ca. 4,5 kb, bzw. ca. 2 kb (Abbildung 30C).

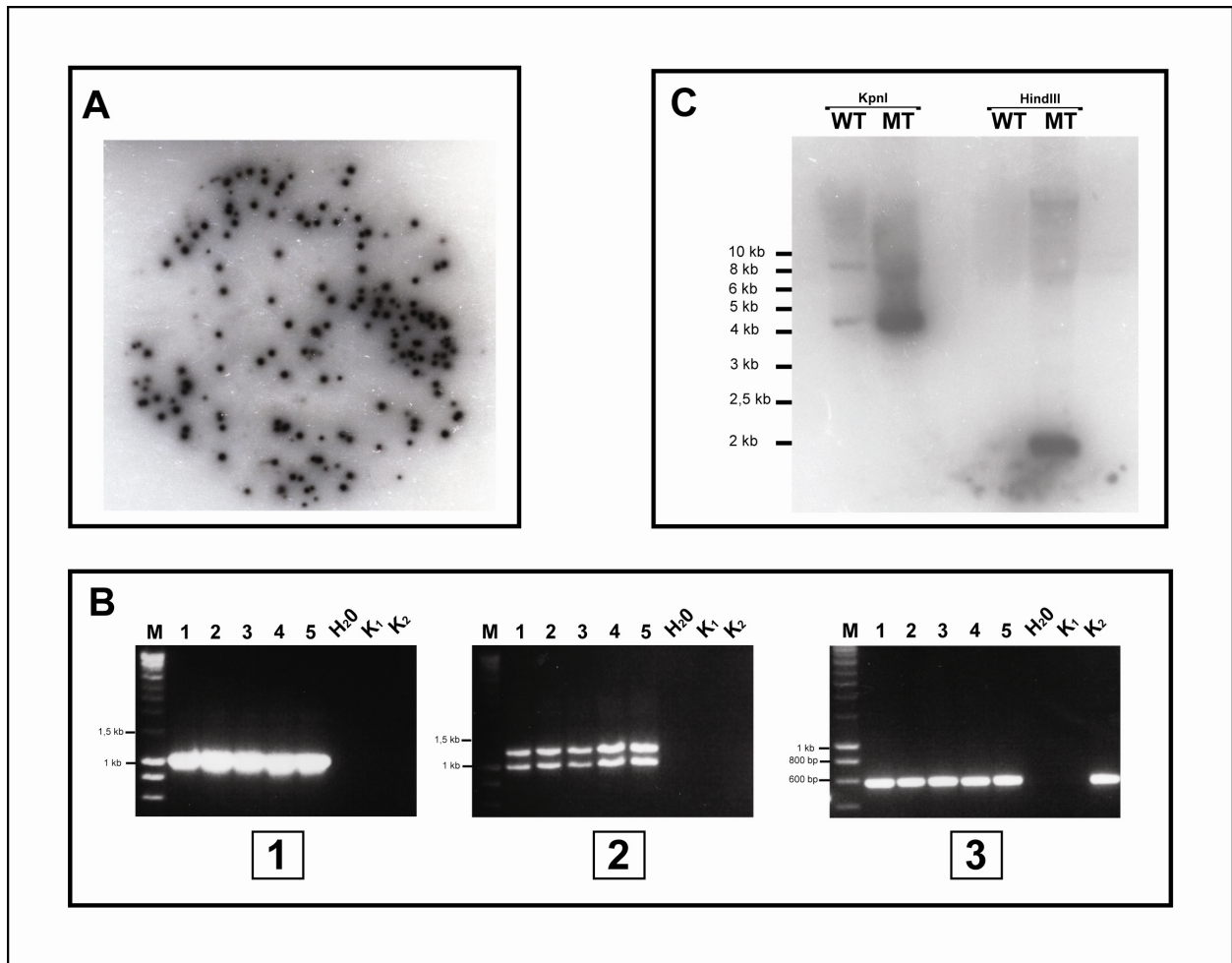


Abbildung 30: Validierung der homologen Rekombination am Beispiel des Fosmid-Klons Fos-Cre.

(A) Spezifische Sondensignale von Bakterienkolonien, die nach der ET-Klonierung per „Colony-Lift“ und Hybridisierung mit einer radioaktiv markierten, spezifischen Cre-Sonde, auf Anwesenheit der Cre-Kassette überprüft wurden. Positive Klone wurden mittels Colony-PCR und Kassetten-spezifischer Amplifikationsprodukte verifiziert (C). Die Nummern unterhalb der Gelfotos beziehen sich auf die in Abbildung 29B dargestellten Primerpaare, die für die jeweilige PCR eingesetzt wurden. M = Marker, 1-5 = Klonnummer, K₁ = nicht-rekombinanter Fosmid-Klon W11-1975E16, K₂ = Cre-Kassette in *pCRII-TOPO*.

Rekombinante Klone wurden auch durch Southern Blot Hybridisierung unter Verwendung einer radioaktiv markierten Cre-Sonde detektiert (B). Es wurden dabei zwei parallele Verdauungen durchgeführt (KpnI und HindIII) und die Sonde sowohl auf rekombinant identifizierten Klonen (MT) als auch auf dem nicht-rekombinanten Ausgangs-Fosmid (WT) hybridisiert.

4.2.5 Entfernung der Selektionskassetten

Um die aus der ET-Klonierung hervorgegangenen Fos-Cre/CreERT2 und BAC-Cre/CreERT2 Transgene für die Pronucleus-Injektion einsetzen zu können, war es von Vorteil, die Selektions-/Stopkassetten aus den jeweiligen Konstrukten zu entfernen, um die Cre-Expression in den zukünftigen Founder-Tieren ohne die Einkreuzung von hACTB-Flpe Mäusen zu ermöglichen. Hierzu wurden die *E. coli* Bakterienkulturen, welche jeweils eines der vier Konstrukte enthielten, mit dem Flp-Expressionsplasmid *706-Flp* transformiert und die Selektions-resistenten Bakterienkolonien per PCR auf die erwünschten Deletionsereignisse hin analysiert. Die hierzu verwendeten Primer sind komplementär zum Spleiß-Akzeptor (*Stop(SA) rev*), zum Neomycin-Gen (*Stop(Neo) fwd*) und zur Cre-Rekombinase (*Stop(Cre) fwd*). Bei Anwesenheit der Selektionskassette amplifizierte das Primerpaar *Stop(Neo) fwd* und *Stop(SA) rev* ein PCR-Produkt von 844 bp Länge. Wurde die Selektionskassette erfolgreich deletiert, so war es dem Primerpaar *Stop(Cre) fwd* und *Stop(SA) rev* möglich ein 1009 bp langes Produkt zu amplifizieren. Positive Deletionsereignisse wurden zusätzlich per Sequenzierung validiert. Somit standen letztendlich insgesamt 8 verschiedene Konstrukt-Varianten für die Generierung von CRH-COE_{Crh} Mäusen zur Verfügung:

Transgen- Bezeichnung	zu Grunde liegender Re- kombinationslocus	Cre-Variante	Selektionskassette
BAC-Cre ^{Neo}	RPCI24-212D10 (BAC)	Cre	vorhanden
BAC-Cre ^{Del}	RPCI24-212D10 (BAC)	Cre	deletiert
Fos-Cre ^{Neo}	WI1-1975E16 (Fosmid)	Cre	vorhanden
Fos-Cre ^{Del}	WI1-1975E16 (Fosmid)	Cre	deletiert
BAC-CreERT2 ^{Neo}	RPCI24-212D10 (BAC)	CreERT2	vorhanden
BAC-CreERT2 ^{Del}	RPCI24-212D10 (BAC)	CreERT2	deletiert
Fos-CreERT2 ^{Neo}	WI1-1975E16 (Fosmid)	CreERT2	vorhanden
Fos-CreERT2 ^{Del}	WI1-1975E16 (Fosmid)	CreERT2	deletiert

Tabelle 1: Übersicht und Charakterisierung der innerhalb der vorliegenden Arbeit hergestellten transgenen Konstrukte.

Im weiteren Verlauf der vorliegenden Arbeit wurden die Pronucleus-Injektionen, sowie die Elektroporationen von ES-Zellen mit den Fosmid-Konstrukten durchgeführt. Grund hierfür war vor allem die unkompliziertere und zeitlich weniger aufwendigere Präparation der Fosmide im Vergleich zu den BACs sowie die Möglichkeit der Vorselektion von geeigneten Integrationsereignissen in ES-Zellen (wie z.B. die Überprüfung der Integrität des inserierten Konstrukts).

4.2.6 Generierung transgener Mäuse mittels Pronucleus-Injektion

Die Pronucleus-Injektionen wurden mit den transgenen Konstrukten Fos-Cre^{Del} und Fos-CreERT2^{Del} an insgesamt 18 Injektionsterminen durchgeführt. Daraus resultierten 7 Tiere, die als Cre-positiv und 1 Tier, das als CreERT2-positiv identifiziert werden konnten. Die Genotypisierung der Tiere erfolgte mit den Primern *Cre-F/Cre-R*, bzw. *CreER2-fwd/CreER2-rev*. Die Cre-Expression in den Tieren wurde mittels In-Situ-Hybridisierung (Cre-Sonde) überprüft. Weder in den Nachkommen der CRH-Cre Founder noch in den Nachkommen der CRH-CreERT2 Founder konnte ein CRH-spezifisches Expressionsmuster festgestellt werden (Daten nicht gezeigt). Stattdessen fanden sich auf den Gehirnschnitten der entsprechenden Mäuse entweder ubiquitäre und somit ektopische Cre mRNA Signale oder es konnten überhaupt keine spezifischen Signale detektiert werden. In Abbildung 31 sind die Ergebnisse der Pronucleus-Injektionen zusammengefasst.

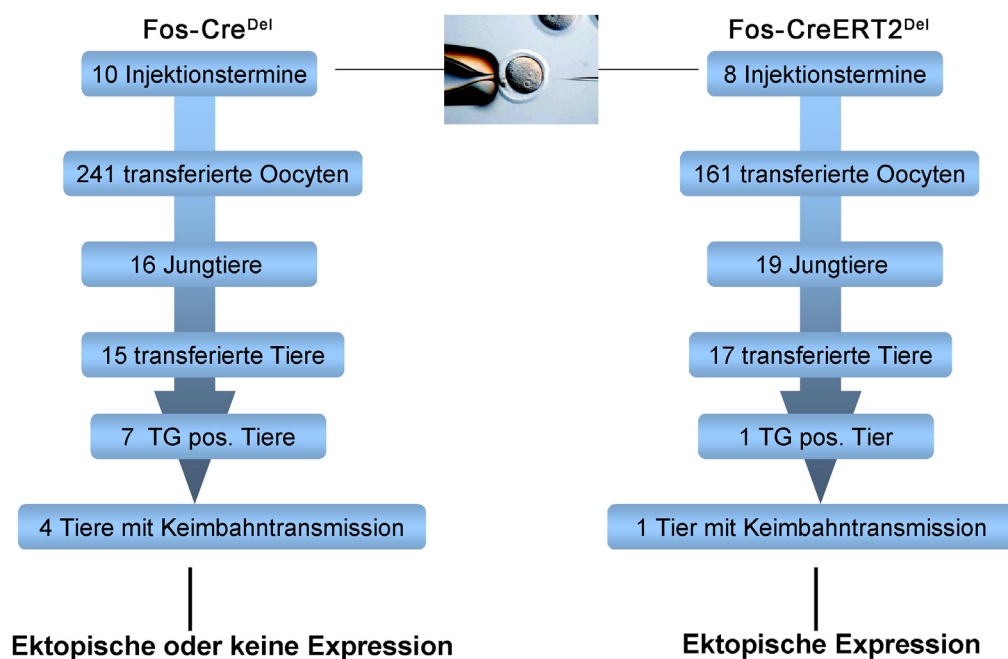


Abbildung 31: Zusammengefasste Ergebnisse der Pronucleus-Injektionen für das Fos-Cre^{Del}- und das Fos-CreERT2^{Del}-Konstrukt.

4.2.7 Generierung transgener Mäuse mittels Blastocysten-Injektion

Für die Herstellung transgener Mäuse über den Weg der ES-Zellmanipulation und anschließenden Blastocysten-Injektion wurden insgesamt zwei zeitlich voneinander getrennte ES-Zellkulturen durchgeführt. Positiv selektionierte ES-Zellklone wurden per Southern Blot Hybridisierung auf eine vollständige Integration des jeweiligen Transgens hin untersucht. Die Anwesenheit des Transgens sowie die vollständige Integration desselben wurde dabei mit Hilfe von drei verschiedenen, radioaktiv markierten Hybridisierungs-Sonden untersucht (Abbildung 31). Die *3'-HA Sonde* erkennt den 3'-Homologiearm des Transgens bindet aber auch an den endogenen CRH-Locus. Nach Verdau mit HindIII befindet sich die Zielsequenz der Sonde im Wildtyp auf einem ca. 15 kb großen Fragment, während das Transgen eine zusätzliche HindIII Schnittstelle einführt und die *3'-HA Sonde* in dieser Konfiguration ein nur ca. 5,5 kb großes Fragment detektiert. Zur Evaluierung des 5'-Bereichs der Cre-Kassette wurde die *CRH-Exon 1 Sonde* benutzt, deren HindIII-verdautes Zielfragment einen Bereich von ca. 7 kb upstream des CRH-Exon 1, sowie die Kassettenelemente SA, PGK, EM7 und Neo umfasst. Das transgene Fragment weist somit eine Länge von ca. 10 kb auf, während die Länge der Wildtypbande (wie im Fall der *3'-HA Sonde*) ca. 15 kb beträgt.

Die *Fos-Sonde 1* wurde eingesetzt, um die vollständige Integration des 5'-Endes des Transgens zu eruieren. Die *Fos-Sonde 1* bindet dabei eine Sequenz, die sich am äußersten 5'-Rand des Transgens befindet. Für den Verdau wurde das Restriktionsenzym NdeI gewählt, da dessen letzte Schnittstelle im 5'-Bereich des Transgens downstream der Sonden-Zielsequenz lokalisiert ist. Die nächste NdeI-Schnittstelle upstream des Sonden-Zielsequenz befindet sich außerhalb des Konstrukts, d.h. nach Integration des Transgens in das Genom der ES-Zellen auf chromosomaler DNA. Die Entfernung dieser Schnittstelle von der transgenen 5'-NdeI Schnittstelle kann deshalb je nach Integrationsort variieren, beträgt aber mindestens 1,6 kb (Abstand: interne NdeI-Schnittstelle/5' Ende des Transgens). Im endogenen CRH Locus erhält man dahingegen eine distinktes 5 kb Fragment, welches von der *Fos-Sonde 1* erkannt wird.

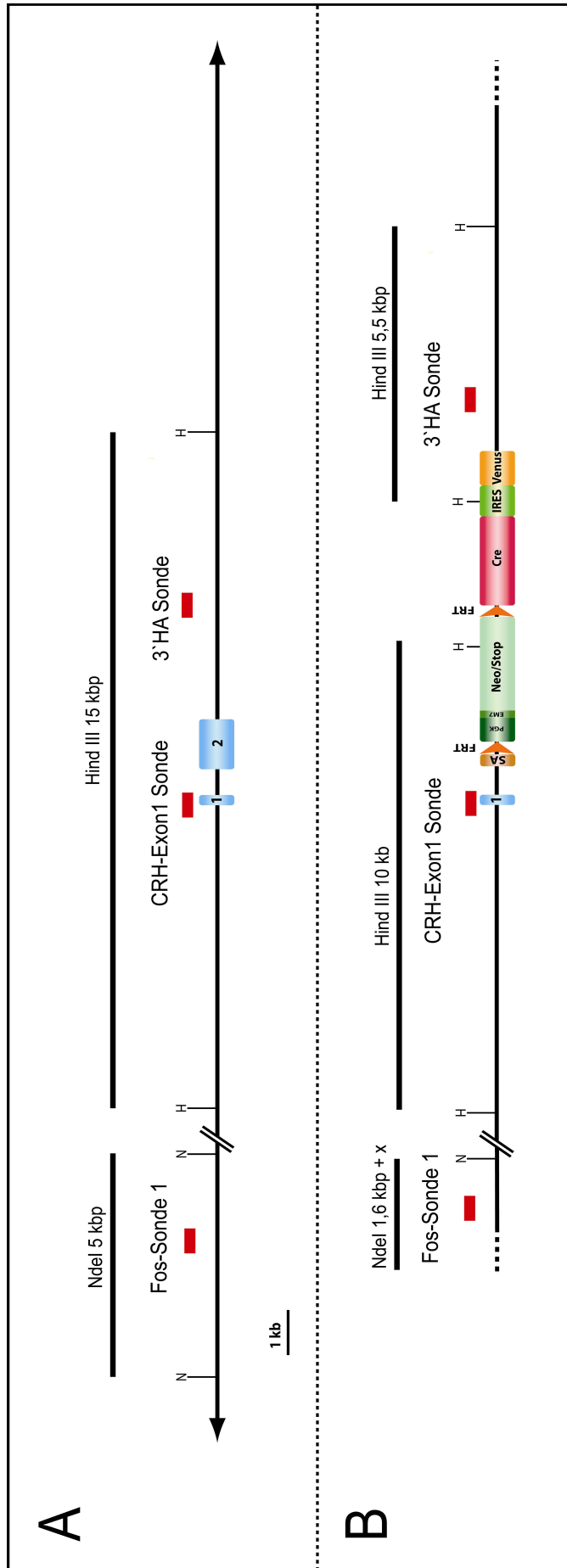


Abbildung 31: Darstellung der Hybridisierungs-Sonden 3'-HA Sonde, Fos-Sonde 1 und CRH-Exon 1 Sonde (rote Rechtecke) und ihrer detektierten Restriktionsfragmente, welche der Erkennung transgener Klone, bzw. der vollständigen Integration des Transgens dienen. (A) Wildtyp Locus mit CRH-Exon 1 und Exon 2. (B) Transgener CRH^{Fos-Cre^{Neo}} Locus mit rekombinierter Cre-Kassette. H = HindIII; N = NdeI.

Im Anschluß an das Screening wurden zwischen 4 und 10 rekombinante Klone für die Blastocysten-Injektion ausgewählt und deren transgener Status vor der Injektion nochmals über Southern Blot Hybridisierung verifiziert. Die Anzahl der Blastocysten-Injektionen hing dabei von der Anzahl der Injektionstermine ab, die vom Helmholtz Zentrum München bereitgestellt wurden. Die aus den Blastocysten-Injektionen hervorgegangenen Chimären wurden schließlich mit hACTB-Flpe Mäusen (Rodriguez et al., 2000) verpaart, um in den Nachkommen eine Deletion der Selektions-/Stopkassette und damit die Expression der Cre-Rekombinase zu ermöglichen. Diese F1 Generation wurde schließlich auf Keimbahntransmission des Transgens sowie hinsichtlich des Cre-Expressionsmusters analysiert (siehe nachfolgendes Kapitel).

Im Rahmen der ersten ES-Zellkultur wurde das Transgen Fos-Cre^{Neo} in ES-Zellen elektroporiert und nach Selektion ca. 200 Klone gepickt. Von diesen 200 Klonen konnte in 25 Klonen das Transgen detektiert werden. 4 Klone wurden schließlich für die Blastocysten-Injektion ausgewählt und im Rahmen von 6 Injektionsterminen injiziert. Aus insgesamt 411 transferierten Blastocysten gingen 86 Jungtiere hervor, von denen wiederum 15 Tiere Fellfarben-Chimärismus zeigten. 9 dieser 15 Tiere wurden aufgrund ihres hohen Chimärismus-Grades mit hACTB-Flpe Mäusen verpaart, doch konnte in keinem der F1-Tiere eine Keimbahntransmission festgestellt werden.

Im Rahmen der zweiten ES-Zellkultur wurde sowohl das Fos-Cre^{Neo} als auch das Fos-CreERT2^{Neo} Transgen elektroporiert. Von beiden Konstrukten wurden nach der Selektion jeweils ca. 80 ES-Zellklone gepickt. 24 Klone zeigten eine vollständige Integration von Fos-Cre^{Neo}, 16 Klone eine vollständige Integration von Fos-CreERT2^{Neo}. Für die Blastocysten-Injektion wurden 6 Klone mit Fos-Cre^{Neo}-Transgen (Klon-Nummer 42, 56, 58, 80, 81 und 85) und 4 Klone mit CreERT2^{Neo}-Transgen (Klon-Nummer 16, 18, 20 und 26) ausgewählt und nochmals per Southern Blot Hybridisierung verifiziert (Abbildung 32).

Im Fall der 3'-HA Sonde sowie der CRH-Exon 1 Sonde zeigte sich bei der elektrophoretischen Auftrennung der radioaktiv markierten Restriktionsfragmente in allen 10 Klonen die erwarteten transgenen Signalbanden von 5,5 kb und 10 kb. Zusätzlich zu diesen Banden konnte auch das Restriktionsfragment des endogenen Locus detektiert werden (15 kb).

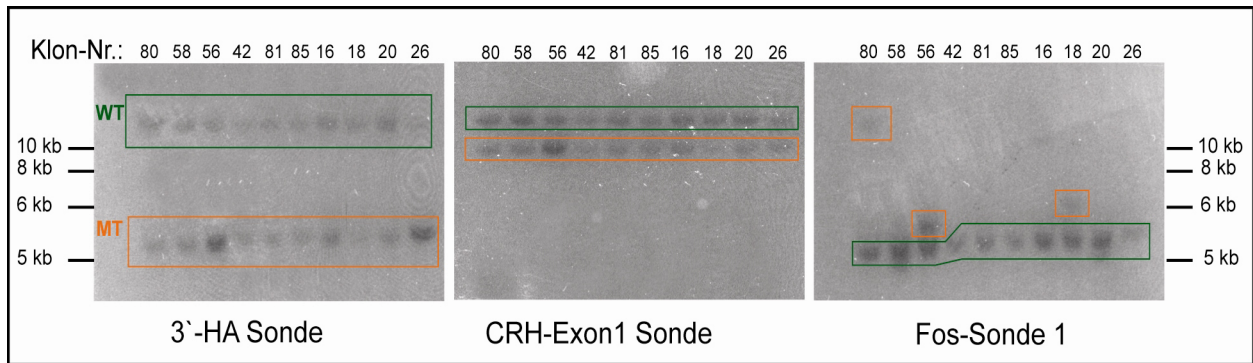


Abbildung 32: Southern Blot Analyse von HindIII, bzw. NdeI verdauter ES-Zell-DNA mit Hilfe der Hybridisierungs-Sonden 3'-HA Sonde, CRH-Exon1 Sonde und Fos-Sonde 1.

Transgene Klone (MT) mit dem zusätzlich modifizierten CRH-Locus konnten anhand der Transgen-spezifischen Restriktionsfragmente identifiziert werden (orange umrahmt). Zusätzlich zum transgenen Locus konnte jeweils auch immer der endogene CRH-Locus (WT) als spezifische Signalbande sichtbar gemacht werden (grün umrahmt). Die etwas ungleichmäßige Lokalisation der endogenen Banden im rechts abgebildeten Gel ist Folge einer ungleichmäßigen Lauffront während der Gelelektrophorese.

Auch bei *Fos-Sonde 1* konnte neben der endogenen 5,2 kb Bande zusätzliche Banden als Hinweis auf eine vollständige Integration des transgenen 5'-Endes identifiziert werden. Diese waren jedoch relativ schwach und nur bei Klon-Nummer 80, 56, 18 relativ deutlich zu erkennen. Bei Klon-Nummer 58 und 20 zeigten sich schwache, Banden-ähnliche Signale unterhalb der endogenen Bande. Bei allen fünf genannten Klone, konnte jeweils nur ein transgenes Fragment erkannt werden, was als Indiz dafür gelten kann, dass sich nur eine Kopie des Transgens in das Genom des jeweiligen Klons inseriert hat, bzw. keine multiplen Insertionen stattgefunden haben. Alle anderen Klone (Nummer 16, 26, 42, 81 und 85) wiesen nur die endogene Bande auf. Ein Grund hierfür könnte sein, dass das Transgen der entsprechenden Klone während der Insertion in das Genom einen Teil des 5'-Endes inklusive der Sonden-Zielsequenz verloren hat.

Die verfügbaren Termine für die Blastocysten-Injektionen wurden vornehmlich für die Injektion mit den Fos- Cre^{Neo}-Klonen verwendet. Die Injektion der CreERT2^{Neo}-Klone konnte erst gegen Ende der vorliegenden Arbeit vorgenommen werden, so dass die Analyse der CreERT2^{Neo}-Chimären nicht mehr in den Ergebnis-Teil aufgenommen werden konnte.

4.2.8 Analyse der Linie CRH-Cre

4.2.8.1 Verpaarung der Fos-Cre^{Neo}-Chimären mit hACTB-Flpe Mäusen

Wie bereits im vorhergehenden Kapitel erwähnt wurden in Rahmen der ES-Zellkultur 6 Fos-Cre^{Neo}-Klone für die Blastocysten-Injektion ausgewählt. In der nachfolgenden Tabelle ist die Ausbeute der Blastocysten-Injektionen zusammengefasst:

Klon-Nummer:	42	56	58	80	81	85
Anzahl der transferierten Blastocysten:	37	86	50	114	34	40
Anzahl der erhaltenen Nachkommen:	10	16	9	10	2	7
Anzahl der erhaltenen Chimären:	4	12	3	4	1	4

Die Chimären wurden schließlich mit hACTB-Flpe Mäusen (Rodriguez et al., 2000) verpaart. Damit sollte zum einen die Selektions-/Stopkassette aus dem Fos-Cre^{Neo}-Transgen entfernt und somit die CRH-spezifische Expression in den Nachkommen ermöglicht werden. Zum anderen konnte anhand dieser Nachkommen festgestellt werden, welche Chimären das Transgen über ihre Keimbahn weitergegeben hatten.

Zur Genotypisierung der F1 Generation wurden die Primer *BAC 3'HA rev*, *RK-Cre(3) fwd* und *RK-PGK fwd* eingesetzt. *BAC 3'HA rev* bindet dabei am Sense-Strang von Intron 1 des CRH Gens, *RK-PGK fwd* am Sense-Strang innerhalb des PGK Promotors (und damit innerhalb der Selektionskassette) und *RK-Cre(3) fwd* bindet in Antisense-Richtung innerhalb der Cre-Rekombinase. Bei Anwesenheit der Selektionskassette kann das Primerpaar *BAC 3'HA rev/RK-PGK fwd* ein PCR-Produkt von 680 bp amplifizieren. Wurde die Selektionskassette deletiert so erhält man mit den Primerpaar *BAC 3'HA rev/RK-Cre(3) fwd* ein Produkt von 1053 bp Länge.

Innerhalb der 6 verschiedenen Linien (siehe Tabelle oben) konnte auf diese Weise nur bei den von ES-Zellklon Nummer 42, 80 und 81 abstammenden F1-Tieren eine Keimbahntransmission festgestellt werden.

4.2.8.2 Expressionsanalyse der CRH-Cre Mäuse

Die Cre-Expression wurde in den Transgen-positiven Nachkommen mittels In-Situ-Hybridisierung unter Verwendung der Cre- und CRH-Sonde untersucht. Das Cre-Expressionsmuster der von Klon 42 und Klon 81 abstammenden Tiere war jedoch entweder nicht detektierbar oder zeigte ein völlig unspezifisches Muster (Daten nicht gezeigt).

Bei den Tieren, die von Klon 80 abstammten konnte schließlich ein spezifisches, distinktes Cre mRNA Signal erkannt werden. Ein Vergleich mit dem durch Hybridisierung mit der CRH-Sonde erzeugten endogenen CRH-Signalmuster zeigte aber, dass die Cre-Expression der transgenen Mäuse von dem erwünschten CRH-Muster abweicht (Abbildung 33). So fand sich zwar zwischen CRH mRNA und Cre mRNA eine übereinstimmende Expression im Cortex, doch sind die typischen CRH-exprimierenden Loci wie PVN, zentrale Amygdala und BNST in den transgenen Tieren nicht zu erkennen, auch wenn natürlich berücksichtigt werden muss, dass Cre im hemizygoten Zustand vorliegt, während CRH von zwei Allelen aus transkribiert wird. Um so auffälliger ist deshalb auch die relativ starke Cre-Expression im Cortex, die in ihrer Intensität die cortikale CRH-Expression deutlich übertrifft.

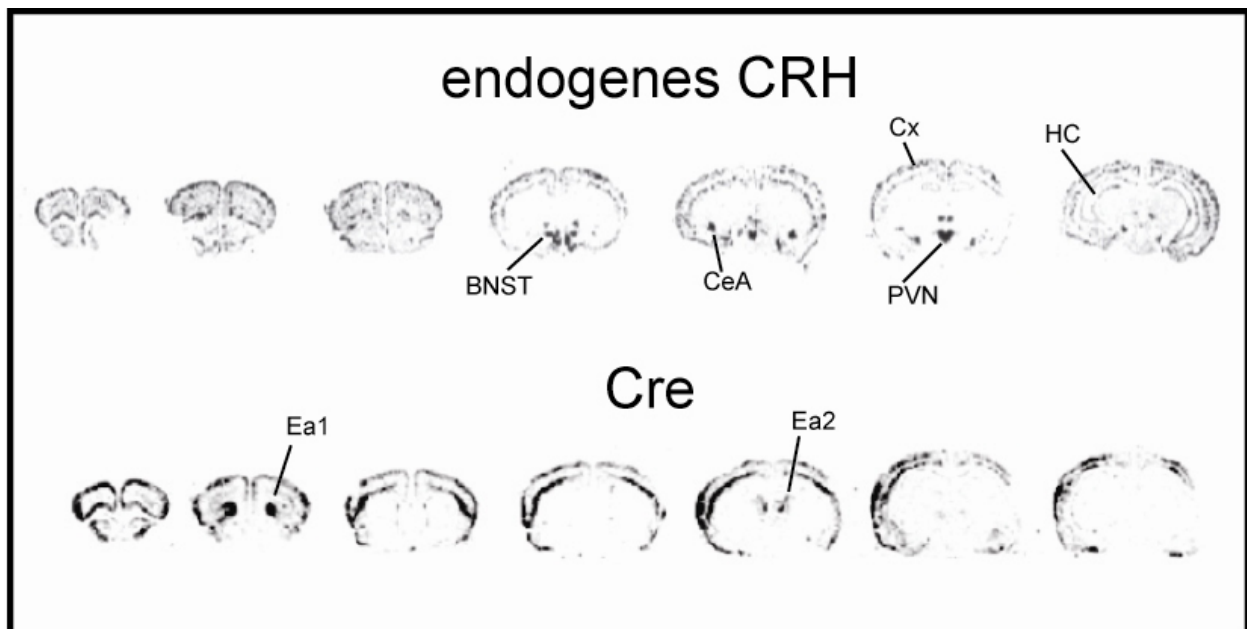


Abbildung 33: Expressionsmuster von CRH mRNA und Cre mRNA auf Coronalen Schnitten eines transgenen CRH-Cre Tieres.

Abkürzungen: CeA, zentrale Amygdala; Cx, Cortex; BNST, Bettkern der Stria terminalis; Ea1, Expressionsareal, welches vermutlich den Strukturen des Septums/Putamens zugeordnet werden kann; Ea2, Expressionsareal, welches vermutlich dem Bereich der thalamischen Nuclei zugeordnet werden kann; HC, Hippocampus; PVN, Nucleus paraventricularis;

Umgekehrt konnten auf den Coronalen Schnitten der CRH-Cre Tiere Bereiche erhöhter Cre-Expression detektiert werden, die keinerlei Entsprechung innerhalb des endogenen CRH-Musters finden. Dabei handelt es sich zum einen um ein paariges Expressionsareal im rostroventralen Bereich des Gehirns, welches hinsichtlich seiner anatomischen Lage den Strukturen des Septums oder Putamens zugeordnet werden könnte (Abbildung 33, als Ea1 bezeichnet). Der andere Be-

reich, ebenfalls paarig angeordnet, könnte bezüglich seiner Lage dagegen dem anatomischen Komplex der thalamischen Nuclei zugerechnet werden (Abbildung 33, als Ea2 bezeichnet).

4.2.8.3 Analyse der Cre-Rekombinase Aktivität mittels LacZ-Färbung

Wie schon im Fall der CRH-COE_{Dlx} Linie wurden CRH-Cre Mäuse mit ROSA26 Reportermäusen verpaart, um die aus dieser Kreuzung hervorgehenden Nachkommen (R26^{+LacZ}CRH-Cre) mit Hilfe der LacZ-Färbung hinsichtlich ihres Cre-Expressionsmusters zu untersuchen. Die Ergebnisse der LacZ-gestützten Expressionsanalyse sind in Abbildung 34 dargestellt.

Neben den spezifischen Expressions-Bereichen, die bereits mit Hilfe der In-Situ-Hybridisierung sichtbar gemacht werden konnten, wie Cortex, Thalamus, basolaterale Amygdala und Hippocampus, konnten auch anatomische Strukturen der lateralen Amygdala, des Bulbus olfactorius (anteriorer Bulbus olfactorius und Area piriformis), des Nucleus vestibularis, Nucleus mammillaris, der Faserbündel des Corpus callosum und der Medulla als Regionen abgegrenzter Cre-Rekombinase Aktivität identifiziert werden. Die Identifizierung der genannten Strukturen stützt sich dabei auf den morphologischen Vergleich mit dem *Allen Mouse Brain Atlas* (<http://mouse.brain-map.org>) und dem anatomischen Atlas von Keith und Paxinos (Keith and Paxinos, 1997). Daneben konnte eine Vielzahl einzelner LacZ gefärbter Zellen in der Region des Cerebellums, des Mittelhirns, des Pons, des Hypothalamus und des Thalamus beobachtet werden. Die im cerebralen Cortex schichtförmig angeordneten Signale, lassen bezüglich der Lokalisation die Vermutung zu, dass es sich um Zellen der Cortexschicht II, III und VI handeln könnte. Im Cerebellum finden sich die LacZ-positiven Zellen saumartig um die graue Substanz des arbor vitae angeordnet. Ihre relativ kleine und körnige Morphologie, verbunden mit der dicht gepackten Anordnung der Zellkörper läßt vermuten, dass es sich um Zellen der Körnerschicht handelt.

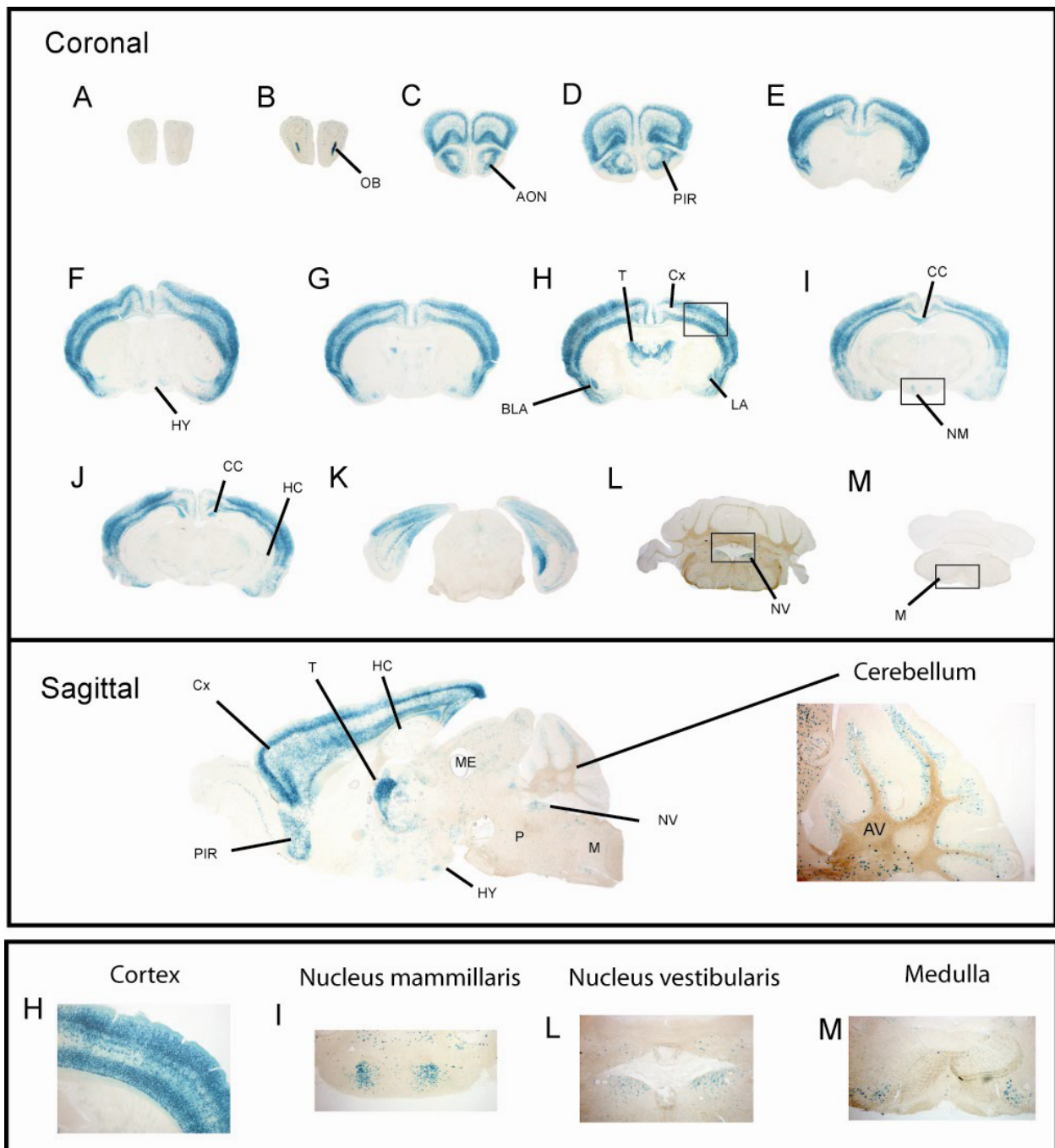


Abbildung 34: LacZ-Färbung auf Coronal- und Sagittalschnitten eines $R26^{+/LacZ}CRH-Cre$ Tieres.

Die Buchstaben-Bezeichnungen der unteren Detailaufnahmen beziehen sich auf die entsprechenden Übersichtsaufnahmen der Coronal-schnitte. Der Ausschnittsbereich der Detailaufnahmen ist durch Umrandung der entsprechenden Strukturen in der Übersichtsaufnahme gekennzeichnet.

Abkürzungen: AON, Nucleus olfactorius anterior; AV, Arbor vitae; Cb, Cerebellum; CC, Corpus callosum; Cx, Cortex; BLA, basolaterale Amygdala; HC, Hippocampus; HY, Hypothalamus; LA, laterale Amygdala; M, Medulla; ME, Mesencephalon; NM, Nucleus mammillaris; NV, Nucleus vestibularis; OB, Bulbus olfactorius; P, Pons; PIR, Area piriformis; Thalamus.

Neben dem Gehirn wurden auch die peripheren Organe einer auf LacZ-Färbung basierenden Expressionsanalyse unterzogen. Hierbei zeigte sich (neben den bekanntermaßen unspezifischen Hintergrund-Färbungen des Magens, des Darms und des Pankreas) in männlichen Tieren eine markante Blaufärbung der Hoden. Zwar beobachtet man bei Kontrolltieren ebenfalls eine leichte Blaufärbung im Bereich der Hoden, doch erstreckte sich diese im vorliegenden Fall nur auf das Gewebe der Nebenhoden (welches bekanntermaßen eine endogene β -Gal Aktivität besitzt). R26^{+/LacZ}CRH-Cre Männchen wiesen dahingegen eine deutlich intensivere Blaufärbung sowohl der Nebenhoden als auch der Hoden selbst auf. Zur Validierung dieser Beobachtung und um unspezifische Effekte ausschließen zu können wurden die Hoden daher einer fokussierteren Untersuchung unterzogen (siehe nächstes Kapitel).

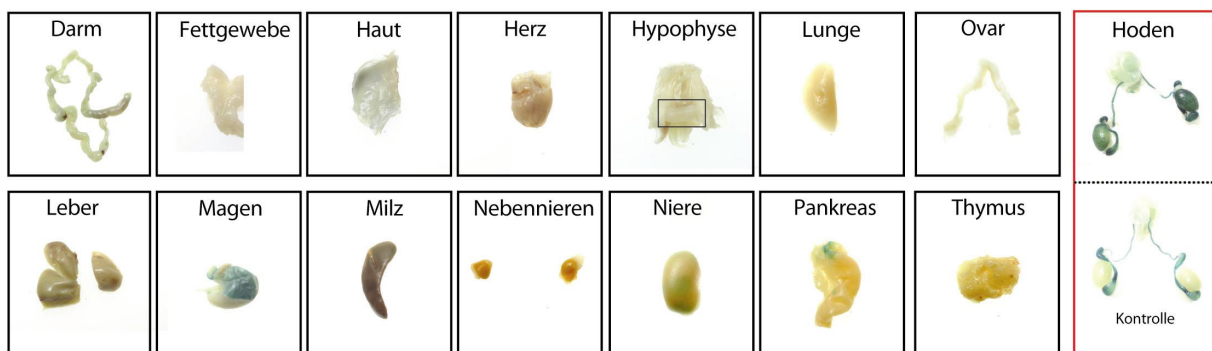


Abbildung 35: LacZ-Färbung der peripheren Organe von R26^{+/LacZ}CRH-Cre Tieren.

Die rote umrandeten Teilabbildungen zeigen die spezifische LacZ-Färbung der Hoden eines R26^{+/LacZ}CRH-Cre Männchens (oben), sowie die unspezifische Färbung des korrespondierenden Kontrolltieres (unten). Die Hypophyse wurde zusammen mit dem umgebenden Knochengewebe der Sella turcica herauspräpariert und ist deshalb durch die rechteckige Umrandung hervorgehoben. Die entsprechenden Organe eines Kontrolltieres zeigten keine spezifische LacZ-Färbung (Daten nicht gezeigt). Die Größenrelationen der Organe sind nicht maßstabsgerecht dargestellt.

4.2.8.4 Fokussierte Analyse des Hodengewebes

Um die festgestellte spezifische LacZ-Färbung, bzw. Cre-Expression auf Hoden-Vollgewebspräparaten von R26^{+/LacZ}CRH-Cre Männchen zu verifizieren, wurden transversale 40 μ m Kryoschnitte des Hodens von CRH-Cre Männchen angefertigt und diese auf dreierlei Weise untersucht. Erstens wurde die vom Venus-Reporterprotein vermittelte Eigenfluoreszenz der transgenen Tiere aufgenommen und mit Hodenschnitten von Kontrolltieren verglichen. Zweitens wurde das Venus-Protein mit Hilfe eines GFP Antikörpers detektiert (da Venus ein Derivat des GFP-Proteins ist, kann es prinzipiell von einem GFP Antikörper detektiert werden). Und drittens wurde eine LacZ-Färbung auf Hoden-Kryoschnitten von R26^{+/LacZ}CRH-Cre Männchen durchgeführt.

Sowohl hinsichtlich der Venus-Eigenfluoreszenz als auch der GFP Antikörper-vermittelten Fluoreszenz zeigte sich ein deutlicher Unterschied zwischen CRH-Cre Männchen und Cre-negativen

Kontrollmännchen. (Abbildung 36). Dabei war die Intensität der beobachteten spezifischen Fluoreszenz in CRH-Cre Tieren in beiden Fällen von schwacher bis mäßiger Ausprägung. Deutlicher zeigt sich der Unterschied im Fall der LacZ-Färbung (Abbildung 37). Während im histologischen Schnitt von Kontrolltieren nahezu keine Blaufärbung festgestellt werden konnte (Abbildung 37A), stellten sich innerhalb des Hodengewebes von $R26^{+/LacZ}$ CRH-Cre Männchen Bereiche mit einer intensiven, räumlich abgegrenzten Blaufärbung dar (Abbildung 37B). Die angefärbten Strukturen befinden sich dabei im zentralen Bereich ovaler Segmente, die in ihrer Gesamtheit die Fläche des Transversalschnittes bilden. Einige dieser Segmente weisen in ihrem Zentrum schmale, spaltenförmige Lumen auf, wobei es sich wahrscheinlich um die einzelnen Samenkanälchen (Tubuli seminiferi) handelt. Demnach ließen sich die durch X-Gal blaufärbten Bereiche als das Keimepithel des Hodens (Ort der Spermatogenese) identifizieren. Aufgrund der Tatsache, dass Keimzellen innerhalb des Keimepithels mengenmäßig die am häufigsten vertretene Zellpopulation darstellen und die Intensität der beobachteten Blaufärbung auf einen dicht-gepackten Zelltypus hinweist, handelt es sich bei den LacZ-positiven Zellen höchstwahrscheinlich um Keimzellen (Spermatogonien, Spermatozyten, Spermatiden, Spermien). Es kann aber nicht ausgeschlossen werden, dass auch andere Zellen des Keimepithels (Epithelzellen, Sertoli-Zellen) mit involviert sind.

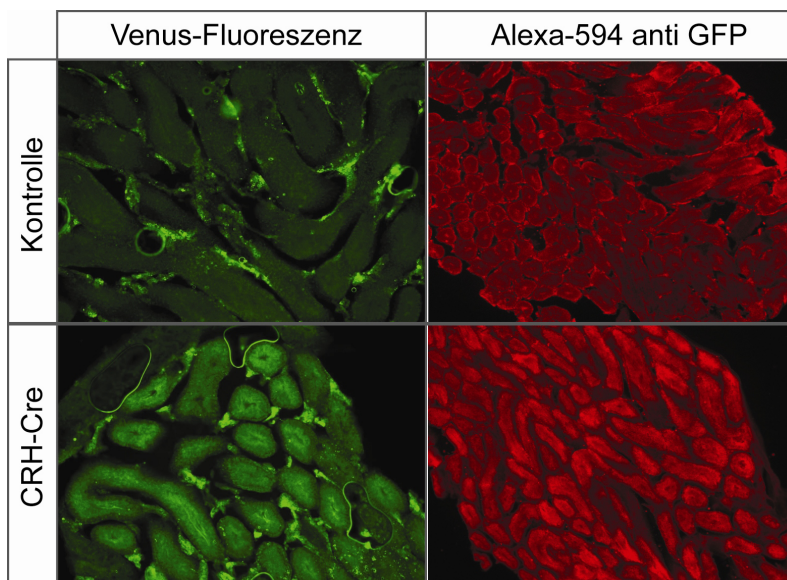


Abbildung 36: Transversale Kryoschnitte auf Hodengewebe von CRH-Cre Männchen und Kontrolltieren.

Detektiert wurde sowohl die Eigenfluoreszenz des Venus-Reporter Proteins als auch die durch den GFP Antikörper vermittelte Rotfluoreszenz. 5-fache Vergrößerung.

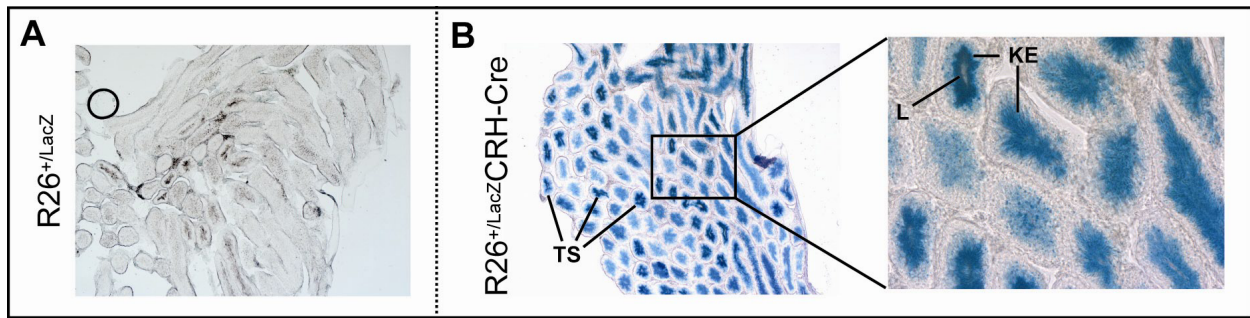


Abbildung 37: LacZ-Färbung auf transversalen Kryoschnitten eines (A) Kontrolltieres und (B) eines $R26^{+/LacZ}$ CRH-Cre Männchens in 5-facher und 40-facher Vergrößerung.

Abkürzungen: KE, Keimepithel; L, Lumen; TS Tubulus seminiferus;

4.2.8.5 Funktionale Analyse der CRH-Cre Mauslinie mit Hilfe der Mauslinie $Crhr1^{loxP-GFP}$

Die mit Hilfe von In-Situ-Hybridisierung und LacZ-Färbung erzielten Darstellungen des transgenen Expressionsmusters deuteten darauf hin, dass die Cre-Rekombinase nicht, wie angestrebt, CRH-spezifisch, sondern ektopisch transkribiert wird. Um diesen Befund nicht nur durch generelle Transkriptionsprofil-Unterschiede, sondern auch auf zellulärer Ebene überprüfen zu können, wurden die Möglichkeiten der am Max-Planck Institut für Psychiatrie (München) generierten Mauslinie $Crhr1^{loxP-GFP}$ genutzt. Diese Linie ist durch einen modifizierten CRH-R1 charakterisiert, dessen CRH-R1 Exon 2 Sequenz mit der Sequenz für GFP verknüpft und von zwei loxP Motiven flankiert ist. Im Normalzustand exprimieren $Crhr1^{loxP-GFP}$ Mäuse ein funktionelles CRH-R1-GFP Fusionsprotein, während die Anwesenheit der Cre-Rekombinase zur Deletion von Exon 2 und einem daraus resultierenden Translationsabbruch führt. Letztendlich führt die Cre-induzierte Deletion von Exon 2 also zu einem CRH-R1 „Knock-out“ in den entsprechenden Tieren. Ausschlaggebend für die beabsichtigte Verwendung der $Crhr1^{loxP-GFP}$ Tiere, war die Tatsache, dass CRH-R1 im cerebralen Cortex überwiegend in glutamatergen Prinzipalneuronen exprimiert wird, während die CRH-Expression sich auf die GABA-ergen Interneuronen des Cortex begrenzt (Swanson et al., 1983). Durch eine Verpaarung von CRH-Cre Mäusen und homozygoten $Crhr1^{loxP-GFP}$ Mäusen ($Crhr1^{loxP-GFP/loxP-GFP}$) sollten nun Nachkommen generiert werden, welche Cre-positiv und heterozygot für das $Crhr1^{loxP-GFP}$ Allel sind ($Crhr1^{+/loxP-GFP}$ CRH-Cre). Falls die Spezifität der Cre-Expression im Vorderhirn dieser Tiere tatsächlich CRH-spezifisch wäre, dürfte die Cre-Rekombinase in den glutamatergen, CRH-R1 transkribierenden Neuronen nicht exprimiert werden und somit CRH-R1 Exon 2-GFP nicht deletiert werden. Bei einer ektopischen Expression von CRH in glutamatergen Prinzipalneuronen, sollte ein „Knock-out“ des GFP-markierten Rezeptors stattfinden. Um diese beiden Möglichkeiten detektieren zu können wurde eine radioaktiv markierte Hybridisierungs-Sonde gegen GFP eingesetzt und die Signalstärke der

Sonde auf den Kryoschnitten eines $Crhr1^{+/loxP-GFP}$ CRH-Cre Tieres mit denen eines $Crhr1^{loxP-GFP/loxP-GFP}$ Tieres verglichen, bzw. quantifiziert. Es zeigte sich, dass das GFP-Signal in dem $Crhr1^{+/loxP-GFP}$ CRH-Cre Tier im Vergleich zu einem $Crhr1^{loxP-GFP/loxP-GFP}$ Kontrolltier reduziert war und die festgestellte Signalreduktion sich auf alle corticalen Schichten erstreckte (Abbildung 38A). Gleichzeitig bleibt ein GFP-Restsignal in der $Crhr1^{+/loxP-GFP}$ CRH-Cre Maus weiterhin deutlich zu erkennen, so dass nur von einem partiellen CRH-R1 „Knock-out“ gesprochen werden kann. Wenngleich Cre im Vorhirn also ektopisch, d.h. nicht CRH-spezifisch exprimiert wird, so scheint die ektopische Expression, bezogen auf die CRH-R1 Expression, unvollständig zu sein. Die Quantifizierung des beobachteten Unterschiedes erfolgte durch die Messung der Signalstärken im Bereich des gesamten Cortex der beiden Genotypen. Die Messungen ergaben dabei eine hochsignifikante Reduktion des GFP-Signals in $Crhr1^{+/loxP-GFP}$ CRH-Cre Tieren im Vergleich zu $Crhr1^{loxP-GFP/loxP-GFP}$ Kontrolltieren ($P < 0,001$).

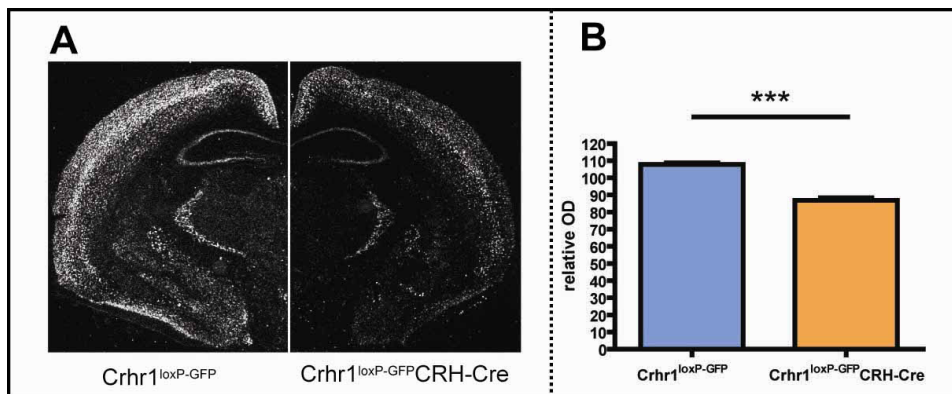


Abbildung 38: (A) Expressionsmuster von CRH-R1 mRNA auf Kryoschnitten eines $Crhr1^{loxP-GFP/loxP-GFP}$ Tieres und eines $Crhr1^{+/loxP-GFP}$ CRH-Cre Tieres nach Hybridisierung mit einer GFP-Sonde. (B) Quantifizierung der jeweiligen corticalen GFP-Signale.

4.2.8.6 Untersuchung der Cre-Expression in Embryonen

Um zu eruieren, ob und wenn ja wann die Cre-Rekombinase bereits während der Embryogenese exprimiert wird, wurden die Embryonen aus CRH-Cre \times ROSA26 Verpaarungen am Tag 13 nach der Verpaarung fixiert und als Ganzkörperpräparate einer LacZ-Färbung unterzogen. Nach Dokumentation der Ergebnisse wurden die Embryos mittels PCR genotypisiert und die Anwesenheit der Cre-Rekombinase mit dem Primerpaar *Cre-F/Cre-R* festgestellt. Insgesamt wurden 16 Embryonen auf diese Weise analysiert, doch konnte bei keinem der $R26^{+/LacZ}$ CRH-Cre Tiere eine Blaufärbung detektiert werden. Beispielhaft ist dies anhand zweier Embryonen (mit den

Genotypen $R26^{+/LacZ}$, bzw. $R26^{+/LacZ}CRH-Cre$ in Abbildung 39 dargestellt. Eine Expression des Cre-Transgens scheint somit nicht vor Tag 13 der Embryonalentwicklung stattzufinden.

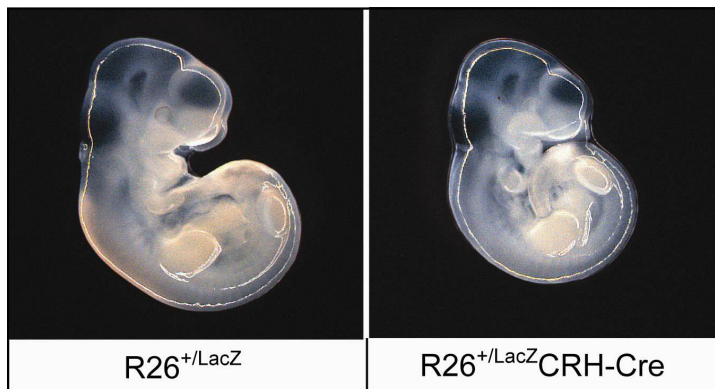


Abbildung 39: LacZ-Färbung auf einem 11-12 Tage alten CRH- $R26^{+/LacZ}CRH-Cre$ Embryo, bzw. einem $R26^{+/LacZ}$ Kontrollembryo.

4.2.8.7 Lokalisierung der Insertion des CRH-Cre Transgens

Da die in den vorhergehenden Kapiteln beschriebene Cre-Expression der CRH-Cre Mäuse wider Erwarten keine CRH-Spezifität aufwies, stellte sich die Frage, ob die beobachtete ektopische Expression eventuell auf einen Positionseffekt der transgenen Insertion (Wilson et al., 1990; Clark et al., 1994; Rulicke and Hubscher, 2000) oder auf aberrantes Spleißen an upstream gelegene Exons zurückzuführen ist. Zu diesem Zweck musste geklärt werden, an welcher Stelle des murinen Genoms sich das CRH-Cre Transgen inseriert hatte. Anschließend sollten die benachbarten annotierten Gene hinsichtlich ihres Expressionsmusters untersucht werden und dieses mit dem beobachteten Expressionsmuster der Cre-Rekombinase verglichen werden.

Die Identifizierung des transgenen Insertionsortes erfolgte mit Hilfe der Splinkerette-PCR (Horn et al., 2007). Die DNA eines Cre-positiven CRH-Cre Tieres (sowie als Kontrolle die DNA eines Cre-negativen Tieres der Linie CRH-Cre) wurden hierfür mit dem Restriktionsenzym ApoI verdaut. Der an die Restriktionsfragmente zu ligierende Adapter wurde aus den synthetisierten Oligonukleotiden *SPLK-A* und *SPLK-B* hybridisiert. Die erste PCR-Runde wurde mit dem Primerpaar 5'*SPLK fwd1*/5'*SPLK rev1*, die zweite PCR-Runde mit dem Primerpaar 5'*SPLK fwd2*/5'*SPLK rev2* durchgeführt. Für die Sequenzierung des finalen PCR Produkts wurde der Primer 5'*SPLK rev3* eingesetzt. Mittels dieser Methode konnte aus der genomischen DNA eines transgenen Tiere ein zwischen 200 und 300 bp großes PCR Produkt amplifiziert werden (Abbildung 40A). Der Kontrollansatz erbrachte ebenfalls ein PCR Produkt, doch war dieses größer (ca. 500 bp) und von geringerer Signalintensität. Dies könnte darauf hindeuten, dass die verwendeten 5'*SPLK* Primer zu einem gewissen Grad unspezifisch binden und daher auch auf nicht-transgener DNA Amplifikationsprodukte bilden. Die aus dem transgenen CRH-Cre Tier

stammende Bande wurde geextrahiert und sequenziert. Neben den bekannten Sequenzen des SPLK Adaptors und des 5'-Fos-Cre^{Del}-Endes konnten anhand der Sequenzierungsergebnisse auch zwei Fragmentabschnitte (73 bp, bzw. 29 bp lang) ausgemacht werden, die genomischer Herkunft sein mussten (Abbildung 40B). Diese beiden „eingefangenen“ Sequenzen wurden schließlich mit der Online-Genomdatenbank *Ensembl* (<http://www.ensembl.org>) gegen genomische Maus-DNA abgeglichen. Für die 73 bp lange Sequenz wurde ein Treffer innerhalb des langen Arms von Chromosom 8 (Position 15,376,263 bis 15,380,329) erzielt (Abbildung 40C). Die Expressionsmuster der nächsten benachbarten Gene (*Arhgef10*, *Cln8*, *Csmd1*, *Myom2*, *BB014433*, *Ktbd11*, *2900016B01Rik*) wurden mittels *Allen Mouse Brain Atlas* (<http://mouse.brain-map.org>) überprüft, doch konnte diesbezüglich keine Übereinstimmung oder Ähnlichkeit mit dem Expressionsmuster der CRH-Cre Tiere festgestellt werden.

Für die 29 bp lange Sequenz konnte auf die beschriebene Weise kein Treffer erzielt werden. Die auffällige Häufigkeit der Base Thymin, sowie die geringe Länge von 29 bp könnten aber darauf hinweisen, dass es sich bei dieser unspezifischen Sequenz um ein Rearrangement handelt, welches während der Insertion des Transgens in das Genom entstanden ist.

Die Kenntnis des Insertionsortes ermöglichte eine gezielte Genotypisierung des Transgens (mit Hilfe der Primer *SPLK locus fwd1*, *5'SPLK rev3* und *SPLK 3'locus fwd*), und damit die Generierung von Mäusen, die homozygot für das CRH-Cre Transgen waren. Damit sollte überprüft werden, ob die Insertion in das murine Genom möglicherweise eine Auswirkung auf die Expression anderer Gene hat und dies sich in Form eines äußerlich sichtbaren Phänotyps erkennen lässt. Homozygote CRH-Cre Tiere zeigten jedoch (innerhalb der Käfighaltung) keinerlei Auffälligkeiten bezüglich Morphologie und Verhalten.

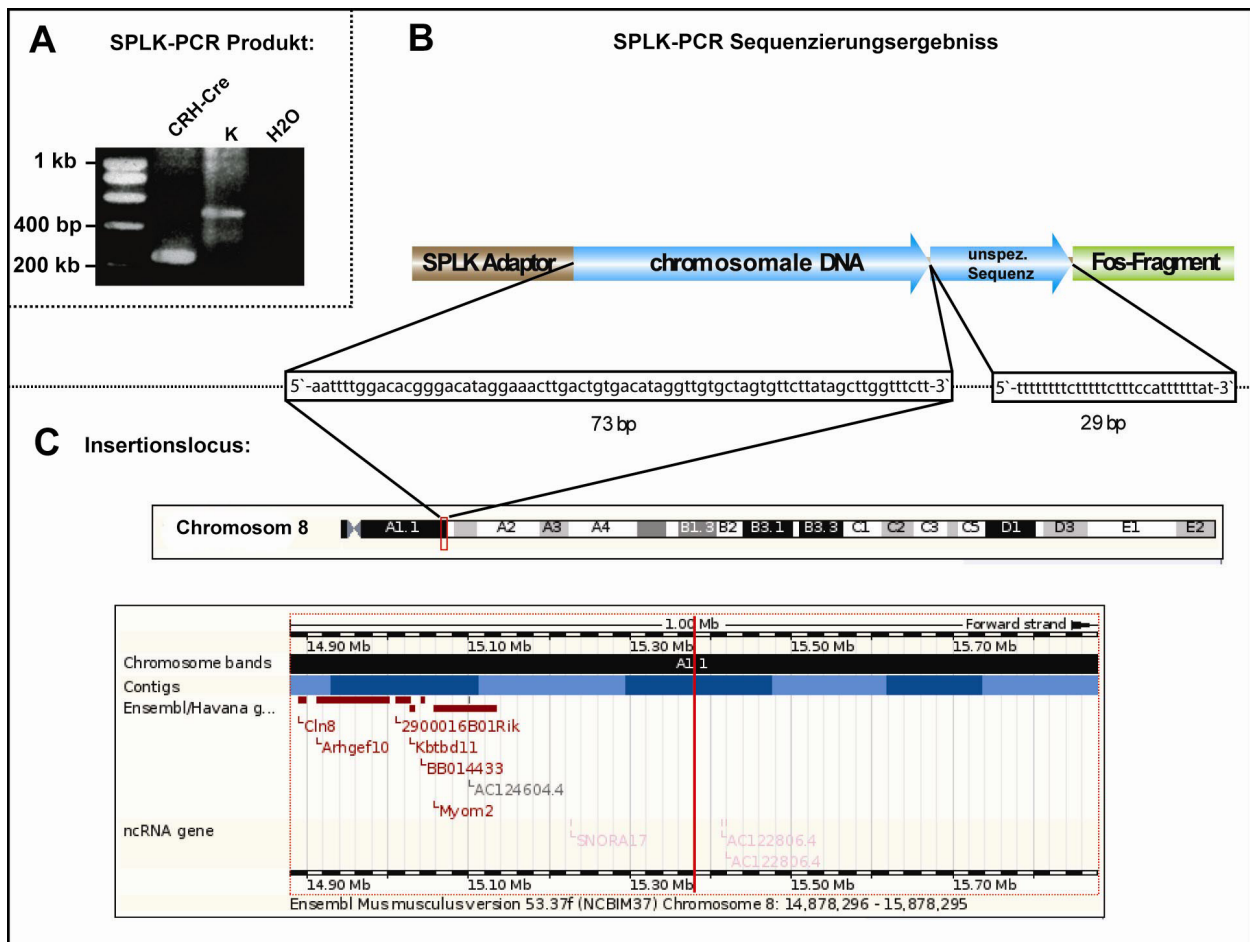


Abbildung 40: Ergebnisse der SPLK-PCR.

(A) PCR Produkte der SPLK-PCR Runde 2. Ausgangsmaterial des PCR-Templates war genomische DNA aus einem Cre positiven Tier der Linie CRH-Cre, bzw. einem Cre-negativen Tier der Linie CRH-Cre (K); (B) Schematische Darstellung des Sequenzierungsergebnisses und (C) Lokalisation der per SPLK-PCR „eingefangenen“ 73 bp Sequenz auf dem murinen Chromosom 8.

4.2.8.8 Transkriptionsanalyse

Mit Hinblick auf das nicht CRH-spezifische Expressionsmuster der Cre-Rekombinase von CRH-Cre Tieren sollte das ordentliche Spleißing von CRH-Exon1 an die Cre-Kassette und somit dessen möglicher Einfluss auf die ektopische Expression überprüft werden. Zu diesem Zweck wurden mehrere PCRs auf cDNA sowie eine 5'RACE und eine 3'RACE durchgeführt.

PCR auf corticaler cDNA

Hierzu wurde RNA aus dem cerebralen Cortex eines CRH-Cre positiven Tieres (sowie eines Cre-negativen Kontrolltieres) isoliert und in cDNA umgeschrieben. Anschließend wurde die cDNA als Template für mehrere PCR-Ansätze verwendet. Die für die jeweiligen Ansätze eingesetzten Primerpaare sind in Abbildung 41B dargestellt. Die Primer binden dabei an folgenden DNA-Elementen:

<i>RT-CRH fwd:</i>	CRH, Exon 1 (sense)
<i>RT-CRH rev:</i>	CRH, Exon 2 (antisense)
<i>5'RACE Cre rev 1/2/3:</i>	Cre-Rekombinase (antisense)
<i>CRH-Intron fwd 1:</i>	CRH, Intron (sense)
<i>Cre-F:</i>	Cre-Rekombinase (sense)
<i>Cre-R:</i>	Cre-Rekombinase (antisense)

Je nach potentiellm Spleiß-Zustand des Transgens (gespleißt/ungespleißt) ergeben die Primerpaare 1, 2, 3 und 7 unterschiedliche PCR-Produkte, wobei mit PCR 7 nur das Spleißen des endogenen CRH Locus (Exon 1 an Exon 2) detektiert wird. Da die Primerpaare 4, 5 und 6 nur bei Anwesenheit des CRH-Introns ein Produkt bilden können, sollten PCR Banden nur bei Anwesenheit von DNA oder ungespleißter mRNA zu erwarten sein. PCR 8 detektiert Cre unabhängig vom Spleiß-Zustand und fungiert als Kontrolle für die Richtigkeit der beiden verwendeten Genotypen. Abbildung 41A zeigt, dass die Produktgrößen von PCR-Ansatz 1 (> 200 bp, < 400 bp), 2 (≤ 400 bp) und 3 (> 600 bp, < 800 bp) mit den erwarteten Bandengrößen für den Zustand „gespleißt“ in Übereinstimmung gebracht werden können und deshalb als Indiz für ein intaktes Spleißen von CRH-Exon 1 an Cre angesehen werden müssen.

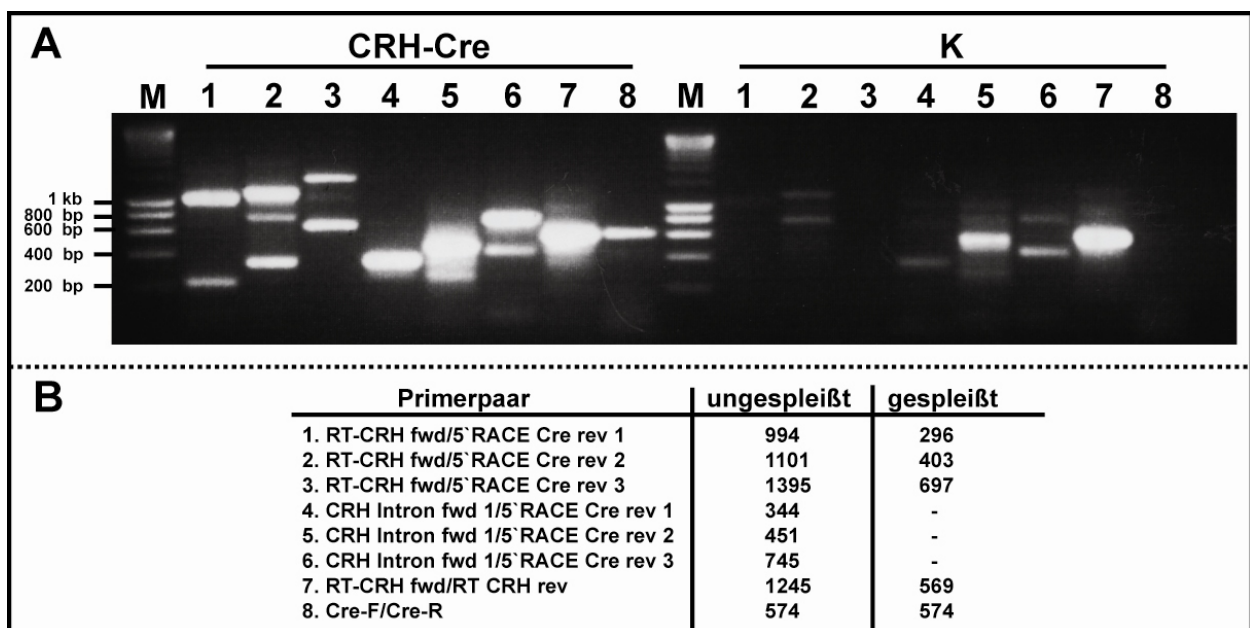


Abbildung 41: (A) Analysegel der PCR auf corticaler cDNA eines CRH-Cre, bzw. Kontrolltieres (K) und (B) Auflistung der verwendeten Primerpaare, sowie der nach Spleißzustand zu erwartenden Produktgrößen (in bp).

Abkürzungen: 1-8, Nummer der PCR Ansätze mit den jeweils bei (B) angeführten Primerpaaren; M, Marker.

Die zusätzlichen größeren Banden dürften wohl auf die Anwesenheit genomischer DNA zurückzuführen sein, zumal die CRH-Intron Primer ebenfalls distinkte Produkte amplifizieren konnten (Ansatz 4, 5 und 6), während Ansatz 7 mit einer Bandengröße von knapp unter 600 bp ein intaktes Spleißing von endogenem CRH anzeigt.

5`RACE und 3`RACE auf corticaler mRNA

Die 5`RACE und 3`RACE wurden auf der corticalen RNA eines CRH-Cre Tieres durchgeführt, die auch schon für die im vorherigen Kapitel beschriebene RT-PCR eingesetzt wurde.

Für die erste Runde der 5`RACE wurden der Primer *5`RACE Cre rev 3* (bindet am 5`Ende der Cre-Rekombinase) und der im *5`/3`RACE Kit, 2nd Generation* (Roche) mitgelieferte Oligo *d(T)-Anker Primer* eingesetzt. Runde 2 fand mit dem Primer *5`RACE Cre rev 2* und dem im Kit enthaltenen *PCR Anker-Primer* statt, die finale PCR Runde mit Primer *5`RACE Cre rev 1* und dem *PCR Anker Primer*. In der anschließenden gelelektrophoretischen Auftrennung der PCR-Produkte, konnten zwei unterschiedlich große (obere Bande ≤ 400 bp, kleinere Bande zwischen 200 und 300 bp), aber nahe beieinander liegende Signalbanden sichtbar gemacht werden (Abbildung 42A). Beide Banden wurden extrahiert, separat in *pCRII-TOPO* ligiert und in *E. coli* transformiert. Jeweils 5 positive Klone wurden schließlich sequenziert. Die erhaltenen Sequenzen wurden anschließend mit der Online-Datenbank *Ensembl* abgeglichen. Die Sequenz der unteren Bande bestand ausschließlich aus den Elementen Anker-Oligo/SA (exonischer Teil)/FRT/Cre Fragment (einschließlich *5`RACE Cre rev 1* Sequenz). Zwischen Anker-Oligo und SA konnte sich zusätzlich eine 130 bis 150 bp lange DNA Sequenz befinden, die aber aufgrund der hohen Trefferzahl bei *Ensembl* nicht eindeutig zugeordnet werden konnte und deshalb als unspezifisch kategorisiert wurde. Die obere Bande der 5`RACE enthielt zwischen Anker-Oligo- und SA-Sequenz jedoch eine 115 bp langes Fragment aus Intron 1 des CRH Gens (Abbildung 42B). Da sich die entsprechende Sequenz innerhalb des CRH-Introns 168 bp vor dem 3`-Ende des Introns befindet (Abbildung 42C), kann die auf dem 5`RACE Produkt festgestellte räumliche Nähe zwischen Intron Fragment und SA nur durch ein Spleißing-Ereignis erklärt werden. Dafür spricht auch, dass das 5`RACE Produkt nur den exonischen Teil des SA enthält, was nur durch eine Entfernung des intronischen Teils im Rahmen eines Spleiß-Vorgangs plausibel scheint. Das Spleißen des CRH-Intron Fragments an den SA konnte unter Verwendung der Primer *CRH Intron fwd 2/CRH Intron fwd 3* und *5`RACE Cre rev 1* unabhängig von der 5`RACE-PCR bestätigt werden (Daten nicht dargestellt). Beide Intron Primer erkennen dabei unterschiedliche Sequenzen des Intron-Fragments.

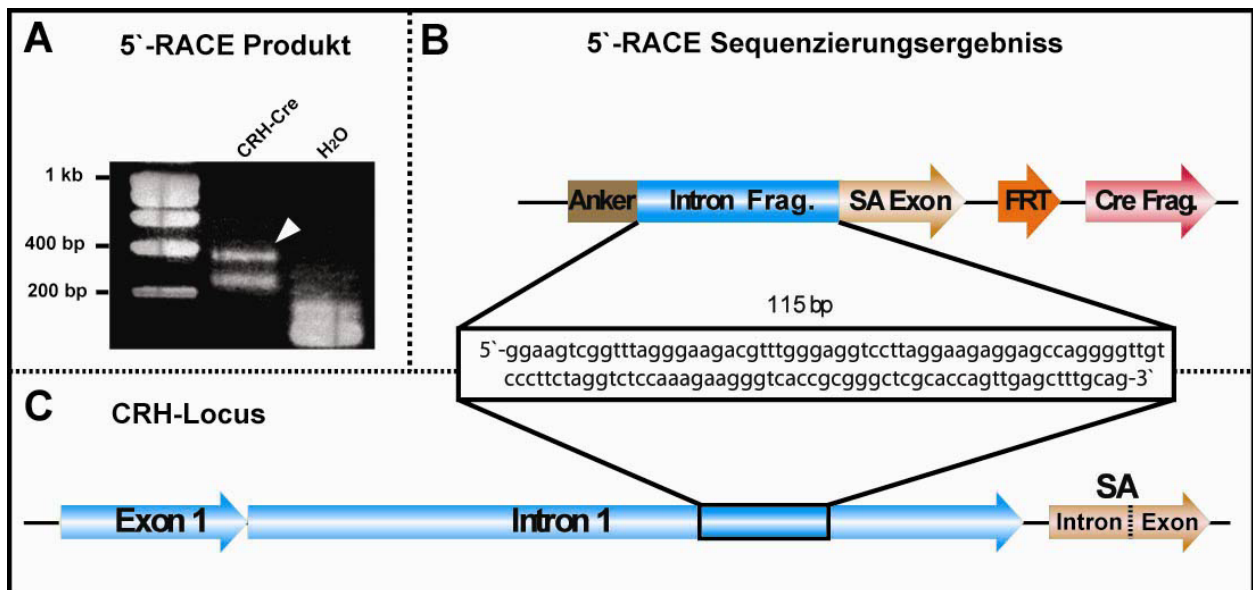


Abbildung 42: Ergebnisse der 5' RACE PCR.

(A) Analysegel der auf corticaler mRNA eines CRH-Cre Tieres durchgeführten 5' RACE-PCR. Das PCR-Produkt der oberen Bande (weißer Pfeilkopf) enthielt ein 112 bp Fragment aus dem CRH-Intron (B), welches sich innerhalb des CRH-Locus 168 bp vor dem Intronende befindet (C).

Ein direktes Spleißen des Intron Fragments an SA (wie es aus dem Ergebnis der 5' RACE geschlossen werden kann) führt zu spezifischen Amplifikationsprodukten des Primerpaars *CRH Intron fwd 2/5' RACE Cre rev 1* (266 bp), bzw. des Primerpaars *CRH Intron fwd 3/5' RACE Cre rev 1* (289 bp). Beide PCR-Produkte konnten auf cDNA eindeutig nachgewiesen werden.

Um zu überprüfen, ob das Intron-Fragment im endogenen CRH-Locus als kryptisches Exon funktioniert und an CRH-Exon 2 oder ein downstream-gelegenes Gen gespleißt wird, wurde eine PCR auf muriner cDNA mit antisense-Primer für das CRH Exon 2 und das Gen AC141209.3 durchgeführt (Daten nicht dargestellt). Der Locus des Gens AC141209.3 befindet sich ca. 70 kb downstream vom CRH Locus und käme neben CRH-Exon 2 damit als nächst möglicher Spleißpartner in Frage, für den Fall, dass das Intron-Fragment Teil eines kryptischen Gens darstellt. PCRs mit den Primerkombinationen *CRH Intron fwd 2 (3)/RT-CRH rev* (zur Detektion eines möglichen Intron-CRH Exon 2 Spleißprodukts), bzw. *CRH Intron fwd 2 (3)/AC 141209 fwd 1 (2)* (zum Nachweis eines möglichen Intron-AC141209.3 Spleißprodukts) blieben aber erfolglos. Die 3' RACE wurde mit dem im Kit enthaltenen *Oligo dT-Anker Primer*, sowie den sense-Primern *CRH Intron fwd 2*, *CRH Intron fwd 3* und *RK-SA rev* durchgeführt, doch war es mit keinem der drei sense-Primer möglich ein distinktes, spezifisches PCR Produkt zu erhalten.

4.2.9 Generierung konditional CRH-überexprimierender Mäuse

Entsprechend der angewendeten Strategie zur Generierung von CRH-COE_{Dlx} Mäusen wurden CRH-Cre Tiere mit der Linie CRH-COE gekreuzt und die Nachkommen per PCR genotypisiert. Eingesetzt wurden dabei die Primer *Cre-F/Cre-R* (Detektion von Cre), *ROSA-1/ROSA-5/ROSA-6/ROSA-7* (Detektion des ROSA26 Locus) und zusätzlich die Primer *BAC 3'HA rev/RK-Cre(3) fwd/RK-PGK fwd* (Detektion der Selektionskassetten Deletion).

Cre-positive, heterozygote CRH-COE_{Crh} Tiere ohne Selektionskassette (R26^{+Crh}CRH-Cre, fortan bezeichnet als CRH-COE^{het}) wurden anschließend wieder mit CRH-COE Tieren verpaart um homozygote, CRH-überexprimierende CRH-COE_{Crh} Nachkommen (R26^{Crh/Crh}CRH-Cre, fortan bezeichnet als CRH-COE^{hom}) und Cre-negative Kontrolltiere (R26^{Crh/Crh}, fortan bezeichnet als CRH-COE^{con}) zu erhalten.

4.2.10 Expressionsanalyse der CRH-COE_{Crh} Mäuse

Coronalschnitte von CRH-COE^{het} Mäusen und CRH-COE^{con} Kontrolltieren wurden mit radioaktiven Sonden für CRH, Cre und LacZ (Reportergen der CRH-COE Linie) hybridisiert und die Expressionsmuster miteinander verglichen (Abbildung 43). In Abbildung 43A ist das Expressionsmuster einer In-Situ-Hybridisierung von CRH mRNA eines CRH-COE^{con} Kontrolltieres mit dem typischen CRH Expressionsmuster im Cortex, Hippocampus, BNST, zentrale Amygdala und PVN zu sehen. Eingedenk der Tatsache, dass die Verwendung der CRH-Sonde im transgenen Tier sowohl das endogene als auch das transgene CRH detektiert, erstreckt sich das CRH Signal im CRH-COE^{het} Tier ebenfalls auf die Bereiche des PVN, BNST, Cortex und Hippocampus (Abbildung 43B). Auffallend ist aber wieder die viel stärkere Expression von CRH mRNA im Cortex sowie die schwächere Expression im Hippocampus. Zusätzlich zeigt sich eine Expression von CRH mRNA im Bereich des Thalamus. Die zentrale Amygdala konnte auf den dargestellten Coronalschnitten wiederum nicht identifiziert werden. Die Expression der Cre-Rekombinase ist in den CRH-COE^{het} Mäusen relativ schwach und konnte nur im Bereich des Cortex und des Hippocampus eindeutig sichtbar gemacht werden (Abbildung 43C). Die Expression des CRH-COE Reportergens LacZ spiegelt die Expression, bzw. Aktivität der Cre-Rekombinase, indirekt wider (Abbildung 43D). Auch hier fällt das starke Signal im gesamten Cortex auf, sowie eine schwächere Expression von LacZ mRNA im Hippocampus. Ähnlich wie bei der beobachteten CRH-Expression zeigt sich zusätzlich eine markante Expression von LacZ mRNA im Bereich des Thalamus.

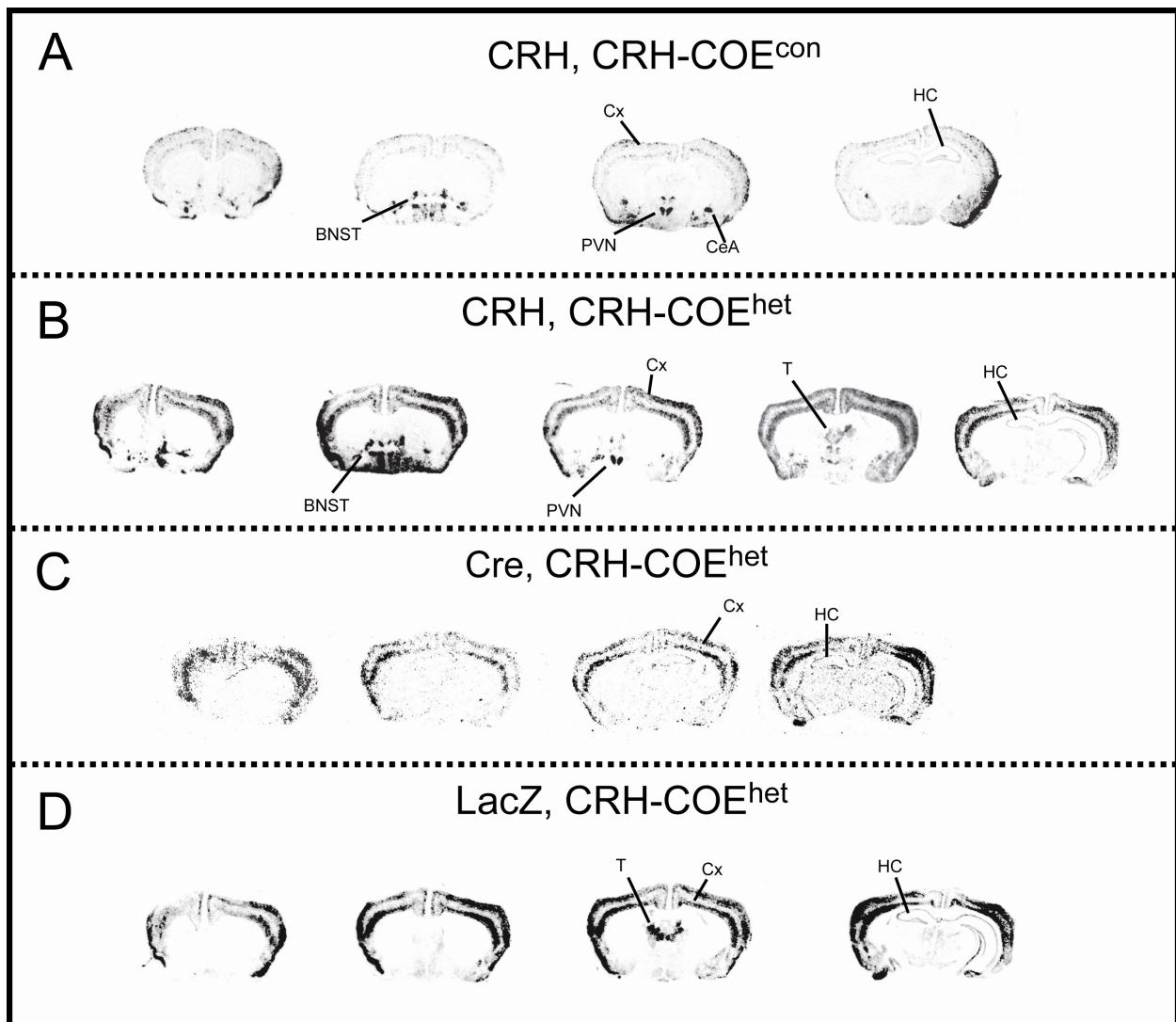


Abbildung 43: Übersichtsdarstellung der Expression von CRH mRNA auf Coronalaschnitten eines CRH-COE^{con} Tieres (A) und eines CRH-COE^{het} Tieres (B), sowie die Expression von Cre mRNA (C) und LacZ mRNA (D) auf den korrespondierenden Schnitten eines CRH-COE^{het} Tieres der Linie CRH-COE_{Crh}. Abkürzungen: CeA, zentrale Amygdala; Cx, Cortex; BNST, Bettkern der Stria terminalis; HC, Hippocampus; PVN, Nucleus paraventricularis; T, Thalamus.

Eine hochauflösendere Betrachtung der Expressionsmuster von Cre, CRH und LacZ durch Behandlung der hybridisierten Coronalaschnitte mit Fotoemulsion bestätigte mit Ausnahme des Hippocampus die in Abbildung 43 dargestellten Ergebnisse. Bei einer insgesamt sehr schwachen Cre-Signalstärke und einem hohen Hintergrund, ließ sich in CRH-COE^{het} Mäusen Cre mRNA nur im Cortex eindeutig identifizieren (Abbildung 44A). Schwache CRH-Signale lassen sich im Bereich der zentralen Amygdala und des Thalamus feststellen, während eine gut erkennbare Expression von CRH mRNA im Cortex zu erkennen ist (Abbildung 44B). Die LacZ-Expression entspricht mit Signalen im Cortex und Thalamus dem Muster in Abbildung 43D, doch ist hier

zusätzlich eine gut sichtbare Expression von LacZ im Bereich der basolateralen Amygdala zu erkennen (Abbildung 44C).

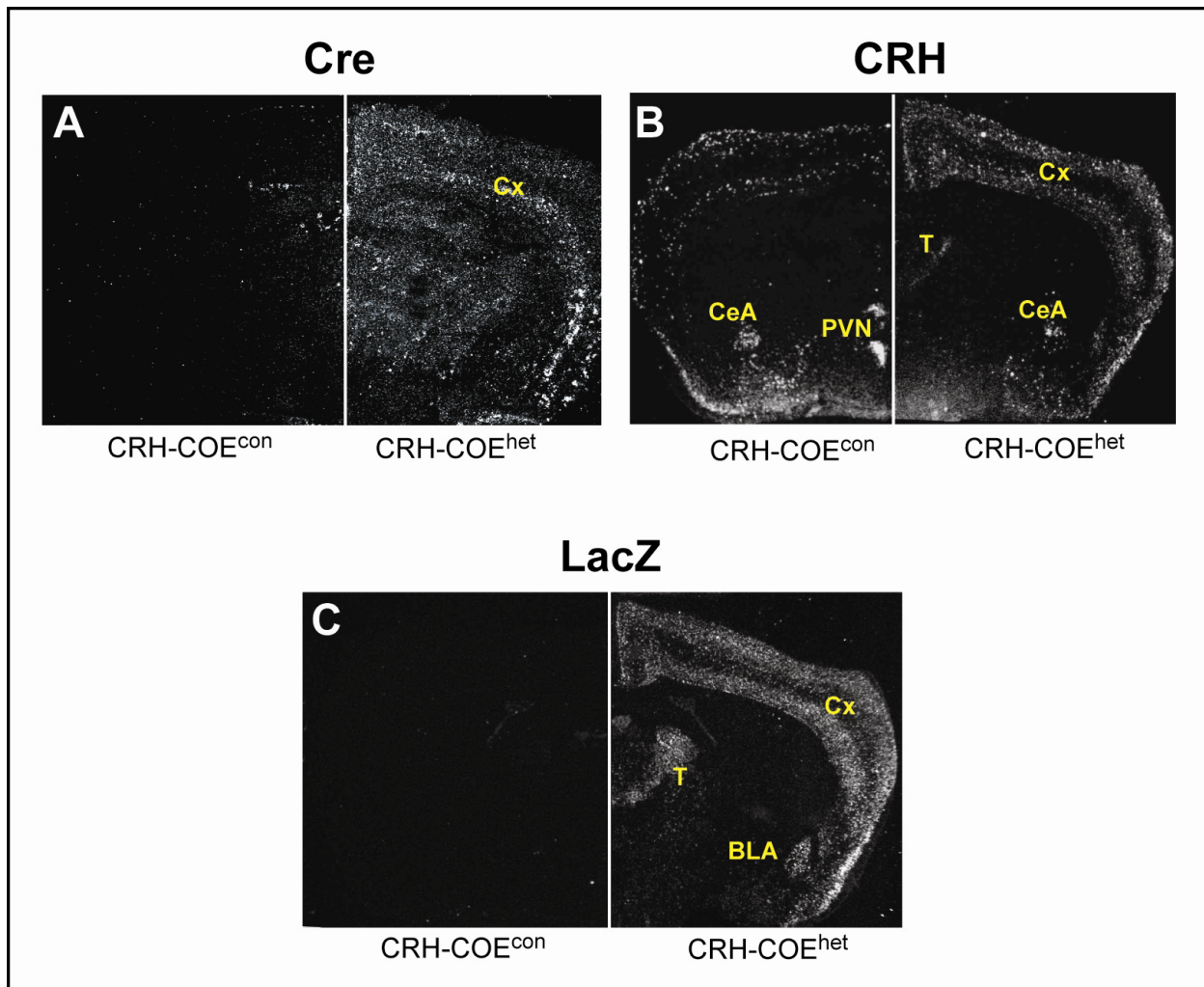


Abbildung 44: Übersichtsaufnahme (Dunkelfeld) der Cre mRNA (A), CRH mRNA (B) und LacZ mRNA (C) Expression auf Coronschnitten von CRH-COE^{con} Kontrollmäusen und CRH-COE^{het} Tieren der Linie CRH-COE_{Crh}.

Abkürzungen: BLA, basolaterale Amygdala; CeA, zentrale Amygdala; Cx, Cortex; PVN, Nucleus paraventricularis; T, Thalamus.

4.2.11 Verhaltensphänotypisierung der CRH-COE_{Crh} Linie

Die Phänotypisierung des Verhaltens wurde mit männlichen heterozygoten CRH-COE_{Crh} Tieren (CRH-COE^{het}) und CRH-COE^{con} Geschwistertieren durchgeführt. Die Art, Anzahl und Durchführung der einzelnen Tests entsprach dabei dem bei der Linie CRH-COE_{Dlx} beschriebenen Prozedere. Die Verhaltensexperimente ergaben jedoch keine signifikanten Unterschiede bezogen auf

Lokomotion (OF), Angst-ähnlichem Verhalten (EPM, DaLi) und Depressions-ähnlichem Verhalten (FST) zwischen CRH-COE^{het} Mäuse und CRH-COE^{con} Kontrolltieren (Abbildung 45).

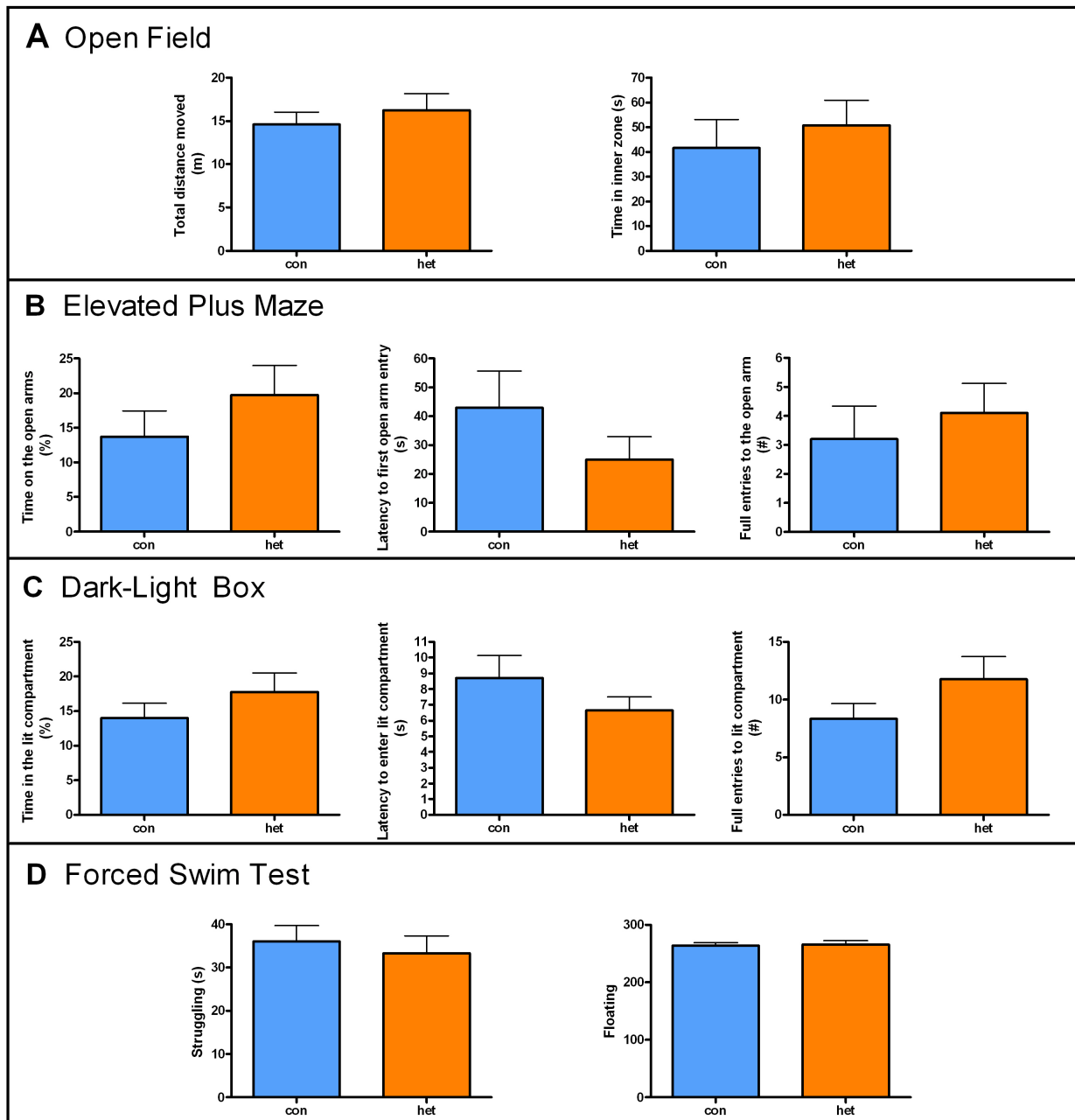


Abbildung 45: Ergebnisse der Verhaltenstypisierung von CRH-COE^{het} Männchen und CRH-COE^{con} Kontrolltieren der Linie CRH-COEC_{rh}.

Dargestellt sind die Ergebnisse des: (A) „Open-Field-Tests“ unter Normalbedingungen (15 lux) als zurückgelegte Gesamtdistanz (linker Graph) und prozentuale Aufenthaltsdauer in der inneren Zone (rechter Graph), (B) „Elevated-Plus-Maze“ als prozentuale Zeit, die auf den offenen Armen verbracht wurde (linker Graph) und Latenzzeit bis zum ersten Betreten des offenen Arms (mittlerer Graph) und Anzahl der vollen Eintritte in den offenen Arm (rechter Graph), (C) „Dark-Light-Box“ als prozentuale Zeit, die im hellen Kompartiment verbracht wurde (linker Graph), Latenzzeit bis zum Betreten des hellen Kompartiments (mittlerer Graph) und Anzahl der kompletten Eintritte in das helle Kompartiment (rechter Graph) und (D) „Forced-Swim Test“ als „struggling“-Zeit (linker Graph) und „floating“-Zeit (rechter Graph).

4.2.12 Überprüfung der HPA-Achsen Aktivität

Die Ermittlung der HPA-Achsen Aktivität wurde durch Messung der Plasma Corticosteron-Werte von homozygoten CRH-COE_{Crh} Männchen (CRH-COE^{hom}) und entsprechenden Kontrolltieren (CRH-COE^{con}) durchgeführt. Während die Vormittagswerte der beiden Gruppen sich nicht unterscheiden, zeigten die CRH-COE^{hom} Mäuse am Nachmittag signifikant niedrigere Corticosteron-Werte als die Kontrollen ($P < 0,01$) (Abbildung 46A). Verglichen mit den jeweiligen Vormittagswerten waren die Nachmittagswerte beider Genotypen gemäß des zirkadianen Sekretionsrhythmus deutlich höher.

Die Aktivierung der HPA-Achse durch 10 Minuten Immobilisationsstress führte zu keinerlei signifikantem Unterschied zwischen Kontrollen und CRH-COE^{hom} Tieren (Abbildung 46B). Die Feedback Messung erfolgte 90 Minuten nach dem Ende des Immobilisationsstress und zeigt für beide Versuchsgruppen einen identischen Rückgang der Corticosteron-Konzentration, was auf einen intakten Rückkopplungsmechanismus bei den CRH-COE^{hom} Mäusen schließen läßt. Ein Unterschied zwischen CRH-COE^{hom} Tieren und der Kontrollgruppe konnte aber auch innerhalb der Feedbackwerte nicht festgestellt werden.

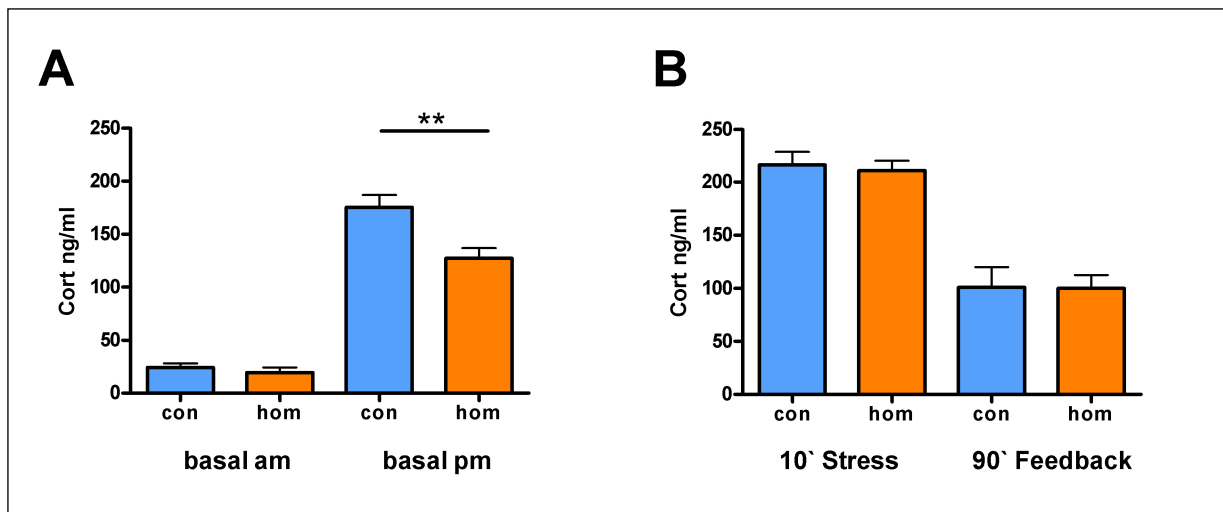


Abbildung 46: Plasma Corticosteron-Konzentrationen in männlichen CRH-COE^{hom} (hom) und CRH-COE^{con} (con) Mäusen der Linie CRH-COE_{Crh} unter (A) Basalbedingungen (am = vormittags, pm = nachmittags) und (B) unmittelbar nach 10 Minuten Immobilisationsstress, bzw. 90 Minuten nach dem Ende des Immobilisationsstress.

5 Diskussion

Obwohl seit der Entdeckung der beiden wichtigsten Klassen von Antidepressiva, der tricyclischen Antidepressiva und der Monoaminoxidase-Hemmer, bereits über 50 Jahre vergangen sind, sind die genetischen, neurobiologischen und biochemischen Wirkmechanismen und Ursachenzusammenhänge von depressiver Erkrankungen/affektiver Störungen immer noch unklar. Lange Zeit galt die Monoaminhypothese als mögliches Erklärungsmodell zum Verständnis depressiver Erkrankungen, doch ist dieses Modell nicht im Stande die klinische Wirkungsweise der gängigen Antidepressiva zufriedenstellend zu erklären. Daneben deutet die Tatsache, dass selbst eine Behandlung mit modernen Antidepressiva (die immer noch auf dem selben Wirkmechanismus beruhen wie die klassischen tricyclischen Antidepressiva) bei nur ~50% der Patienten eine komplette Remission bewirkt (Nestler et al., 2002) darauf hin, dass noch zu viele genetische und externe Faktoren innerhalb dieser komplexen Erkrankung unbekannt sind und erheblich mehr neurobiologische Systeme und biochemische Prozesse in die Ätiologie und Ausprägung der Depression involviert sind als bisher bekannt. Das CRH-System ist eines der Systeme, dessen potentielle Implikation in die endogene Depression in den letzten Jahren immer deutlicher wurde (Nemeroff et al., 1984; Holsboer, 1999; de Kloet et al., 2005). Der in klinischen Studien beobachtete Zusammenhang zwischen CRH-Überexpression und endogener Depression (Nemeroff et al., 1984; Raadsheer et al., 1995; Austin et al., 2003) führte unter anderem zur Generierung der ersten CRH-überexprimierenden Mausmodelle (Stenzel-Poore et al., 1992; Dirks et al., 2002; Lu et al., 2008). Deren räumlich und zeitlich ektopische CRH-Expression läßt aber nur bedingt Rückschlüsse auf die Rolle von CRH bei der Entwicklung von Depressions-ähnlichen Zuständen zu. Ziel der vorliegenden Arbeit war es deshalb zwei konditional CRH-überexprimierende Mauslinien zu generieren, welche eine räumlich und zeitlich regulierbare, nicht-ektopische CRH-Überexpression aufweisen würden. Im Sinne experimenteller Validitätskriterien sollten somit Tiermodelle geschaffen werden, die bezüglich ihres CRH-Systemprofils eine bessere Vergleichbarkeit zu Patienten mit endogener Depression ermöglichen würden.

5.1 Generierung und Analyse der Linie CRH-COE_{Dlx}

5.1.1 Expressionsmuster der Linie CRH-COE_{Dlx}

5.1.1.1 Cerebrale Expression von Dlx5/6-Cre

Mittels In-Situ-Hybridisierung und LacZ-Färbung (nach Verpaarung von Dlx5/6-Cre Mäusen mit der Reporterlinie ROSA26) wurden CRH-COE_{Dlx}, bzw. R26^{+LacZ}Dlx5/6-Cre Tiere hinsichtlich ihrer Cre mRNA und CRH mRNA Expression untersucht. Die Bereiche der höchsten Signalintensitäten, bzw. der höchsten Expression fanden sich dabei vor allem in den anatomischen Gebieten des Thalamus, des Hypothalamus und der Basalganglien. Zu nennen sind hierbei Striatum, Septum, Nucleus reticularis thalami, Globus pallidus, Bettkern der Stria terminalis, anterior/posteriorer Hypothalamus und Bulbus olfactorius. In etwas abgeschwächter Intensität ist der Dlx5/6 Promotor aber auch im cerebralen Cortex und Hippocampus (CA1, CA2, CA3, Gyrus dentatus) aktiv (Abbildung 14, Abbildung 15). Der paraventriculäre hypothalamische Nucleus und die zentrale Amygdala als typische Kerngebiete endogener CRH-Expression tauchten weder bei der Cre mRNA Detektion noch innerhalb der LacZ-Färbung als abgrenzbare, ihrer neuroanatomischen Form entsprechenden Signale auf, wobei die flächige und starke Cre-Expression in den Bereichen des Hypothalamus und des Striatums eine Differenzierung und Identifizierung einzelner Kerngebiete schwierig macht. Da innerhalb des PVN keine GABA-ergen Neuronen lokalisiert sind (Cullinan et al., 2008), wäre eine Expression von Cre mRNA in diesem Bereich aber auch nicht zu erwarten. Zumindest im Fall der zentralen Amygdala kann jedoch von einer GABA-spezifischen Cre-Expression ausgegangen werden. Da auf Coronschnitten beinahe der gesamte ventromediale Bereich zwischen Thalamus und Cortex eine Dlx5/6-vermittelte Cre-Expression aufweist und der Amygdala-Kern in diesem anatomischen Abschnitt lokalisiert ist, ist davon auszugehen dass ein Amygdala-Signal vorhanden ist, dieses sich aber von den restlichen Cre-Signalen nicht deutlich abhebt. Unterstützt wird diese Vermutung durch Publikationen, die eine Lokalisation von GABA-ergen Neuronen innerhalb eines kontinuierlich verlaufenden Streifens, bestehend aus Caudoputamen, zentraler Amygdala, medialer Amygdala und dem ventromedialem Rand der cerebralen Hemisphäre feststellen (Sun and Cassell, 1993; Swanson and Petrovich, 1998). Hinsichtlich der Expressionsanalyse mittels LacZ-Färbung konnte eine Veröffentlichung von Monory et al. (Monory et al., 2006) als Vergleichsmöglichkeit hinzugezogen werden. In dieser wurden ebenfalls Mäuse der Linie Dlx5/6-Cre eingesetzt und über eine Verpaarung mit Tieren der LacZ-Reporterlinie ROSA26 auf ihre Dlx5/6-Cre Expression hin getestet. Die in der vorliegenden Arbeit beschriebene qualitative und quantitative Spezifität der Dlx5/6-Cre Expression (und des transgenen CRH) ist dabei völlig identisch mit dem bei Monory

et al. dargestellten Expressionsmuster. Zudem zeigt der Vergleich zwischen dem beschriebenen Dlx5/6-Cre Expressionsmuster und der im *Allen Mouse Brain Atlas* (<http://mouse.brain-map.org>) abgebildeten cerebralen Verteilung von GAD67 mRNA eine deutliche Übereinstimmung der beiden Muster. GAD67 codiert dabei für eine Isoform des GABA-synthetisierenden Enzyms Glutamatdecarboxylase und gilt als Marker für GABA-erge Neuronen. Zusammenfassend läßt sich feststellen, dass sich die Aktivität des Dlx5/6 Promotors in neuroanatomischer Hinsicht überwiegend auf die Bereiche des Vorderhirns (bestehend aus Telencephalon und Diencephalon) und in funktionaler Hinsicht überwiegend auf den subcorticalen Komplex des limbischen Systems (wie Hippocampus und Amygdala), der Basalganglien und Teilen des Thalamus und des Hypothalamus beschränkt und somit das postulierte Verteilungsmuster GABA-erger Neuronen reflektiert. Entsprechend der weiträumigen Verteilung der GABA-ergen Neuronen im Gehirn, sind diese in völlig verschiedenen neuronalen Funktionseinheiten involviert. Striatum und Globus pallidus, Gebiete starker Dlx5/6-Aktivität, sind als Teile der Basalganglien vornehmlich an der (durch inhibitorische Afferenzen vermittelten) Prozessierung und Modulierung motorischer Handlungsmuster beteiligt (basales motorisches System), spielen aber auch innerhalb kognitiver und emotionaler Prozesse eine wichtige Rolle (Afifi, 1994a; Afifi, 1994b; Brown et al., 1997). Das Septum (eigentlich Septum verum) wird anatomisch dem Paläocortex zugerechnet und ist von funktioneller Bedeutung für emotionale, vegetative und möglicherweise auch Gedächtnisleistungen des Gehirns (Fried, 1972). Der Nucleus reticularis thalami gehört, wie der Name schon andeutet, zum Kerngebiet des Thalamus und gilt mit seiner netzartig den Thalamus umgebenden Struktur als eine wichtige Kontroll- und Synchronisierungsinstanz desselben (Blethyn et al., 2008). Der Bulbus olfactorius, der innerhalb der Expressionsanalyse ebenfalls eine markante Cre-Expression aufwies, ist Teil des Großhirns und dient der Vorverarbeitung von Geruchsinformationen, welche anschließend in die Riechrinde (olfaktorischer Cortex) weitergeleitet werden. Die Amygdala gilt als die Hirnstruktur, die für die emotionale Einfärbung von Informationen, sowie für die Konditionierung von Angstzuständen essentiell ist (Morgane et al., 2005; Rosen and Donley, 2006). Die Funktion des Bettkerns der Stria terminalis (BNST) besteht in der Integration von Stressinformation und der Koregulation sowohl des Stress- als auch des Belohnungssystems. Zudem gibt es Hinweise das der BNST auch bei einigen Aspekten von Angstverhalten mitwirkt (Walker et al., 2003; Forray and Gysling, 2004). Schließlich bleibt noch der anteriore und posteriore Hypothalamus als Gehirnstruktur mit markanter Dlx5/6-Cre Expression zu erwähnen. Der anteriore Anteil des Hypothalamus besteht dabei aus acht verschiedenen Kernen, die verschiedenste metabolische und vegetative Prozesse regulieren. Dazu gehört unter anderem die Kontrolle von Atmung, Kreislauf, Thermoregulation, zirkadianem Rhythmus, Hunger und

Durst. Der posteriore Teil des Hypothalamus besteht aus drei Nuclei, die in unter anderem in der Prozessierung von Wiedererkennungsbasierten Gedächtnisinhalten („recognition memory“) involviert sind (Vann and Aggleton, 2004). Zu den Gehirnbereichen, die eine etwas schwächere Dlx5/6-Cre Expression aufwiesen gehören cerebraler Cortex und Hippocampus. Während der cerebrale Cortex für alle höheren kognitiven Verarbeitungs- und Lernprozesse wichtig ist, fließen im Hippocampus die Informationen verschiedener sensorischer Systeme zusammen. Der Hippocampus nimmt daher eine hervorgehobene Stellung bei der Gedächtniskonsolidierung, bzw. Generierung von Erinnerungsinhalten ein (Holscher, 2003).

5.1.1.2 Periphere Expression von Dlx5/6-Cre

Schon seit längerem ist bekannt, dass GABA als wichtigster inhibitorischer Neurotransmitter nicht nur im Säugerhirn zu finden ist, sondern auch in einigen peripheren Organen eine potentielle Rolle als Hormon oder trophischer Faktor ausübt. Zu den Organsystemen in denen GABA bereits nachgewiesen werden konnte gehören Hypophyse, Pankreas, Ovarien, Plazenta, Uterus, Hoden, Nebennierenmark und Gastrointestinaltrakt (Erdo and Wolff, 1990; Akinci and Schofield, 1999; Castelli et al., 1999; Gladkevich et al., 2006). In der Mehrzahl der entsprechenden peripheren Organe beträgt die GABA-Konzentration dabei nur ca. 1 % der im Gehirn beobachteten Werte. Ausgenommen davon sind Ovidukt, Ovar, die Langerhans-Inselzellen des Pankreas und der Plexus myentericus (Auerbach-Plexus) des Verdauungssystems, deren GABA Konzentration vergleichbar mit den GABA-Konzentrationen des zentralen Nervensystems sind (Castelli et al., 1999). Um zu überprüfen, ob der für GABA-erge Interneuronen spezifische Dlx5/6 Promotor ebenfalls eine periphere Aktivität aufweist, wurden die in Abbildung 17 dargestellten peripheren Organ-/Gewebsproben eines R26^{+LacZ}Dlx5/6-Cre Tieres einer LacZ-Färbung unterzogen. Es muss dabei berücksichtigt werden, dass der Dlx5/6 Promotor eigentlich die Expression der beiden Transkriptionsfaktoren *Distalless Homeobox5* und *Distalless Homeobox6* steuert, die beide für die Entwicklungssteuerung GABA-erger Interneuronen essentiell sind (Eisenstat et al., 1999; Cobos et al., 2005). Das Expressionsmuster dieser beiden Transkriptionsfaktoren beschränkt sich dabei allein auf das zentrale Nervensystem und peripher, soweit bekannt, auf das murine embryonale Skelettsystem (Simeone et al., 1994; Ruest et al., 2003). Dlx5/6 eignet sich im adulten Tier daher nur als neuronaler, nicht aber als peripherer GABA-Marker. So ist auch zu erklären, dass die LacZ-Expressionsanalyse der R26^{+LacZ}Dlx5/6-Cre Tiere keinerlei spezifische Dlx5/6-Cre Expression innerhalb der untersuchten Organe aufzeigte. Die aufgetretene X-Gal Färbung des Magens, des Darm, des Pankreas und des mit der Hypophyse herauspräparierten Knochens von R26^{+LacZ}Dlx5/6-Cre Mäusen ist bekanntermaßen unspezifischer Natur und auch bei Kontrolltieren und Wildtyp Mauslinien zu beobachten (Adams and

Gale, 2006). Organe die ebenfalls oft unspezifische falsch positive LacZ-Färbungen aufweisen beinhalten Nasennebenhöhlen, Tränenorgane, Speicheldrüsen, Lymphknoten und männliche Geschlechtsorgane (Hoden, Nebenhoden, Samenleiter) (Adams and Gale, 2006). Es ist deshalb anzunehmen, dass CRH-COE_{Dlx} Mäuse keine CRH-Überexpression in den untersuchten peripheren Organsystemen aufweisen. Somit kann ausgeschlossen werden, dass das phänotypische Erscheinungsbild der Linie CRH-COE_{Dlx} auf direkte oder indirekte Effekte einer möglichen peripheren CRH-Überexpression zurückgeführt werden könnte.

5.1.1.3 Dlx5/6-Cre Expression im Hirnstamm

Publikationen über die Expression des Dlx5/6 Promotors beschränkten sich bisher vor allem auf den Vorderhirnbereich (Monory et al., 2006) oder konzentrierten sich auf Zeitpunkte während der Embryogenese (Simeone et al., 1994; Zerucha et al., 2000). Es ist deshalb unklar, ob eine Aktivität von Dlx5/6 auch im Bereich des Hirnstammes adulter Mäuse vorhanden ist. Während der Expressionsanalyse von R26^{+LacZ}Dlx5/6-Cre Mäusen mittels LacZ-Färbung konnte nun im Bereich des Hirnstammes ein Gebiet markanter Dlx5/6-Cre Expression, bzw. LacZ-Färbung beobachtet werden, dessen Form, Paarigkeit und Lokalisation (im dorsalen Tegmentum des Pons, ventral des vierten Ventrikels) den Verdacht nahe legt, dass es sich hierbei um den Locus coeruleus handeln könnte (Abbildung 16R und Abbildung 18). Der Locus coeruleus zählt zu den Gehirnarealen mit der höchsten Anzahl noradrenerger Zellen und ist allgemein in der Steuerung von Orientierung und Aufmerksamkeit beteiligt. Darüber hinaus wird der Locus coeruleus mit diversen anderen physiologischen Körperfunktionen (wie Erregung, Schlaf, Kognition, Gedächtnis, Emotionen, Angst, Stressadaption, Kontrolle autonomer Funktionen), aber auch mit pathologischen Prozessen (wie Depression, Post-traumatische Stresserkrankung, Panik, Epilepsie, Bluthochdruck) in Verbindung gebracht (Singewald and Philippu, 1998). Mit Hilfe der Doppel-In-Situ-Hybridisierung konnte nun in CRH-COE_{Dlx} Mäusen ein paariger Nucleus identifiziert werden, dessen Form (bumerang-oder häckchenförmig), Lokalisation und hohe Tyrosinhydroxylase-Expression (TH) ihn als Locus coeruleus erkennen lassen (Abbildung 19). Die Tatsache dass innerhalb des Locus coeruleus in ca. 30 % der TH-positiven Zellen auch Cre mRNA detektiert werden konnte und umgekehrt in 73 % der Cre-positiven Zellen auch TH mRNA detektiert werden konnte, bestätigt die Ergebnisse der LacZ-Färbung und bedeutet in der einfachsten Schlussfolgerung, dass Dlx5/6-Cre und damit eventuell auch GABA (da Dlx5/6 ein Marker für GABAerge Interneuronen ist) auch in einem Teil der noradrenergen Zellen des Locus coeruleus exprimiert wird. Da der Locus coeruleus gemeinhin als rein noradrenerges Kerngebiet angesehen wird, bieten sich zur Erklärung dieser Beobachtung verschiedene Theorien an. So könnte die festgestellte Kolokalisation von Dlx5/6-Cre und TH auf eine ektopische Aktivierung des Dlx5/6

Promotors in noradrenergen Neuronen zurückzuführen sein, doch scheint dies in Anbetracht der spezifischen und distinkten Expression im übrigen Gehirn fragwürdig. Bei einer ektopischen Dlx5/6-Cre Expression ließe sich zudem auch in anderen TH-exprimierenden Bereichen, wie der Substantia nigra oder dem ventralen Tegmentum (ventral tegmental area = VTA) eine ektopische Expression erwarten, doch konnte dies nicht beobachtet werden. Die Hypothese, wonach innerhalb des Locus coeruleus neben noradrenergen auch GABA-erge Neuronen lokalisiert sind, sowie es von einigen Autoren diskutiert wird (Iijima and Ohtomo, 1988; Van Bockstaele and Chan, 1997; Singewald and Philippu, 1998) bietet dahingegen keine befriedigende Erklärungsmöglichkeit. Zwar könnte dadurch eine Kolokalisation von GABA-ergen und noradrenergen Neuronen innerhalb desselben Nucleus erklärt werden, nicht aber die beobachtete Kolokalisation von Cre mRNA (als indirekter Marker für GABA) und TH mRNA innerhalb derselben Neuronen. Schließlich wäre denkbar, dass es sich bei der beobachteten Kolokalisation tatsächlich um einen physiologischen Zustand handelt, was bedeuten würde, dass manche Neuronen des Locus coeruleus GABA und Noradrenalin kossynthetisieren und -sekretieren. Indizien für diese Hypothese stammen aus Publikationen, die über beobachtete Kolokalisationen von GABA (bzw. GAD65 mRNA) und TH in neuronalen Zellen des Hypothalamus, der Hypophyse (Schimchowitsch et al., 1991), des Bulbus olfactorius (Goheen et al., 1997) und der Substantia nigra/A10 Region (Gonzalez-Hernandez et al., 2001) berichten. Die Beobachtung, dass nur ca. 1/3 der TH-positiven Zellen des Locus coeruleus Cre-mRNA exprimieren würde dabei darauf hinweisen, dass eine potentielle Kosekretion von GABA und Noradrenalin nur in einer Subpopulation noradrenerger Zellen des Locus coeruleus stattfindet.

Innerhalb der vorliegenden Arbeit konnte der ursächliche Zusammenhang der (im Locus coeruleus) detektierten Kolokalisation von Cre mRNA und TH mRNA nicht mehr weiter untersucht werden. Mit Hilfe einer weiteren Doppel-In-Situ-Hybridisierung unter Verwendung von Sonden gegen TH mRNA und Gad65/Gad67 mRNA ließe sich aber überprüfen, ob die beobachtete Koexpression physiologischer oder ektopischer Natur ist.

5.1.2 Verhaltensphänotypisierung der CRH-COE_{Dlx} Mäuse

Um den Einfluss der Dlx5/6-spezifischen Überexpression von CRH auf Lokomotions-, Angst- oder Depressions-assoziierte Verhaltensweisen zu untersuchen, wurden homozygote CRH-COE_{Dlx} Männchen (CRH-COE^{hom}) und Kontrolltiere in den Verhaltensmodellen „Forced-Swim Test“ (FST), „Elevated-Plus-Maze“ (EPM), „Open-Field“ (OF) und „Dark-Light-Box“ (DaLi) getestet. CRH-COE^{hom} Mäuse zeigen dabei ein markant reduziertes Angstverhalten aber kein verändertes Depressions-ähnliches Verhalten (Abbildung 20). Dies findet seinen Ausdruck in

einer prozentual längeren Aufenthaltsdauer auf dem offenen Arm des EPM, einer kürzeren Latenzzeit bis zum Betreten des offenen Arms und einer größeren Gesamteintrittszahl in den offenen Arm. Dieses signifikant reduzierte Angstverhalten konnte dabei auf dreierlei Weise validiert werden. Erstens konnten mit einer zweiten unabhängigen Versuchsreihe die Ergebnisse des EPM reproduziert, bzw. identische signifikante Unterschiede beobachtet werden. Zweitens zeigten CRH-COE^{hom} Männchen in der DaLi Box ebenfalls reduziertes Angstverhalten in Form einer geringeren Latenzzeit zum Eintritt in das helle Kompartiment, bzw. einer größeren Gesamteintrittszahl in das helle Kompartiment (bezüglich der prozentualen Zeit, die im hellen Kompartiment verbracht wurde, ist nur ein Trend zu Gunsten der CRH-COE^{hom} feststellbar). Und drittens ließ sich Angst-reduziertes Verhalten auch in der aversiv gestalteten Version des OF (mit 150 lux Beleuchtung) als prozentual mehr in der inneren Zone verbrachten Zeit erkennen. Die Tatsache, dass der nicht-aversive OF (15 lux Beleuchtung) keine Unterschiede zwischen CRH-COE^{hom} und Kontrollmäusen aufzeigte, deutet dabei darauf hin, dass Lokomotionsunterschiede als unabhängige Variable innerhalb der durchgeführten Tests ausgeschlossen werden können. Vor dem Hintergrund der bisher bekannten Effekte von CRH auf Angst-ähnliches Verhalten in Nagetieren scheint der beobachtete anxiolytische Effekt der CRH-Überexpression in CRH-COE^{hom} Tieren zunächst unerwartet. So deuten vielerlei Studien auf der Grundlage von CRH-Applikationen, (Dunn and Berridge, 1990), transgenen CRH-überexprimierenden Mauslinien (Stenzel-Poore et al., 1994), CRH Antisense-Oligonukleotiden (Skutella et al., 1994) und pharmakologischen Untersuchungen mittels CRH/CRH-R1 Antagonisten (Heinrichs et al., 1994; Menzaghi et al., 1994; Koob and Heinrichs, 1999) darauf hin, dass CRH über seinen Rezeptor CRH-R1 eine anxiogene Wirkungsweise ausübt. Eine wichtige Schaltstelle für diesen vermuteten CRH-Effekt wird dabei im Locus coeruleus vermutet (Arborelius et al., 1999). So konnte gezeigt werden, dass CRH Mikroinjektionen in den Locus coeruleus eine erhöhte Noadrenalin-Transmission desselben zur Folge haben und zu erhöhtem Angst-ähnlichen Verhalten (bei Ratten) führen (Butler et al., 1990; Weiss et al., 1994). In Anbetracht der Tatsache, dass die CRH-Hypersekretion in CRH-COE_{Dlx} Tieren in GABA-ergen Neuronen induziert wird, stellt sich andererseits die Frage, in wie weit das beobachtete reduzierte Angstverhalten auf die Effekte GABA-erger Neurotransmission zurückzuführen ist. Im Gegensatz zu CRH wird die Wirkung von GABA auf Angst-ähnliches Verhalten als anxiolytisch beschrieben (Biggio et al., 1990). So resultiert z.B. die Verabreichung von GABA-Wiederaufnahmehemmern (die zu einer Erhöhung der GABA-Konzentration im Gehirn führen) in Ratten in einem reduzierten Angst-ähnlichem Verhalten (Sayin et al., 1992; Schmitt and Hiemke, 1999). Derselbe Effekt läßt sich in Mäusen beobachten, deren GABA-Transporter durch einen „Knock-out“ ausgeschaltet wurde und die im

EPM, OF und in der DaLi-Box reduziertes Angstverhalten zeigen (Liu et al., 2007). Umgekehrt führt der „Knock-out“ des murinen, für die GABA-Synthese essentiellen GAD65-Locus zu mehr Angst-ähnlichem Verhalten im OF (Kash et al., 1999). In wie weit die potentiell anxiogene Wirkung von CRH und die potentiell anxiolytische Wirkung von GABA in ein Erklärungsmodell für den reduziert ängstlichen Phänotyp der CRH-COE_{Dlx} Mäuse integriert werden könnten, bleibt vorerst unklar. Eine einfache Erklärungsmöglichkeit bestünde in der Annahme, dass CRH in GABA-ergen Neuronen einen verstärkenden Effekt auf die GABA-Transmission ausübt (z.B. durch Erhöhung der GABA-Sekretion oder Forcierung der Signaltransduktion) und dadurch zu einer Induktion von reduziertem Angstverhalten führt. Dies setzt aber voraus, dass CRH, wie immer häufiger diskutiert, „nur“ als Neuromodulator fungiert und nicht, wie bislang angenommen, als eigener Neurotransmitter (Gallagher et al., 2008). Da die Effekte von CRH über den CRH-R1 vermittelt werden, kann CRH dabei nur in denjenigen Gehirnstrukturen/Neuronen wirken, die auch den endogenen CRH-R1 exprimieren. Geht man von einer Neurotransmitter-ähnlichen Wirkung von CRH aus, so lassen sich nichtsdestotrotz nur bedingt Schlüsse aus den veröffentlichten anxiogenen Effekten von CRH auf den Phänotyp der Linie CRH-COE_{Dlx} ziehen. So generieren sich spezifische Verhaltensweisen/Verhaltensreaktionen aus dem Zusammenspiel verschiedener neuronaler Populationen, Netzwerke und Schaltkreise sowie einem spezifischen Expressionsmuster der beteiligten Gene innerhalb dieser Funktionseinheiten. Wird das Expressionsmuster verändert, eingeschränkt oder ausgeweitet kann dies unter Umständen zu einer Veränderung der Verhaltens-spezifischen Gehirnprozesse führen und damit zu einer Veränderung des Phänotyps. Im Falle der CRH-COE_{Dlx} Mäuse ist nicht zu ersehen, in welchem Maße die ektopische Überexpression von CRH (es wird auch in solchen GABA-ergen Interneuronen CRH überexprimiert, bei welchen dies im Wildtyp nicht der Fall ist), sowie die kompensatorischen Gegenregulationen die Etablierung und Funktion der anxiogenen CRH-Schaltkreise beeinflussen und somit eventuell in ihrem Wirkpotenzial dämpfen. Die Tatsache das in der Vermittlung von Angst-ähnlichem Verhalten außer GABA und CRH auch andere Transmitter wie z.B. Glutamat, Noradrenalin und Serotonin involviert sind (Ninan, 1999), beschwert Interpretationsversuche mit einem zusätzlichen Grad an Komplexität und läßt den Versuch, den funktionellen Zusammenhang zwischen CRH-Überexpression und Angst-ähnlichem Verhalten aufzuklären diffizil erscheinen.

Das eben genannte unterstreichend soll an dieser Stelle eine Mauslinie beschrieben werden, die am Max-Planck Institut für Psychiatrie generiert wurde und deren Phänotyp möglicherweise Relevanz für die Interpretation des reduzierten Angstverhaltens der CRH-COE_{Dlx} Tiere haben könnte. Es handelt sich dabei um eine Mauslinie, deren CRH-R1 durch „Knock-out“ in allen

dopaminergen Neuronen deletiert wurde ($Crhr1^{loxP/loxP}Dat-CreERT2$, abgekürzt $Crhr1^{Dat}$). Ergänzend muss dabei hinzugefügt werden, dass in mehreren Publikationen eine Beteiligung des dopaminergen Systems (dessen Hauptprojektionen sich vom Mittelhirn in die Basalganglien, den Bulbus olfactorius und den frontalen Cortex erstrecken) an der Regulation von Stress-induziertem emotionalen Verhalten diskutiert wird (Biggio et al., 1990; Lamont and Kokkinidis, 1998). Die Beobachtung, dass erwähnte $Crhr1^{Dat}$ Mäuse erhöhtes Angstverhalten im EPM verbunden mit einer geringeren Sekretion an Dopamin zeigen, scheint diese Hypothese zu unterstützen (Daten bisher noch nicht publiziert). In diesem Zusammenhang gibt es Hinweise darauf, dass GABA die Aktivität dopaminergener Neuronen moduliert, bzw. die Dopamin-Sekretion erhöht (Biggio et al., 1990; Dewey et al., 1992; Galindo et al., 1999). Diese Beobachtungen eröffnen die Möglichkeit einen Zusammenhang zwischen dem anxiolytischen Effekt der $Dlx5/6$ spezifischen CRH-Überexpression und dem anxiogenen Effekt der Dopamin-spezifischen CRH-R1 Deletion herzustellen. So könnte die Vermittlung von Angstreaktionen unter physiologischen Bedingungen über GABA-Dopamin Verbindungen stattfinden. GABA-erge Interneuronen würden demnach durch GABA und CRH Sekretion synergistisch einen spezifischen Aktivierungszustand nachgeschalteter dopaminergener Neuronen über postsynaptische GABA-Rezeptoren herbeiführen und somit für ein Wiltyp-spezifisches Niveau an Dopamin-Freisetzung sorgen. Der „Knock-out“ des CRH-R1 in dopaminergen-Neuronen würde die verstärkende Wirkung des Neuromodulators CRH aufheben und das aktivierende GABA-Signal abschwächen. Folge ist eine geringere Dopamin-Sekretion verbunden mit einem erhöhten Angstverhalten. Die Überexpression von CRH würde gemäß dieser Theorie zum Gegenteil führen. Die erhöhte Konzentration an CRH potenziert das GABA-Signal und verstärkt die Ausschüttung von Dopamin im nachgeschalteten Neuron. Die forcierte Dopamin-Transmission hätte wiederum die Generierung von reduziertem Angst-ähnlichen Verhalten zur Folge.

Innerhalb der vorliegenden Arbeit war es zeitlich nicht mehr möglich die mechanistische Wirkungsweise von CRH, GABA und Dopamin bei der Evolvierung von erhöhtem/reduziertem Angstverhalten genauer zu untersuchen. Die Funktion dieser Transmitter sowie die oben erwähnte Theorie der GABA-Dopamin-Verschaltung könnte aber mit unterschiedlichen Strategien getestet werden. Zum einen könnte man experimentell untersuchen, ob und wie weit sich das reduzierte Angstverhalten der Linie $CRH-COE_{Dlx}$ mit Hilfe von GABA-Rezeptor-Antagonisten oder CRH-Antagonisten revertieren läßt. Neben der Frage, ob GABA oder CRH den ausschlaggebenden Anteil an dem reduzierten Angst-ähnlichen Verhalten ausübt, ließe sich dabei auch überprüfen, ob die beobachteten Effekte akut (und damit reversibel) oder kompensatorisch arretiert (bzw. irreversibel) sind. Auf Seiten der $Crhr1^{Dat}$ Mäuse könnte versucht werden, den anxiogenen,

mit niedriger Dopamin-Sekretion assoziierten Phänotyp durch künstliche Erhöhung des Dopamin-Spiegels zu kompensieren. In Frage käme hierfür z.B. die Applikation eines Dopamin-Wiederaufnahmehemmers. Dies würde zeigen, ob tatsächlich die verminderte Dopamin-Freisetzung ursächlich für das erhöhte Angstverhalten ist. Schließlich bieten sich noch zwei Experimente zur Überprüfung der spekulativen GABA-Dopamin-Verschaltung an. Ein Vergleich der mittels Mikrodialyse erhobenen Dopamin-Konzentrationen in CRH-überexprimierenden Tieren und Kontroll-Tieren der Linie CRH-COE_{Dlx} könnte aufzeigen, ob eine CRH-Überexpression in GABA-ergen Neuronen mit einer erhöhten Dopamin-Sekretion einhergeht. Schließlich bestünde durch Kreuzung der Linien CRH-COE_{Dlx} und Crhr1^{Dat} die Option, einen Mausstamm herzustellen, der sowohl eine Dlx5/6-spezifische CRH-Überexpression als auch eine Deletion des CRH-R1 in dopaminergen Neuronen aufweist (COR-Dlx/Dat-CKR1). Falls das reduzierte Angstverhalten in CRH-COE_{Dlx} Mäusen tatsächlich über dopaminerge-Neurone vermittelt wird, so sollte die (durch den CRH-R1 „Knock-out“ bedingte) Unterbrechung dieser Signalübermittlung in CRH-COE_{Dlx}/Crhr1^{Dat} Mäusen zu einer beobachtbaren Reduktion des verringert ängstlichen Verhaltens führen.

Bezüglich des FST bleibt festzuhalten, dass die CRH-Hypersekretion innerhalb GABA-erger Interneuronen scheinbar keinen Effekt auf die Modulation von Depressions-ähnlichem Verhalten in Mäusen hat. Da bei Mäusen der Linie CRH-COE_{Cam}, die CRH vorderhirnsspezifisch überexprimieren ebenfalls kein FST Effekt beobachtet werden konnte, könnte die Region des Mittel- und Hinterhirns ein Bereich sein, dessen Kerne für die CRH-vermittelte Generierung von Depressions-ähnlichem Verhalten möglicherweise relevant sind (Lu et al., 2008). Es muss jedoch auch betont werden, dass der FST ursprünglich als Prüfverfahren für die Wirksamkeit solcher Antidepressiva entwickelt wurde, die auf monoaminerge Neurotransmittersysteme (wie z.B. Noradrenalin oder Serotonin) abzielen (Porsolt et al., 1977b; Deussing, 2006). Ob sich mit Hilfe des auf Vorhersagevalidität basierenden FST auch CRH-System immanente Verhaltensausprägungen zuverlässig detektieren lassen ist eine Frage, deren definitive Klärung noch aussteht. Zudem birgt die Interpretation von Immobilität im FST eine gewisse Problematik. Einerseits kann erhöhte Immobilität im FST als Unvermögen des Tieres angesehen werden, Fluchtverhalten aufrecht zu erhalten, bzw. eine aktive Stressbewältigungs-Strategie als Antwort auf einen Stressor anzuwenden (im Sinne von Depressions-ähnlichem Verhalten) (Lucki, 1997). Andererseits wird Immobilität von manchen Autoren als adaptive Verhaltensanpassung zur Einsparung von Körperenergie interpretiert (Geyer and Markou, 1995). Daneben spiegelt sich im FST Verhalten auch andere Verhaltenskomponenten wie z.B. Erregung oder Wachsamkeit wider, so dass eine

Einteilung von FST Verhalten in „Depressions-ähnlich“ und „nicht Depressions-ähnlich“ dem im FST auftretenden komplexen Verhaltensmuster nicht gerecht wird.

5.1.3 HPA-Achsen Aktivität

Der Vergleich der Corticosteron-Werte von Kontrolltieren und konditional CRH-überexprimierenden CRH-COE_{Dlx} Mäusen (CRH-COE^{hom}) zeigt, dass die Dlx5/6-spezifische CRH-Hypersekretion in männlichen und weiblichen Tieren keinen Einfluss auf die basale Aktivität der HPA-Achse hat (Abbildung 21). Eine Aktivierung der HPA-Achse mittels 10- oder 15-minütigem Immobilisationsstress führte in CRH-COE^{hom} Männchen jedoch zu einer um 26 % (nach 10 Minuten Stress), bzw. 18 % (nach 15 Minuten Stress) höheren Ausschüttung von Corticosteron als in den Kontrollen. Da sich die Feedback-Werte der beiden Genotypen nicht unterscheiden, kann ausgeschlossen werden, dass die Stress-induzierte Hyperreaktivität der CRH-COE^{hom} Mäusen die Folge einer möglicherweise gestörten (über Corticosteron vermittelten) negativen Rückkopplung ist. Da bei der komplexen Regulation und Modulierung der HPA-Achse viele verschiedene Gehirnstrukturen direkt und indirekt involviert sind, kann an dieser Stelle über die möglichen Ursachen der beobachteten Hypersekretion nur spekuliert werden. So erhalten die CRH-sekretierenden Neuronen des PVN direkte Afferenzen aus den umgebenden Strukturen des Hirnstamms (A2, C1, C2, C3), des Bettkerns der Stria terminalis (BNST), des Nucleus Raphè, des Nucleus tractus solitarii, des Hypothalamus und des Thalamus. Indirekter Einfluss auf die HPA-Achsen Aktivierung wird unter anderem von Seiten des Hippocampus, des präfrontalen Cortex, der Amygdala und des lateralen Septums ausgeübt (Herman and Cullinan, 1997; Herman et al., 2003). Eine herausragende Rolle innerhalb der HPA-Regulationsmechanismen haben dabei vor allem inhibitorische GABA-erge Afferenzen, welche ca. ein Drittel aller PVN-innervierenden Projektionen ausmachen. Neben GABA findet eine Signalübertragung auf CRH-sezernierende Neuronen auch über Glutamat, Serotonin, Noradrenalin und verschiedene Neuropeptide statt. Der GABA-erge BNST nimmt bei der Informationsübertragung auf den PVN eine besondere, weil integrative Stellung ein. Er dient dabei als Schaltstelle zwischen Amygdala, Hippocampus, Hypothalamus und Hirnstamm und wirkt je nach Art des Stressors aktivierend oder dämpfend auf die HPA-Achsen Aktivität ein (Herman et al., 2003). In Anbetracht der prominenten Rolle von GABA innerhalb der Stress-induzierten CRH-, bzw. Corticosteron-Sekretion, verbunden mit den möglichen Effekten einer CRH-Überexpression in eben diesen GABA-ergen Neuronen, liegt es Nahe die CRH-Hypersekretion als mögliche Folge einer Veränderung der GABA-ergen Schaltkreise (z.B. innerhalb des BNST) zu erklären. Die Amygdala ist z.B. im Stande während der Stressreaktion durch eine (GABA-erge) Inhibition der inhibitorischen

schen BNST - PVN Axone die Transkription von CRH mRNA im PVN zu erhöhen (Herman and Cullinan, 1997). Die erhöhte Transkription von endogenem CRH in der zentralen Amygdala (welche in der In-Situ-Quantifizierung festgestellt wurde), könnte demnach zu einer verstärkten Inhibition der Inhibition und damit zu einer Induktion der CRH Sekretion im PVN führen. Ein weiterer Ansatzpunkt könnte auch der Locus coeruleus sein, der als Teil des noradrenergen Systems ebenfalls aktivierenden Einfluss auf die HPA-Achse hat (Dunn et al., 2004). Umgekehrt führen CRH Mikroinfusionen in den Locus coeruleus zu einer erhöhten Noradrenalin-Sekretion desselben (Butler et al., 1990; Weiss et al., 1994). Daneben konnte beobachtet werden, dass akuter Stress zu einer Aktivierung noradrenerger Zellen des Locus coeruleus in Form von erhöhter c-fos und zif268 Expression (beide gelten als Marker für neuronale Aktivität) führt (Lu et al., 2008). Ausgehend von der beobachteten Kollokalisierung von Cre mRNA und TH mRNA im Locus coeruleus würde dies bedeuten, dass die CRH-Überexpression innerhalb des Locus coeruleus zu einer Forcierung der HPA-aktivierenden Wirkung der noradrenergen Projektionen führt. Grundlegend für die mechanistische Aufklärung der CRH-Hypersekretion ist auch hier die Frage nach der Rolle von CRH innerhalb der GABA-ergen Neuronen. Agiert CRH dort als unabhängiger Neurotransmitter mit eigener Wirkung oder als Neuromodulator, der direkt die GABA-Transmission moduliert? Und falls CRH als Neuromodulator fungiert: potenziert es oder reduziert es GABA-spezifische Effekte? Oder wird die GABA-Sekretion selbst durch CRH beeinflusst? Dies wäre dann allerdings nur in den Strukturen möglich, in denen auch CRH-R1 exprimiert wird (wie z.B. im Bulbus olfactorius, dem Nucleus reticularis thalami und dem Globus pallidus). Berücksichtigt werden muß dabei aber auch, dass eine Expression von CRH in den GABA-ergen Interneuronen nicht automatisch bedeutet, dass CRH die GABA-Transmission der entsprechenden Neuronen moduliert. So ist denkbar, dass CRH zwar von GABA-ergen Interneuronen sekretiert wird, die entsprechenden CRH-Rezeptoren sich aber auf benachbarten, anderen Neurotransmittersystemen angehörenden Neuronen befinden. Potentielle Möglichkeiten um einen Teil dieser Fragen zu klären bestünden in der Konzentrationsbestimmung von GABA in CRH-COE_{DLX}-Männchen (z.B. im BNST) mittels Mikrodialyse, in der elektrophysiologischen Analyse GABA-induzierter Aktionspotentiale oder in der pharmakologischen Anwendung von GABA-Rezeptor/CRH-R1 Antagonisten.

5.1.4 Kompensatorische Regulationen des CRH/CRH-R1 Systems

In vielen Fällen kann das Überexprimieren oder Ausschalten eines Genes dazu führen, dass andere, mit dem betroffenen Gen funktional assoziierte Gene, kompensatorisch herauf- oder herun-

terreguliert werden. Werden derartige kompensatorische Regulationsmechanismen bereits während der Embryogenese induziert, so kann dies dazu führen, dass sich neuronale Schaltkreise anders modulieren und entwickeln als dies in Wildtyp-Tieren der Fall wäre. Als Folge ließe sich nur schwer bestimmen, ob ein beobachteter Phänotyp allein auf ein bestimmtes manipuliertes Gen zurückzuführen ist oder aber (in Form eines sekundären Phänotyps) das Produkt tiefgreifender Veränderungen der neuronalen Netzwerke, bzw. ihrer Informationsübertragung ist. Durch In-Situ-Quantifizierung wurde deshalb überprüft, in wie weit die CRH-Überexpression in CRH-COE_{Dlx} Mäusen zu kompensatorischen Effekten innerhalb des CRH-Systems führt, zumal auch bekannt ist, dass der Dlx5/6 Promotor in Mausembryos bereits ab Tag 8,5 bis 9 aktiv ist (Simeone et al., 1994; Ruest et al., 2003).

Dass CRH fähig ist seine eigene Expression, sowie die seines bevorzugten Rezeptors CRH-R1 zu regulieren, konnte bereits durch Experimente belegt werden, bei denen sowohl die intracerebroventrikuläre Injektion von CRH als auch Immobilisationsstress zu einer Erhöhung von CRH mRNA und CRH-R1 mRNA im PVN führte (Luo et al., 1994; Makino et al., 1995; Imaki et al., 1996; Mansi et al., 1996). Die Tatsache, dass die in den erwähnten Publikationen beobachtete Regulation von CRH und CRH-R1 nur im PVN, nicht aber in anderen CRH-spezifischen Nuclei wie der zentralen Amygdala oder dem BNST festgestellt werden konnte, deutet auch auf die Spezifität und Komplexität der regulatorischen Mechanismen des CRH/CRH-Rezeptor Systems hin. Als weiteres Beispiel hierfür sei auf die Publikation von Lu et al. verwiesen (Lu et al., 2008), in der eine Mauslinie generiert wurde, welche CRH im gesamten Zentralnervensystem überexprimiert. Im Gehirn dieser Tiere fanden sich erniedrigte Konzentrationen von endogener CRH mRNA im PVN und im Hippocampus, wohingegen die zentrale Amygdala erhöhte Mengen an endogenem CRH aufwies.

Im Falle der CRH-COE_{Dlx} Tiere konnte gezeigt werden, dass die Überexpression von CRH in GABA-ergen Neuronen mit einer signifikanten Erhöhung von endogener CRH mRNA innerhalb der zentralen Amygdala assoziiert ist, der PVN von einer differentiellen Regulation aber unberührt bleibt (Abbildung 22). CRH-R1 mRNA ist dagegen im Hippocampus (CA1, CA2 und Gyrus dentatus) hochreguliert genauso wie CRH-R2 (CA1, Gyrus dentatus). Das Faktum, dass einige anatomische Strukturen nicht in die Quantifizierung mit einbezogen werden konnten (wie z.B. der Hippocampus im Fall des endogenen CRH) ist der Tatsache geschuldet, dass die Signalstärken in den entsprechenden Regionen zu schwach für eine valide Quantifizierung waren. Welche konkreten Schlussfolgerungen aus der beobachteten Dysregulation des CRH-Systems hinsichtlich funktionaler Konsequenzen gezogen werden können, bleibt vorerst unklar. Eine wachsende Zahl von Hinweisen deutet darauf hin, dass CRH über die beiden Rezeptoren CRH-R1 und

CRH-R2 in der Modulierung hippocampaler Plastizität und Neuroprotektivität, sowie in vom Hippocampus verarbeitete Lern- und Gedächtnisprozesse involviert ist (Lee et al., 1992; Radulovic et al., 1999; Choi et al., 2006; Sheng et al., 2008a; Sheng et al., 2008b). Ob und in wie weit sich eine veränderte CRH-R1/CRH-R2 Expression auf die funktionelle Integrität des Hippocampus auswirkt ist dabei unklar. Im Falle der Amygdala deuten mehrere Studien daraufhin hin, dass eine Stress-induzierte Erhöhung von CRH mRNA innerhalb der zentralen Amygdala in kausalem Zusammenhang mit der Generierung von Körper- und Verhaltensreaktionen steht, die im Rahmen des Angstverhaltens ausgelöst werden (Gray, 1993; Shepard et al., 2000; Asan et al., 2005). Konkret bleibt festzuhalten, dass die chronische CRH-Überexpression in CRH-COE_{Dlx} Mäusen kompensatorischen Gegenregulationen innerhalb des CRH-Systems verursacht und somit nicht ausgeschlossen werden kann, dass sich dies als zusätzlicher physiologischer Begleiteffekt auf CRH-COE_{Dlx} spezifische phänotypische Ausprägungen mitauswirkt.

5.2 Generierung und Analyse der Linie CRH-COE_{Crh}

Die dargestellten Ergebnisse der Linie CRH-COE_{Dlx} machen noch einmal den Bedarf an CRH-überexprimierenden Mausmodellen deutlich, deren Verhaltensphänotyp von möglichst wenig potentiellen Störvariablen beeinträchtigt wird. Zu diesen Störvariablen gehören kompensatorische Regulationsmechanismen, die als Reaktion auf die Expression des Transgens bereits während der Ontogenese stattfinden können und die im Stande sind die Funktionalität und qualitative Ausprägung neuronaler Informationsverarbeitung dauerhaft zu verändern. Die ektopische und damit nicht „naturgetreue“ Überexpression von CRH in neuronalen Zellen ist eine weitere Variable, die direkten, unerwünschten Einfluss auf den Phänotyp des Tieres nehmen kann und dem Versuch entgegenläuft, ein wirklichkeitsgetreues Pathologiemodell zu generieren. Mit den Begriffen „naturgetreu“, bzw. „wirklichkeitsgetreu“ ist dabei im Sinne der Konstruktvalidität der Zustand im transgenen Tier gemeint, welcher den Mechanismus der zu untersuchenden Pathologie im Menschen so weit wie möglich widerspiegelt. Zwar sekretieren (bezogen auf die Linie CRH-COE_{Dlx}) auch GABA-erge Interneuronen endogenes CRH, doch handelt es sich dabei vermutlich nur um einen Bruchteil der GABA-Neuronen, die in CRH-COE_{Dlx} Tieren CRH-überexprimieren. Obwohl nicht bekannt ist, in welchen Gehirnstrukturen depressive Patienten

CRH hypersekretieren, käme eine Mausmodell, in welchem die CRH-Überexpression CRH-spezifisch stattfindet, dem CRH-Phänotyp depressiv Erkrankter bisher am nächsten. Die Möglichkeit einer zeitlich steuerbaren CRH-Überexpression (durch Verwendung einer induzierbaren Cre-Rekombinase) würde darüber hinaus den Vorteil bieten, das Problem kompensatorischer Effekte zu umgehen und die Ätiologie der mit Depression-assoziierten CRH-Hypersekretion zeitlich realitätsgetreuer nachzumodellieren (depressive Episoden treten bei einem Großteil der Patienten erst im Erwachsenenalter auf).

5.2.1 Generierung des transgenen CRH-Cre Konstrukts

Wie schon im Fall der CRH-COE_{Dlx} Linie wurde auch zur Herstellung von konditional CRH-überexprimierenden CRH-COE_{Cth} Mäusen eine Strategie verwendet, die auf der Anwendung des bewährten Cre/loxP-Systems basiert (Guo et al., 1997; Reichardt et al., 1999; Nagy, 2000; Gelman et al., 2003; Branda and Dymecki, 2004). Zu diesem Zweck wurde ein Cre-Konstrukt entwickelt, welches nicht nur die spezifische Generierung von CRH-Cre Mäusen ermöglichen sollte, sondern darüber hinaus als universales Instrument zur flexiblen Herstellung verschiedener Promotor-spezifischer Cre-Mäuse eingesetzt werden kann. Das Cre Konstrukt selbst besteht in der Basisversion aus Spleiß-Akzeptor, Selektions-/Stopkassette (mit Neomycin als Resistenzmarker), Cre-Rekombinase und dem über eine IRES-Sequenz mit Cre verbundenen Venus Fluoreszenzprotein als Reporter (Abbildung 23). Um eine zeitliche Induktion der Cre-Rekombinase zu ermöglichen wurde ein alternatives Konstrukt hergestellt, dass statt der konstitutiven Cre-Rekombinase die durch Tamoxifen induzierbare CreERT2-Rekombinase besitzt. Da die entsprechenden Konstrukte an ihren beiden Flanken jeweils eine multiple-cloning-site aufweisen, ist es möglich durch Wahl und Anfügen der geeigneten Homologiearme (deren Flanken während einer präparativen Amplifikation mit den entsprechenden Restriktionsschnittstellen versehen werden müssen) die Cre-Konstrukte per homologer Rekombination gegen prinzipiell jedes gewünschte Exon auszutauschen und damit unter die Kontrolle jedes erwünschten Promotors zu stellen. Da die Selektions-/Stopkassette mit FRT-Sequenzen flankiert ist, bietet dies darüber hinaus die Möglichkeit die Cre-Expression selbst zu regulieren. In Mauslinien, in denen das Cre-Konstrukt mit Stopkassette vorhanden ist, könnte so z.B. durch Injektion mit Flp-Rekombinase exprimierenden Viren oder durch Kreuzung mit spezifisch exprimierenden Flp-Mäusen die Cre-Expression zeitlich und gewebsspezifisch induziert werden. Um über Cre-Konstrukte zu verfügen, bei denen die Cre-Rekombinase nicht erst durch die Flp-Rekombinase aktiviert werden muss, wurden zwei weitere Kassettenvarianten mit deletierter Selektions-/Stopkassette hergestellt. Somit wurden insgesamt vier verschiedene Variationen des Cre-Konstrukts kloniert: eine

Cre-Kassette mit Selektionskassette, eine Cre-Kassette ohne Selektionskassette, eine CreERT2-Kassette mit Selektionskassette und eine CreERT2-Kassette ohne Selektionskassette. Die mittels HEK293-Zellen Transfektion durchgeführte Funktionsanalyse konnte zeigen, dass 1. die Funktionalität der (die Selektionskassette flankierenden) FRT-Sequenzen intakt ist und eine Flp-Rekombinase katalysierte Deletion in eukaryotischen Zellen ermöglicht (Abbildung 25), 2. der Transkriptions- und Translationsmechanismus der Cre-/CreERT2-Rekombinase sowie des Venus Reporterproteins intakt ist (Abbildung 26 und Abbildung 27), 3. die enzymatische Funktionalität der Cre-/CreERT2-Rekombinase nicht beeinträchtigt ist, bzw. loxP-Sequenzen erkannt und die von ihnen flankierten Sequenzen deletiert werden können (Abbildung 27), 4. die Induzierbarkeit von CreERT2 durch Tamoxifen gegeben ist (Abbildung 27) und 5. der Spleiß-Akzeptor prinzipiell ein korrektes Spleißen von CRH-Exon 1 an die Cre-Kassette ermöglicht (Abbildung 28).

Fosmid- und BAC-Vektoren, deren Insertionen aus murinen, den CRH-Locus enthaltenden Chromosomenfragmenten bestehen, wurden eingesetzt, um mittels ET-Klonierung Exon 2 des CRH Gens gegen die Cre-Kassetten auszutauschen (Cre und CreERT2 mit Selektionskassette). Durch die Verwendung relativ langer genomischer DNA Fragmente sollte dabei gewährleistet werden, dass alle potentiellen regulatorischen Elemente der CRH-, bzw. Cre-Expression auf dem Transgen enthalten sind. Erfolgreiche homologe Rekombinationen konnten sowohl auf dem verwendeten Fosmid-Klon WI1-1975E16 als auch in dem verwendeten BAC-Klon RPCI24-212D10 verifiziert werden (Abbildung 30). Zusätzlich zu den so entstandenen CRH-Cre und CRH-CreERT2 Transgenen wurden durch nachträgliche Entfernung der Selektionskassette zwei weitere Transgene ohne Selektionskassette geschaffen, und zwar jeweils in der Fosmid- als auch in der BAC-Variante. Zusammenfassend wurden auf diese Weise insgesamt acht verschiedene CRH-Transgene entwickelt, die 1. entweder die konstitutive Cre oder die CreERT2 besitzen, 2. deren Neomycin-Selektionskassette vorhanden oder deletiert ist oder 3. aus der homologen Rekombination mit dem Fosmid-Klon WI1-1975E16 oder dem BAC-Klon RPCI24-212D10 hervorgegangen sind (Tabelle 1).

5.2.2 Generierung der Linie CRH-COE_{Crh}

Über die Elektroporation des Fos-Cre^{Neo}-Transgens in ES-Zellen und die anschließende Injektion Transgen-positiver ES-Zellklone in Blastocysten (Abbildung 32), konnte eine Chimäre erhalten werden, die das Transgen über die Keimbahntransmission weitergab und mit deren Hilfe schließlich die Mauslinie CRH-Cre etabliert werden konnte. Die Entfernung der noch vorhandenen Selektionskassette wurde über einer Kreuzung der CRH-Cre Mäuse mit der konstitutiv Flp-Rekombinase exprimierenden Linie hACTB-Flpe erreicht. Nachkommen, deren Selektionskas-

setten-Deletion verifiziert werden konnte, wurden mit dem Stamm CRH-COE verpaart um heterozygote, CRH-spezifisch überexprimierende CRH-COE_{Crh} Mäuse (CRH-COE^{het}) sowie Cre-negative Kontrolltiere (CRH-COE^{con}) zu erhalten. Die Verpaarung von CRH-COE^{het} Tieren mit dem Stamm CRH-COE führte zum Erhalt von homozygot CRH-überexprimierenden CRH-COE^{hom} Mäusen.

5.2.3 Expressionsmuster der Linie CRH-COE_{Crh}

5.2.3.1 Cerebrales Expressionsmuster

Ziel der vorliegenden Arbeit war es eine CRH-Überexpression in den Gehirnsstrukturen herbeizuführen, die als Bereiche endogener CRH-Sekretion bekannt sind. Hierzu gehören vor allem paraventriculäre Nucleus des Hypothalamus, die zentrale Amygdala, der Hippocampus, der BNST, Cortex und einige Kerne des Hinterhirns und des Hirnstamms (Swanson et al., 1983; Bale and Vale, 2004). Die Detektion von Cre mRNA in CRH-Cre Mäusen, aber auch die später beobachtete Expression von CRH mRNA, Cre mRNA und LacZ mRNA in CRH-COE_{Crh} Tieren sowie die Expressionsanalyse über LacZ-Färbung auf R26^{+LacZ}CRH-Cre Mäusen weisen dagegen auf eine ektopische, nicht völlig CRH-spezifische Expression des Cre-Transgens hin (Abbildung 33, Abbildung 43, Abbildung 44, Abbildung 34). Zu den Gehirnarealen, in denen die Cre-Rekombinase Transkription festgestellt werden konnte gehören: cerebraler Cortex, der anteriore Bulbus olfactorius, die Area piriformis, Teilgebiete des Thalamus, die laterale und basolaterale Amygdala, die Projektionen innerhalb des Corpus callosum, Hippocampus, Cerebellum und einige Kerngebiete des Hypothalamus und der Medulla. Die stärkste Expression ist im cerebralen Cortex, im Bulbus olfactorius, in der Area piriformis und in den Thalamuskernen zu beobachten. Zu den CRH-spezifischen Strukturen des PVN, der zentralen Amygdala und des BNST konnte keine Expression detektiert werden.

Gebiete mit räumlich eingeschränkterem oder schwächerem Signalmuster konnten erst mittels LacZ-Färbung sichtbar gemacht werden (Abbildung 34). Es handelt sich hierbei wahrscheinlich um den ventral in der Hypophyse gelegenen Nucleus mammillaris, den ventral des vierten Ventrikels im Pons befindlichen Nucleus vestibularis und einen nicht näher bestimmbar, im ventralen Teil der Medulla gelegenen Nucleus, bei dem es sich eventuell um den magnozellularen Teil des lateralen Nucleus reticularis handeln könnte. Es ist zwar nicht bekannt, ob die genannten Strukturen in der Maus CRH endogen exprimieren, doch ist auffällig, dass von Sakanaka et al. (Sakanaka et al., 1987) CRH-Immunreaktivität im Nucleus supramammillaris, Nucleus vestibularis und im lateralen Nucleus reticularis der Ratte detektiert wurde. Es kann daher nicht völlig ausgeschlossen werden, dass es sich bei den erwähnten Nuclei um Teile des nativen CRH-

System handelt, deren CRH mRNA/CRH-Protein Konzentrationen im Wildtyp zu niedrig sind, um mittels In-Situ-Hybridisierung oder Immunohistochemie deutlich sichtbar gemacht werden zu können. Andererseits kann von mRNA und/oder Protein Expressionsmustern, die in der Ratte beobachtet werden nicht zwingend auf ein identisches Muster in der Maus geschlossen werden. Ob CRH in der Maus tatsächlich endogen in den oben erwähnten Strukturen exprimiert wird bleibt deshalb vorerst ungeklärt.

Aufgrund der zahlreichen, eng aneinander grenzenden Nuclei des Thalamus gestaltet es sich schwierig das schmetterlingsförmige Signalmuster in der Region des Thalamus näher zu differenzieren und einzuordnen. Nuclei die möglicherweise Teil des beobachteten Expressionsgebiets sein könnten sind der posteriore thalamische Nucleus (Po), das Forel-Feld (PR), der im Englischen bezeichnete rostral interstitial nucleus of medial longitudinal fasciculus (RI), der ventrale posteromediale thalamische Nucleus (VPM), der anteromediale thalamische Nucleus (AM), der anteroventrale thalamische Nucleus (AVVL) und der zentrale mediale thalamische Nucleus (CM). Über die Existenz eines thalamischen CRH-System ist bisher nur wenig bekannt. Einige Studien legen jedoch nahe, dass CRH auch in thalamischen Kernen exprimiert wird (Merchenthaler et al., 1984; Sakanaka et al., 1987; Hsu et al., 2001). Interessanterweise konnten in den entsprechenden Publikationen einige der Thalamusstrukturen als CRH-immunreaktiv identifiziert werden, die auch in der vorliegenden Arbeit als mögliche CRH-Cre Expressionsbereiche in Betracht gezogen werden, wie der Po, der VPM und der CM.

Eine nähere Betrachtung des cerebralen Cortex legt die Vermutung nahe, dass das Transgen dort vornehmlich in den Cortexschichten II, III und VI aktiv ist, wenngleich LacZ-positive Neuronen auch in den übrigen Cortexschichten eingestreut sind. Ob dies dem endogenen CRH-Muster entspricht kann an dieser Stelle nicht völlig geklärt werden. Von immunohistochemischen Analysen ist bekannt, dass CRH in den Interneuronen der Cortexschichten II und III stark vertreten ist (Swanson et al., 1983). Ein Vergleich mit dem *Allen Mouse Brain Atlas* (<http://mouse.brain-map.org>) legt jedoch auch eine CRH-Expression in Rindenschicht V/VI nahe. Da sich die Expression des CRH-Cre Transgens gut sichtbar auf die äußeren und inneren Cortex-Bereiche erstreckt, könnte der Cortex einen Bereich CRH-spezifischer Überexpression darstellen. Untermi- niert wird diese Vermutung allerdings durch die Ergebnisse aus der Kreuzung von CRH-Cre und $Crhr1^{loxP-GFP}$ Mäusen (Abbildung 38). So zeigt die Analyse der als $Crhr1^{+/loxP-GFP}$ CRH-Cre bezeichneten Nachkommen dieser Verpaarung, dass das CRH-Cre Transgen nicht nur in GABA- ergen Interneuronen, sondern teilweise auch ektopisch in corticalen, glutamatergen und CRH-R1 exprimierenden Prinzipalneuronen exprimiert wird. Da diese zum größten Teil in Rindenschicht

IV lokalisiert sind (Justice et al., 2008), bedeutet dies, dass auch das Transgen teilweise in dieser corticalen Schicht ektopisch aktiv sein muss.

Die im Cerebellum beobachteten Expressionssignale können wahrscheinlich größtenteils der Körnerzellschicht (Stratum granulosum) zugeordnet werden. Die Morphologie der LacZ-positiven, um den arbor vitae angeordneten Zellen legt dabei die Vermutung nahe, dass es sich um Interneuronen handeln könnte. Auch hier handelt es sich sehr wahrscheinlich um den Effekt einer ektopischen Expression, da keinerlei Daten über die Expression von endogenem CRH in Zellen innerhalb des Cerebellums bekannt sind (Swanson et al., 1983; Sakanaka et al., 1987).

Neben den beschriebenen Expressionsgebieten, die mehr oder weniger distinkt abgegrenzt werden konnten, zeigten sich in der LacZ-Färbung aber auch zahlreiche einzelne LacZ-positive Zellen die innerhalb des Mittelhirns, des Hypothalamus, des Pons und des Hirnstamms als weitflächig verstreute Signale wahrgenommen werden konnten. Zusammenfassend lassen sich bezüglich der Cre mRNA Expression folgende Aussagen treffen: 1. Es gibt Gehirnregionen in denen das CRH-Cre Transgen in einem dem endogenen CRH ähnlichen Muster exprimiert wird (Cortexschicht II und III, Hippocampus). 2. In den Gehirnstrukturen, in denen endogenes CRH typischer Weise exprimiert wird findet keine Expression des Transgens statt (wie z.B. PVN, zentrale Amygdala, BNST). 3. Das Transgen wird überwiegend in Gehirnstrukturen exprimiert, die nicht zu den CRH-spezifischen Expressionarealen zählen (wie z.B. einige Thalamuskern, laterale und basolaterale Amygdala und Cerebellum). Die Transgen-exprimierenden Zellen treten dabei entweder als klar abgrenzbare Strukturen (wie z.B. im Thalamus) oder als eine Vielzahl verstreuter, einzelner Zellen auf (wie z.B. im Mittelhirn und im Pons).

Ab welchem Zeitpunkt die Expression des Transgens stattfindet konnte nicht exakt ermittelt werden. Die Expressionsanalysen in Embryos legen aber nahe, dass das CRH-Cre Transgen nicht vor Embryonaltag 13 transkribiert wird (Abbildung 39).

Abschließend soll an dieser Stelle kurz auf die bekannten Funktionen der Gehirnbereiche eingegangen werden, die im Rahmen der beschriebenen Analyse als Cre-exprimierend identifiziert werden konnten. Neben dem cerebralen Cortex sind Teile des Thalamus die Gebiete mit der stärksten Expression des Transgens. Bezüglich seiner Funktion gilt der Thalamus als übergeordnete Schaltstelle für die wichtigsten sensorischen Systeme und stellt damit einen integrativen Knotenpunkt zwischen Sensorik und Großhirn dar (Trepel M., 2004). Die Nuclei mammillares werden auch als Mammillarkörper bezeichnet und sind sowohl in der Verarbeitung olfaktorischer Informationen als auch in Gedächtnis-spezifischen Prozessen involviert (Vann and Aggleton, 2004). Der in dieser Arbeit genannte Nucleus vestibularis besteht eigentlich aus vier Kerngebieten, welche das wichtigste Koordinationszentrum für Gleichgewichtsinformationen darstel-

len (Trepel M., 2004). Die Medulla (eigentlich Medulla oblongata) gilt als Fortsetzung des Rückenmarks und beherbergt lebenswichtige Kerne des autonomen Nervensystems, die für Atmung, Herzschlag und Darmfunktion verantwortlich sind. Das Cerebellum schließlich hat die Aufgabe die Motorik zu koordinieren und spielt eine Rolle bei wichtigen Aspekten des Lernens und des Gedächtnisses (Trepel M., 2004).

5.2.3.2 Peripheres Expressionsmuster

Wie bereits in der Einleitung geschildert, beschränkt sich die Expression des CRH-Peptids nicht nur auf das zentrale Nervensystem, sondern erstreckt sich auch auf zahlreiche periphere Organe wie z.B. Leber, Lunge, Magen, Duodenum, Haut, Plazenta, Hoden und Herz. Der Großteil der Daten, die diesen Beobachtungen zu Grunde liegen stammt dabei aus Gewebeanalysen von Ratten oder Menschen. Periphere Expression von CRH konnte aber auch in murinen Geweben, wie Lunge, Nebenniere, Hypophyse, Hoden, Ovar, Herz und Milz demonstriert werden (Muglia et al., 1994). Die Analyse der in Abbildung 35 dargestellten peripheren Organe von R26^{+LacZ}CRH-Cre Mäusen im Vergleich mit den Organen einer Kontrollmaus ergab in fast allen untersuchten Geweben keinerlei spezifisches LacZ-Signal, mit einer Ausnahme: R26^{+LacZ}CRH-Cre Männchen weisen neben einer unspezifischen Färbung des Nebenhodens (die auch bei Kontrolltieren auftritt) eine stark ausgeprägte, spezifische β -Gal Aktivität im Hodengewebe auf. Die in Abbildung 35 sichtbare LacZ-Färbung des Magens, des Darm und des Pankreas wurden auch in Kontrolltieren detektiert und stellen bekannte Bereiche unspezifischer β -Gal Aktivität dar (Adams and Gale, 2006). Warum die Organe, in denen die Existenz von CRH beschrieben wurde keine CRH-Cre vermittelte LacZ-Färbung aufzeigen, kann vorerst nicht beantwortet werden, kann aber als weiteres Indiz für eine nicht CRH-spezifische Expression des Transgens gewertet werden. Zu beachten ist jedoch, dass die Organe als Ganzkörperpräparate untersucht wurden und LacZ-positive Zellen, die sich eventuell im Inneren der Organe befinden nicht detektiert werden können. Dieser falsch negative Effekt könnte auch auftreten, wenn nur eine kleine Subpopulation des entsprechenden Organs eine LacZ-Färbung aufweist und die Sensitivität der β -Gal Reaktion nicht ausreicht um diese Subpopulation orten zu können.

In Anbetracht der nicht dem endogenen CRH-Expressionsmuster entsprechenden Expression der Cre-Rekombinase im Gehirn muß auch die Möglichkeit in Erwägung gezogen werden, dass die fehlende LacZ-Färbung in den peripheren Geweben ebenfalls eine Folge dieser ektopischen Aktivität des Transgens ist. Dies würde bedeuten, dass die Expression der Cre mRNA in den entsprechenden Organen unerwünschterweise nicht stattfindet, bzw. unterdrückt wird.

Die nähere Untersuchung der Cre-Expression im Hoden von R26^{+LacZ}CRH-Cre Männchen deutet darauf hin, dass sich die Aktivität des CRH-Cre Transgens auf Zellen des Keimepithels der

Hoden erstreckt. Die Expression von Cre- und Venus-Protein innerhalb des Keimepithels ließ sich dabei in histologischen Schnitten mit Hilfe der LacZ-Färbung und einem gegen Venus gerichteten Antikörper validieren (Abbildung 36, Abbildung 37). Dass das CRH-System auch im Hodengewebe präsent ist wurde bereits in mehreren Publikationen gezeigt (Thompson et al., 1987; Yoon et al., 1988; Fabbri et al., 1990; Dufau et al., 1993; Muglia et al., 1994). Innerhalb des Hodens ist CRH dabei sowohl innerhalb der Leydig-Zellen (welche Testosteron sekretieren und dadurch die Samenbildung stimulieren), als auch in Keimzellen lokalisiert (Yoon et al., 1988). Diese Beobachtungen lassen sich auch mit der intensiveren, zirkulär um das Lumen der Samenkanälchen (Tubuli seminiferi) angeordneten LacZ-Färbung der $R26^{+/LacZ}$ CRH-Cre Männchen zur Deckung bringen. Die Aktivität des CRH-Cre Transgen innerhalb des Keimepithels des Hodens würde in diesem Fall somit zumindest teilweise der endogenen CRH-Spezifität entsprechen. Innerhalb der Linie CRH-COE_{Crh} konnte beobachtet werden, dass insgesamt ca. 24 % der CRH-COE^{hom} Nachkommen, die von einem CRH-COE^{het} Männchen abstammten eine Deletionsbande in der Genotypisierung zeigten, was auf eine frühzeitige Aktivierung des R26 Locus in Spermienzellen hinweist. Es wäre vorstellbar, dass dieser Effekt durch die Expression des CRH-Cre Transgens in den männlichen Keimzellen induziert wird, sobald sich sowohl das CRH-Cre Transgen als auch ein Cre-Rekombinase sensitives R26-Allel innerhalb desselben Spermatozyten befindet. Die Tatsache, dass der prozentuale Anteil von Tieren mit Deletion innerhalb eines Wurfes durchschnittlich 55 % beträgt, läßt vermuten, dass die Cre-induzierte Deletion während der Spermatogenese vornehmlich nach der ersten Reifeteilung (Meiose I) stattfindet. Eine vorzeitige Aktivierung der Cre-Rekombinase würde sich dann nämlich nur noch auf zwei der vier aus einem Spermatogonium hervorgehenden Spermiden, bzw. Spermien auswirken. Angesichts der starken transgenen Expression innerhalb des Keimepithels stellt sich allerdings die Frage, warum sich in der überwiegenden Zahl der Würfe keine Tiere mit Deletionen befanden. Über die Effekte einer CRH-Hypersekretion innerhalb des Keimepithels kann nur spekuliert werden. Es wird angenommen, dass CRH innerhalb der Hoden (und dort speziell innerhalb der Leydig-Zellen) an einen inhibitorischen Regelkreis beteiligt ist, der auf die Sekretion von Androgen und β -Endorphin modulierend einwirkt. Gemäß seiner Funktion als Stress-Hormon wird CRH dabei eine antireproduktive Wirkung zugeschrieben (Dufau et al., 1993). Ob die CRH-Überexpression in den Hoden von CRH-COE_{Crh} Männchen zu einer Veränderung der testikulären Androgen/ β -Endorphin Sekretion führt bleibt eine offene Frage. Bezüglich Fertilität und Reproduktionsrate konnten aber innerhalb der Linie CRH-COE_{Crh} keinerlei Beeinträchtigungen, bzw. antireproduktive Effekte beobachtet werden.

5.2.4 Mögliche Ursachen der unspezifischen Expression des CRH-Cre Transgens

Die Tatsache, dass das CRH-Cre Transgen nicht CRH-spezifisch exprimiert wird und als Folge davon keine CRH-spezifische CRH-Überexpression in CRH-COE_{Crh} Mäusen induziert wird, wirft die Frage auf, welche Ursachen für diesen Effekt verantwortlich sein könnten. Da die qualitative und quantitative Expression von Genen maßgeblich von der Anwesenheit und Zugänglichkeit regulatorischer DNA-Motive abhängt (welche die Bindung von Transkriptionsfaktoren und Polymerasen gewährleisten), wäre zu überlegen, ob das transgene Expressionsmuster durch das Fehlen essentieller regulatorischer Elemente innerhalb des CRH-Cre Transgens bedingt ist. Da das Konstrukt eine Größe von ca. 44 kb hat und der stromaufwärts des CRH-Locus gelegene Bereich eine Länge von ca. 30 kb, bzw. der stromabwärts gelegene Bereich eine Länge von ca. 11 kb aufweist, würde dies bedeuten, dass sich ein Teil der regulatorischen Elemente des CRH-Locus in mehr als 30 kb und/oder 11 kb Entfernung vom CRH-Transkriptionsstart befindet. Ob das CRH Gen tatsächlich über solch relativ weit entfernte Motive beeinflusst wird ist nicht bekannt. Alle bisher bekannten CRH-spezifischen Regulationselemente (wie z.B. TATA Box, CAAT Box, CRE, AP-1 Bindungsstellen oder GRE-Motive) befinden sich innerhalb eines Bereiches, der sich nicht weiter als ca. 900 bp stromaufwärts des Transkriptionsstarts erstreckt (Vamvakopoulos et al., 1990; Seth and Majzoub, 2001; Yao and Denver, 2007). Daher erschien es im Vorfeld der Generierung einer transgenen CRH-Cre Maus als ausreichend, einen Fosmid-Klon mit besagter 30 kb upstream-Sequenz und 11 kb downstream-Sequenz zur Gewährleistung einer CRH-spezifischen Expression einzusetzen. Nichtsdestotrotz kann aber, wie angedeutet, nicht ausgeschlossen werden, dass weiter entfernte Elemente in die Transkriptionssteuerung des endogenen CRH Gens involviert sind. Dass solche aktivierenden (= Enhancer) oder dämpfenden (= Silencer) Elemente mitunter aus sehr großer Entfernung auf ihr Zielgen einwirken können, zeigen die Beispiele des humanen *Sonic Hedgehog* (Shh) Gens, dessen Enhancer ca. 1 Mb vom Shh Gen entfernt ist (Lettice et al., 2003) und des Pax6 Enhancers, welcher sich 200 kb stromabwärts des Pax6 Locus befindet (Griffin et al., 2002). Ermöglicht wird die Fernwirkung von Enhancern und Silencern dabei durch die Chromatinstruktur der DNA. Die kompakte Aufwicklung der DNA in Form von DNA-Histon Komplexen kann zur räumlichen Nähe von DNA Regionen führen, die auf einem linear ausgestreckten DNA-Strang weit voneinander entfernt wären (Rubtsov et al., 2006). Dementsprechend könnte die ektopische CRH-Cre Expression auf die Abwesenheit CRH-spezifischer Silencer (oder anderer Elemente, welche die Funktion eines potentiellen CRH-Enhancers einschränken) in CRH-Cre Tieren zurückzuführen sein. Es ist aber auch vorstellbar, dass nicht die Abwesenheit, sondern die Anwesenheit von Enhancern/Silencern

die Regulation des Transgens unerwünscht beeinflusst. Die zufällige Integration des CRH-Cre Transgens in das murine Genom, könnte bewirken, dass das Transgen unter die Kontrolle von Enhancern/Silencern gerät, welche normalerweise für die Regulation von Genen verantwortlich sind, die sich im Bereich des Insertionslocus befinden. Dieser als Positionseffekt bezeichnete Mechanismus konnte in zahlreichen transgenen Tieren und Pflanzen beobachtet werden und wird hauptsächlich über die Wirkung von Enhancern, Silencern, Promotoren oder Heterochromatin-Konformationen vermittelt (Wilson et al., 1990). In Anbetracht der ektopischen CRH-Cre Expression ist es also denkbar, dass ein „fremder“ Enhancer eine uneingeschränkere Transkription der Cre-Rekombinase induziert. Da sich ein solcher Enhancer hunderte von Kilobasen stromauf- oder abwärts des transgenen Insertionslocus und sowohl innerhalb eines Exons als auch eines Introns befinden könnte, konnte den sich daraus ergebenden zahlreichen Möglichkeiten eines Enhancer-vermittelten Positionseffekts innerhalb der vorliegenden Arbeit nicht weiter nachgegangen werden.

Neben der erwähnten möglichen Fehlregulation der Transkriptionsinitiation, kann aber auch ein "promiskes", bzw. aberantes Spleißen eventuell Ursache der beobachteten Expression des Transgens sein. Gemeint ist damit die Möglichkeit, dass Gene (bzw. deren Exons), die in der Nähe des transgenen Insertionslocus liegen, an die Cre-Kassette des CRH-Cre Transgens spleißen und dieser somit ihr Expressionsmuster aufoktroyieren. Die Expressionsmuster von sieben Genen, die dem (per SPLK PCR) identifizierten Integrationsort des CRH-Cre Transgens auf dem langen Arm von Chromosom 8 (Abbildung 40) am nächsten liegen, korrespondieren jedoch nicht mit dem transgenen Expressionsmuster und können deshalb diese Vermutung nicht untermauern. Ein Spleißing an weiter entfernt liegende Gene wird mit zunehmender Distanz immer unwahrscheinlicher, da dies eine stabile prä-mRNA Länge von mehreren zehntausend Kilobasen voraussetzen würde. Dass derart lange Primärtranskripte dennoch existieren beweist das humane Dystrophin-Gen, welches sich als das längste Gen im menschlichen Genom über eine Länge von 2,5 Mb erstreckt und dessen cDNA eine Länge von 14 kb besitzt (Koenig et al., 1987).

Einen gewichtigen Hinweis auf eine mögliche Dysregulation des Transgen-Spleißings ergibt sich aus den Sequenzierungsergebnissen der 5` RACE PCR (Abbildung 42). Diese deuten darauf hin, dass ein 115 bp langer Teilbereich des CRH-Introns unerwarteterweise an die Cre-Kassette des Transgens gespleißt wird. Gleichzeitig konnten mittels RT-PCR aber auch Hinweise auf ein "ordentliches" Spleißing von CRH-Exon 1 an die Cre-Kassette gefunden werden (Abbildung 41). Dass das Intron Fragment tatsächlich gespleißt wurde und kein Amplifikationsprodukt genomischer DNA ist, ist allein schon aus der Lage des Intron-Fragments innerhalb des genomischen CRH-Locus ersichtlich. So liegen zwischen dem 3`-Ende des Intron Fragments und dem Beginn

des transgenen Spleiß-Akzeptor 190 bp, deren Fehlen innerhalb des 5`RACE Produkts nur durch Spleißing zu erklären ist. Eine wichtige Rolle innerhalb der Spleißing-Reaktion spielen die Spleißstellen. Diese befinden sich an den Exon/Intron Übergängen, bzw. an den äußersten Flanken der Introns und ermöglichen dem Spleißapparat dadurch die Erkennung der einzelnen zu spleißenden Exons. Die Spleißstelle am 5`-Ende eines Introns enthält dabei das Motiv GT (= Donor), die Spleißstelle am 3`-Ende das Motiv AG (= Akzeptor). Beide Motive werden schließlich während des Spleißing-Vorgangs in Form einer Lariat-Struktur mitsamt des Introns aus der prä-mRNA deletiert (Black, 2003). Interessanterweise wird auch das hier identifizierte Intron-Fragment von einem Spleiß-Akzeptor unmittelbar vor seinem 5`-Ende und einem Spleiß-Donor unmittelbar nach seinem 3`-Ende flankiert. Dies stellt somit ein weiteres starkes Indiz für das Spleißen des Intron-Fragments an die Cre-Kassette dar. Völlig unklar ist jedoch, welche Ursachen diesem ungewöhnlichem Vorgang zu Grunde liegen und ob das fehlerhafte Spleißen eine Erklärung für die unspezifische Expression des Transgens liefern könnte. Verkompliziert wird dies durch die Existenz zweier verschiedener Spleißing-Formen: der normalen Form (CRH-Exon 1 spleißt an die Cre-Kassette) und der mutierten Form (CRH-Intron spleißt an die Cre-Kassette), verbunden mit der Frage, welche Faktoren darüber entscheiden, welche der beiden Spleißformen gebildet wird. Eine erste Überlegung bestand darin, ob es sich bei dem Intron-Fragment eventuell um ein kryptisches Exon handeln könnte, dessen Existenz bisher noch nicht beschrieben wurde. Sowohl die PCR-basierten Ergebnisse der eigenen Folgeversuche als auch veröffentlichte RT-PCR Analysen von CRH mRNA (isoliert aus dem Hypothalamus von Ratten) sprechen aber gegen das Vorhandensein von mRNAs, die durch die Beibehaltung des CRH-Introns (bzw. des Intron-Fragments) gekennzeichnet sind (Blanco et al., 2006). Ein endogenes Spleißen des Intron-Fragments an CRH-Exon 2 oder an das stromabwärts nächst gelegene Gen AC141209.3 kommt daher sehr wahrscheinlich nicht in Betracht. Da die vorgefundene mutierte Spleißform also scheinbar ein spezifischer Effekt des CRH-Cre Transgens ist, stellt sich die Frage, ob spezielle Elemente oder Sequenzmotive des Transgens eine ordentliches Spleißen von Exon 1 an Cre verhindern, bzw. das Spleißen des Intron-Fragments induzieren. Während sich am 3`-Ende des Intron-Fragments (bzw. alternativen Exons) das Motiv eines Spleiß-Donors befindet und das CRH-Intron des Transgens dadurch gespleißt werden kann, konnte im endogenen CRH-Locus keine derartige Spleißingvariante vorgefunden werden. Dies könnte darauf hindeuten, dass im endogenen CRH-Locus ein so genannter Spleiß-Silencer den intronischen Spleiß-Akzeptor funktional inhibiert. Bei Spleiß-Silencern (SS) und Spleiß-Enhancern (SE) handelt es sich um Sequenzen innerhalb der prä-mRNA die durch Bindung von Proteinkomplexen die Verfügbarkeit und/oder Reaktivität von Spleißstellen (Donor, Akzeptor) beeinflussen können. Ent-

sprechend ihrer möglichen Lokalisation unterscheidet man dabei Exon-Spleiß-Silencer (ESS), Exon-Spleiß-Enhancer (ESE), Intron-Spleiß-Silencer (ISS) und Intron-Spleiß-Enhancer (ISE) (Lopez, 1998; Black, 2003; Matlin et al., 2005). Während SS im Stande sind Spleiß-Stellen zu supprimieren und/oder SE zu antagonisieren, üben umgekehrt SE ihre Funktion über die Aktivierung von Spleiß-Stellen und/oder Antagonisierung von SS aus. Bezogen auf den endogenen CRH-Locus wäre somit vorstellbar, dass ein (innerhalb der CRH prä-mRNA befindlicher) SS, welcher im Transgen fehlt, im Wildtyp die intronische Spleißvariante unterdrückt. Da im Rahmen der homologen Rekombination CRH-Exon 2 inklusive 2,2 kb downstream Sequenz gegen die Cre-Kassette ausgetauscht wurden, müßte der hypothetische SS entsprechend in Exon 2 oder innerhalb der stromabwärts gelegenen Sequenz liegen (soweit diese im Primärtranskript enthalten ist), um das Fehlen eines solchen SS-Effekts im transgenen Zustand erklären zu können. Nachteil dieser Theorie ist, dass sie das Fehlen von Exon 1 innerhalb des 5'-RACE Produkts nicht erklären kann. Denn selbst wenn das Intron-Fragment irregulär gespleißt wird, würde dies mechanistisch nicht mit einer Deletion von Exon 1 einhergehen (Black, 2003; Matlin et al., 2005). Das einzige in der Literatur beschriebene Spleiß-Ereignis, bei dem das erste Exon eines Genes wahlweise ausgeschlossen werden kann, macht die Anwesenheit verschiedener Promotoren notwendig, welche die Transkription entweder bei Exon 1 oder bei einem nachfolgenden Exon initiieren (Black, 2003; Matlin et al., 2005; Mitsui et al., 2006). Dies würde bedeuten, dass sich zwischen CRH-Exon 1 und dem Intron-Fragment ein alternatives Promotor-Element befinden müßte, so dass ein zusätzlicher Transkriptionsstart am Intron-Fragment ermöglicht wird. Abgesehen von der Tatsache, dass ein solches intronisches CRH Promotor-Element (soweit bekannt) nicht existiert, würde man dann aber auch die intronische Spleißvariante im Wildtyp erwarten.

Über die Frage, ob das mutierte Spleißprodukt (mit)verantwortlich für die unspezifische Expression des Transgens ist, kann ebenfalls nur spekuliert werden. Exon 1 wird als 5'-UTR zwar nicht translatiert, doch spielen 5'-UTRs grundsätzlich eine maßgebende Rolle bei der Regulation und Stabilisierung von mRNA (Sonenberg, 1994; Pesole et al., 2001). Das Fehlen der 5'-UTR innerhalb der mutierten Spleißvariante könnte deshalb zu einer Veränderung sowohl der Expressionsstärke als auch des Expressionsmusters führen. Wie läßt sich aber erklären, dass sich das Vorhandensein der normalen Spleißvariante in CRH-Cre oder CRH-COE_{Crh} Tieren nicht in einem endogenen, dem CRH entsprechenden Expressionsmuster widerspiegelt? Möglicherweise findet eine Interferenz zwischen normalem und mutiertem Spleißprodukt statt, wengleich sich in der Literatur keine ähnlichen Ereignisse zum Vergleich heranziehen lassen. Die Tatsache, dass im cerebralen Cortex (dessen Analyse die Grundlage der dargestellten Ergebnisse ist) ein relativ

CRH-ähnliches Expressionsmuster vorgefunden wurde, könnte aber auch darauf hindeuten, dass das CRH-Cre Transgen zumindest im Cortex sowohl CRH-spezifisch als auch unspezifisch exprimiert wird. In den Strukturen, die bekanntermaßen CRH exprimieren (wie z.B. Cortexschicht II und III), würde dabei sowohl die normale als auch die mutierte Spleißvariante translatiert werden. In allen anderen CRH-unspezifischen Regionen dagegen nur die mutierte Spleißvariante. Ob dies auch für die subcorticalen Gehirnbereiche angenommen werden kann ist fraglich. Interessant wäre es deshalb diese Bereiche auf Anwesenheit und Verhältnis der beiden Spleißformen zu untersuchen und diejenigen Strukturen gegenüberzustellen, die (bezüglich ihres transgenen Expressionsmusters) entweder dem endogenen CRH-Muster entsprechen (wie z.B. Hippocampus) oder das Transgen ektopisch exprimieren (wie z.B. Cerebellum).

5.2.5 Verhaltensphänotypisierung der CRH-COE_{Crh} Mäuse

Um den Einfluss der CRH-spezifischen Überexpression von CRH auf Lokomotions-, Angst-, oder Depressions-assoziierte Verhaltensweisen zu untersuchen, wurden heterozygote CRH-COE_{Crh} Männchen (CRH-COE^{het}) und Kontrolltiere in den Verhaltenstests „Open-Field“ (OF), „Elevated-Plus-Maze“ (EPM), „Dark-Light-Box“ (DaLi) und „Forced-Swim Test“ (FST) getestet (Abbildung 45). CRH-COE^{het} Tiere zeigten in den einzelnen Test keinerlei signifikante Unterschiede zu den Kontrollgruppen und damit keine Veränderung Angst- oder Depressions-ähnlicher Verhaltensweisen. Aufgrund der Tatsache, dass zum Zeitpunkt der beschriebenen Verhaltensexperimente keine homozygoten CRH-COE Mäuse zur Verfügung standen, kann nicht ausgeschlossen werden, dass die heterozygote CRH-Überexpression nicht ausreicht, um einen verhaltensspezifischen Effekt hervorzurufen (Lu et al., 2008). Zur abschließenden Beurteilung dieser Frage wären deshalb zusätzliche Untersuchungen mit CRH-COE^{hom} Tieren erforderlich. Doch selbst wenn CRH-COE^{hom} Tiere einen markanten Phänotyp aufweisen würden, wäre es diffizil Kausalzusammenhänge zwischen Phänotyp und CRH-Überexpression zu ziehen. Auch hier müssten bezüglich der ektopischen CRH-Überexpression die selben Bedenken angebracht werden wie im nachfolgenden Kapitel „HPA-Achsen Aktivität“ geäußert werden. Voraussetzung um potentielle Phänotypisierungs-Ergebnisse innerhalb der Linie CRH-COE_{Crh} richtig einordnen zu können, ist daher die vollständige, lückenlose Aufklärung und Identifizierung des transgenen Expressionsmusters.

5.2.6 HPA-Achsen Aktivität

CRH-COE^{hom} Mäuse zeigen keine Stress-induzierten Veränderungen ihrer HPA-Achsen Aktivität (Abbildung 46). Dies gilt sowohl für die Corticosteron-Konzentrationen nach 10-minütigem

Stress als auch für die Feedback Werte. Somit scheint die beschriebene cerebrale CRH-Überexpression der CRH-COE_{Crh} Mäuse keinen Einfluss auf die CRH-Sekretion innerhalb des PVN im aktivierten Zustand zu haben. Im unaktivierten, basalen Zustand zeigen CRH-COE^{hom} Mäuse nachmittags jedoch eine signifikante, im Mittel um ca. 30 % geringere Corticosteron-Sekretion als Kontrolltiere. Innerhalb der Vormittagswerte konnte zwar kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den beiden Versuchsgruppen gefunden werden, doch zeigt der niedrigere Corticosteron-Mittelwert der CRH-COE^{hom} Tiere (16,34 ng/ml gegenüber 24,4 ng/ml) tendenziell in die gleiche Richtung. Da der zirkadiane Anstieg des Corticosteron-Spiegels (zu sehen an den höheren Nachmittagswerten im Vergleich zu den Vormittagswerten) in den CRH-COE^{hom} Mäusen nicht gestört ist, scheint keine grundlegende Beeinträchtigung des zirkadianen Steuerungsmechanismus der HPA-Achse vorzuliegen. Der wichtigste Schrittmacher zirkadianer Rhythmen im zentralen Nervensystem von Säugetieren ist der Nucleus suprachiasmaticus (SCN), welcher für die tageszeitliche Regulation und Aktivierung vegetativer Funktionen wie Schlaf-/Wachrhythmus, Nahrungsaufnahme und Lokomotion sowie für eine Vielzahl hormoneller Sekretionsrhythmen verantwortlich ist (Rusak and Zucker, 1979). Daneben beeinflusst der SCN auch die Aktivität des PVN und damit die tagesperiodische Sekretion von Corticosteron (Kalsbeek et al., 1992; Buijs et al., 1999; Engeland and Arnhold, 2005). Der SCN wäre deshalb ein möglicher Ansatzpunkt bei der Suche nach funktionellen Strukturen, die bei der beobachteten Dämpfung der basalen HPA-Achsen Aktivität involviert sein könnten. Ob die CRH-Überexpression in CRH-COE^{hom} Mäusen tatsächlich Einfluss auf die Aktivität und/oder Funktionalität des SCN hat muss bis dato unbeantwortet bleiben. Zumindest deuten die Expressionsanalysen darauf hin, dass das CRH-Cre Transgen weder innerhalb des SCN selbst aktiv ist, noch innerhalb der Strukturen exprimiert wird, aus denen der SCN bekanntermaßen Afferenzen erhält, wie z.B. Nucleus raphè, paraventriculärer Thalamus oder laterales Septum (Moga and Moore, 1997). Es wäre auch vorstellbar, dass die Überexpression von CRH direkt oder indirekt zu einer basalen Herunterregulierung von endogenem CRH im PVN führt. Die reduzierte CRH-Expression wäre dann noch ausreichend, um die basale Corticosteron-Sekretion am Vormittag auf einem physiologischem Niveau zu halten, würde sich aber dann vor allem am Nachmittag bemerkbar machen, wenn die basale CRH-Sekretion normalerweise ihren Höhepunkt erreicht. Da innerhalb der Stressantwort zusätzliche Gehirnstrukturen Einfluß auf die CRH-Regulation im PVN haben und diese forcieren können (wie z.B. die Amygdala), könnte die Stress-induzierte Hochregulierung von CRH trotz der in diesem Fall angenommenen niedrigeren Expression von endogenem CRH ausreichen, um die beobachteten Corticosteron-Konzentrationen zu gewährleisten. Eine Untersuchung der Expression von endogenem CRH im Gehirn von CRH-COE_{Crh} Mäusen mittels In-Situ-Hybridisierung würde zur Überprüfung dieser

Mäusen mittels In-Situ-Hybridisierung würde zur Überprüfung dieser Hypothese beitragen, konnte jedoch aus zeitlichen Gründen nicht mehr durchgeführt werden.

Die starke Expression des Transgens im Thalamus sowie Versuche, in denen die CRH mRNA Expression im Thalamus untersucht wurde, eröffnen die Möglichkeit für ein weiteres Modell zur Erklärung der gedämpften HPA-Grundaktivität. So konnte innerhalb der thalamischen CRH mRNA Expression eine tageszeitliche Periodizität erkannt werden, wobei die niedrigste CRH mRNA Konzentration mit der höchsten Corticosteron-Konzentration koinzidierte und scheinbar nicht von endogenem Corticosteron reguliert wird (Kwak et al., 1993; Hsu et al., 2001; Hsu et al., 2003). Falls dieser Koinzidenz tatsächlich ein kausaler Zusammenhang zu Grunde liegt, würde dies bedeuten, dass eine niedrige CRH-Expression im Thalamus direkt oder indirekt zu einer Aktivierung der HPA-Achse beiträgt. Eine thalamische CRH-Überexpression wie im Falle der CRH-COE_{Crh} Tiere könnte demnach die periodische Erniedrigung der endogenen CRH-Konzentration im Thalamus kompensieren und somit die HPA-Aktivierung dämpfen, bzw. den Anstieg der Corticosteron-Sekretion abbremsen.

Ein grundlegendes Problem bei der Interpretation der Corticosteron-Daten ist die Tatsache, dass aufgrund der unspezifischen Expression des CRH-Cre Transgens das vollständige Spektrum, bzw. die Reichweite der CRH-Überexpression innerhalb der CRH-COE_{Crh} Tiere nicht eindeutig abgeschätzt werden kann. Es ist deshalb nicht ausreichend klar, in welchen Gehirnstrukturen CRH hypersekretiert wird (abgesehen von den Strukturen die innerhalb des Expressionsanalyse sicher identifiziert werden konnten), bzw. welche neuronalen Populationen und Transmittersysteme betroffen sind. Die Frage, in wie weit der beobachtete Corticosteron-Effekt auf die CRH-Hypersekretion bestimmter Gehirnstrukturen zurückgeführt werden kann, gestaltet sich schwierig, wenn Unklarheit über das Ausmaß der CRH-Hypersekretion besteht.

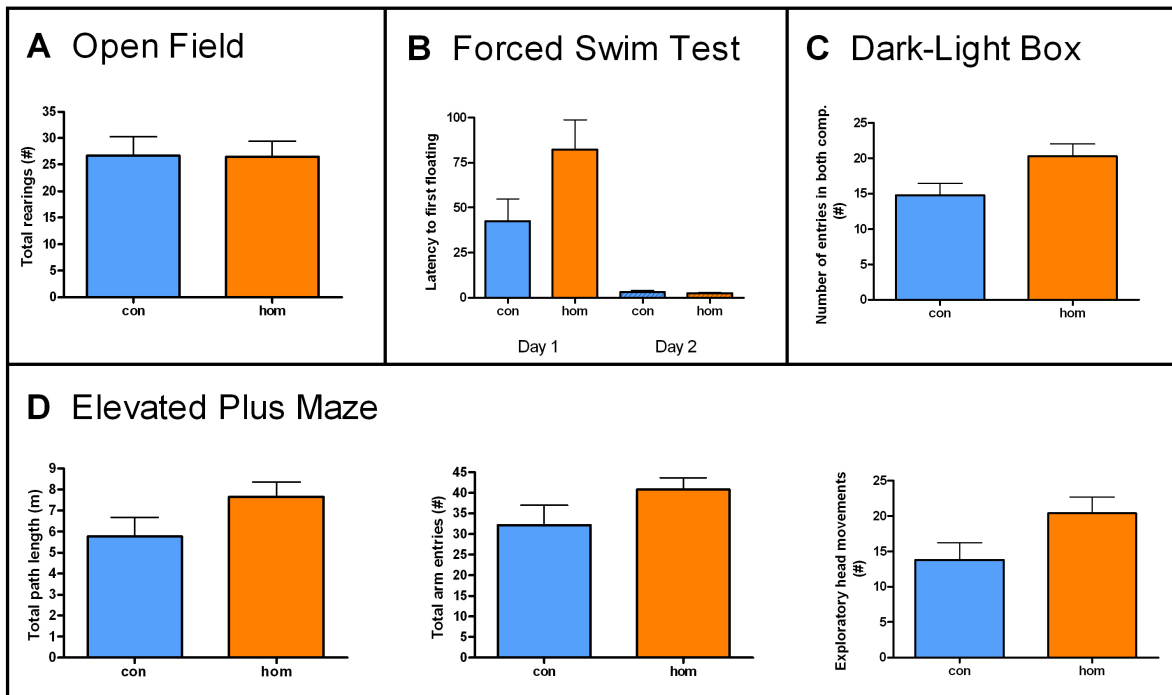
6 Zusammenfassung

Das Corticotropin-freisetzende Hormon (im englischen Sprachgebrauch: Corticotropin-Releasing Hormone/Factor = CRH/CRF) ist als Regulator der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren Achse (HNN-Achse oder auch HPA-Achse) nicht nur eines der wichtigsten Schlüssel-Hormone innerhalb der physiologischen Stress-Antwort, sondern koordiniert als Neuropeptid auch Stress-assoziierte Verhaltensweisen und Gehirnfunktionen. Daneben legen klinische Studien und Tierexperimente nahe, dass Fehlregulationen des CRH-Systems an der Entstehung und Ausprägung affektiver Erkrankungen und Angsterkrankungen beteiligt sind. Insbesondere die Krankheitsform der endogenen Depression wird mit einer cerebralen Hypersekretion von CRH in Zusammenhang gebracht. Um die Effekte einer zentralen CRH-Hypersekretion *in vivo* studieren zu können, war es Ziel der Arbeit zwei transgene CRH-überexprimierende Mauslinien zu generieren. Eine Mauslinie sollte dabei CRH in GABA-ergen Interneuronen überexprimieren (CRH-COE_{Dlx}), die andere in endogen CRH-exprimierenden Zellen (CRH-COE_{Crh}). Das Grundprinzip für die Herstellung der konditional CRH-überexprimierenden (CRH-COE) Mauslinien beruht dabei auf der Verwendung des Cre/loxP Systems und der Mauslinie CRH-COE, in deren ROSA26 (R26) Locus eine Kopie der murinen CRH cDNA inseriert wurde (Lu et al., 2008). CRH-COE_{Dlx} Tiere wurden durch Kreuzung von Dlx5/6-Cre Mäusen mit der Linie CRH-COE erhalten und zeigen eine hyperreaktive HPA-Achse sowie signifikant reduziertes Angstverhalten. Ob die Ursache des unerwarteten Phänotyps eine Folge kompensatorischer Gegenregulationen, veränderter GABA-/CRH-Transmission oder anderer nicht näher spezifizierbarer Mechanismen ist bleibt unklar. Bezüglich Depression-ähnlichem Verhalten scheinen GABA-erge Interneuronen als Wirkort hypersekretorischer CRH-Effekte keine Rolle zu spielen.

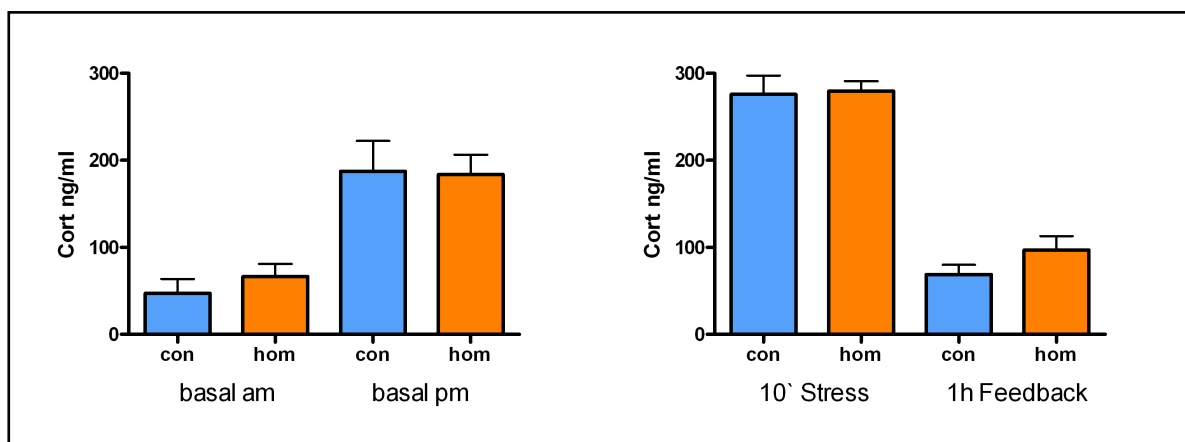
Die Generierung der Linie CRH-COE_{Crh} erfolgte über die Konstruktion eines Fosmid-basierten Expressionsvektors, dessen Insertion in das murine Genom zur Erzeugung der Mauslinie CRH-Cre und der anschließenden Kreuzung von CRH-Cre und CRH-COE Mäusen. CRH-Cre, bzw. CRH-COE_{Crh} Tiere zeigen dabei nicht die erwünschte CRH-spezifische Expression des Transgens. Zu dem Gehirnstrukturen, in denen das Transgen unter anderem transkribiert wird gehören cerebraler Cortex, Thalamus, Bulbus olfactorius, basolaterale und laterale Amygdala, Hippocampus sowie distinkte Kerngebiete des Hypothalamus, des Pons und der Medulla oblongata. Peripher zeigen männliche Tiere eine starke Expression des Transgens im Keimepithel der Hoden. CRH-COE_{Crh} Tiere zeigten keine Auffälligkeiten im Hinblick auf Lokomotion, Angst-ähnliches Verhalten und Depressions-ähnliches Verhalten. Die HPA-Achse der CRH-COE_{Crh} Tiere ist gekennzeichnet durch eine reduzierte basale Corticosteron-Sekretion, welche im Fall der Nachmittags Werte statistisch signifikant ist.

7 Anhang

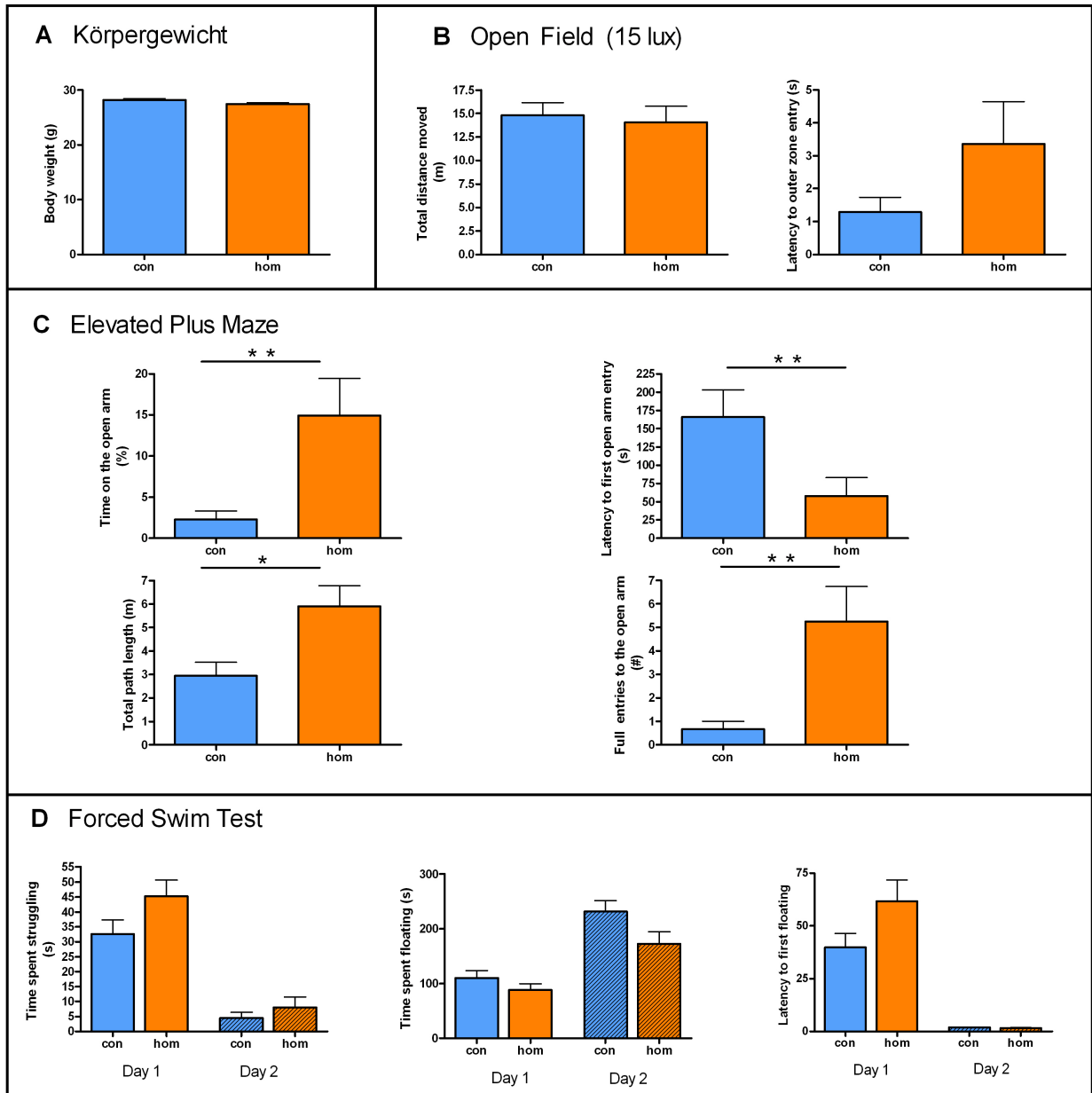
Anhang 1: Ergänzende Parameter die im Rahmen der Verhaltensphänotypisierung von männlichen CRH-COE^{hom}- und CRH-COE^{con} der Linie CRH-COE_{Dlx} erhoben wurden.



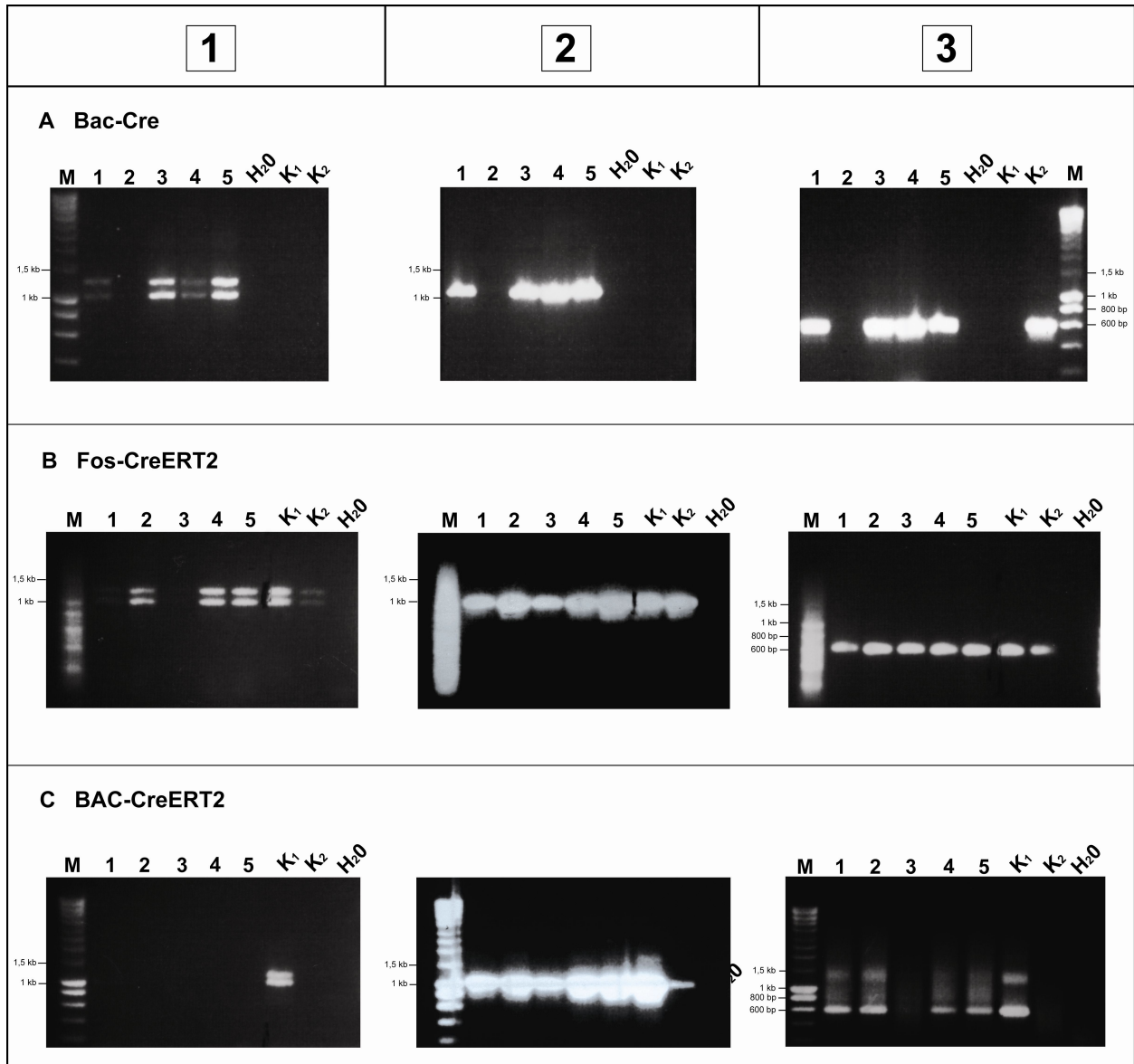
Anhang 2: Plasma Corticosteron-Konzentrationen in weiblichen CRH-COE^{hom}- und Kontrolltieren der Linie CRH-COE_{Dlx}.



Anhang 3: Ergebnisse der Verhaltensphänotypisierung einer zweiten Versuchsgruppe von männlichen CRH-COE^{hom}- und CRH-COE^{con} der Linie CRH-COE^{Dlx}.



Anhang 4: Validierung der Integration durch homologe Rekombination von (A) Cre-Kassette mit BAC-Klon RPC124-212D10, (B) CreERT2-Kassette mit Fos-Klon W11-1975E16 und (C) CreERT2-Kassette mit BAC-Klon RPC124-212D10 per PCR. Die Nummer oberhalb der Gelfotos bezieht sich auf die in Abbildung 29B dargestellten Primerpaare mit denen die drei jeweils darunter abgebildeten PCR-Ergebnisse erzielt wurden.



8 Literaturverzeichnis

- Adams,N.C., and Gale,N.W. (2006). Principles and Practice. In Mammalian and Avian Transgenesis - New Approaches, Shirley Pease and Carlos Lois, ed. (Berlin Heidelberg: Springer-Verlag).
- Afifi,A.K. (1994a). Basal ganglia: functional anatomy and physiology. Part 1. *J. Child Neurol.* 9, 249-260.
- Afifi,A.K. (1994b). Basal ganglia: functional anatomy and physiology. Part 2. *J. Child Neurol.* 9, 352-361.
- Aird,F., Clevenger,C.V., Prystowsky,M.B., and Redei,E. (1993). Corticotropin-releasing factor mRNA in rat thymus and spleen. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 90, 7104-7108.
- Akinci,M.K., and Schofield,P.R. (1999). Widespread expression of GABAA receptor subunits in peripheral tissues. *Neuroscience Research* 35, 145-153.
- Angst,J. (1997). Depression and anxiety: implications for nosology, course, and treatment. *J. Clin. Psychiatry* 58 *Suppl* 8, 3-5.
- Arborelius,L., Owens,M.J., Plotsky,P.M., and Nemeroff,C.B. (1999). The role of corticotropin-releasing factor in depression and anxiety disorders. *J. Endocrinol.* 160, 1-12.
- Asan,E., Yilmazer-Hanke,D.M., Eliava,M., Hantsch,M., Lesch,K.P., and Schmitt,A. (2005). The corticotropin-releasing factor (CRF)-system and monoaminergic afferents in the central amygdala: investigations in different mouse strains and comparison with the rat. *Neuroscience* 131, 953-967.
- Austin,M.C., Janosky,J.E., and Murphy,H.A. (2003). Increased corticotropin-releasing hormone immunoreactivity in monoamine-containing pontine nuclei of depressed suicide men. *Mol. Psychiatry* 8, 324-332.
- Austin,M.C., Rhodes,J.L., and Lewis,D.A. (1997). Differential distribution of corticotropin-releasing hormone immunoreactive axons in monoaminergic nuclei of the human brainstem 689. *Neuropsychopharmacology* 17, 326-341.
- Bale,T.L., and Vale,W.W. (2004). CRF and CRF receptors: role in stress responsivity and other behaviors. *Annu Rev Pharmacol. Toxicol.* 44, 525-557.
- Banki,C.M., Karmacsi,L., Bissette,G., and Nemeroff,C.B. (1992). CSF corticotropin-releasing hormone and somatostatin in major depression: response to antidepressant treatment and relapse. *Eur. Neuropsychopharmacol.* 2, 107-113.
- Berton,O., and Nestler,E.J. (2006). New approaches to antidepressant drug discovery: beyond monoamines. *Nat Rev Neurosci.* 7, 137-151.
- Biggio,G., Concas,A., Corda,M.G., Giorgi,O., Sanna,E., and Serra,M. (1990). Gabaergic and dopaminergic transmission in the rat cerebral cortex: Effect of stress, anxiolytic and anxiogenic drugs. *Pharmacology & Therapeutics* 48, 121-142.
- Black,D.L. (2003). Mechanisms of alternative pre-messenger RNA splicing. *Annu. Rev Biochem.* 72, 291-336.
- Blanco,E., Rojas,R., Haeger,P., Cuevas,R., Perez,C., Munita,R., Quiroz,G., Andres,M.E., Forray,M.I., and Gysling,K. (2006). Intron retention as an alternative splice variant of the rat urocortin 1 gene. *Neuroscience* 140, 1245-1252.
- Blank,T., Nijholt,I., Grammatopoulos,D.K., Randevara,H.S., Hillhouse,E.W., and Spiess,J. (2003). Corticotropin-releasing factor receptors couple to multiple G-proteins to activate diverse intracellular signaling pathways in mouse hippocampus: role in neuronal excitability and associative learning. *J. Neurosci.* 23, 700-707.

- Blethyn,K.L., Hughes,S.W., and Crunelli,V. (2008). Evidence for electrical synapses between neurons of the nucleus reticularis thalami in the adult brain in vitro. *Thalamus. Relat Syst.* 4, 13-20.
- Bourin,M., and Hascoet,M. (2003). The mouse light/dark box test. *Eur. J. Pharmacol.* 463, 55-65.
- Branda,C.S., and Dymecki,S.M. (2004). Talking about a revolution: The impact of site-specific recombinases on genetic analyses in mice. *Dev. Cell* 6, 7-28.
- Brown,L.L., Schneider,J.S., and Lidsky,T.I. (1997). Sensory and cognitive functions of the basal ganglia. *Curr. Opin. Neurobiol.* 7, 157-163.
- Bruhn,T.O., Engeland,W.C., Anthony,E.L., Gann,D.S., and Jackson,I.M. (1987). Corticotropin-releasing factor in the adrenal medulla. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 512, 115-128.
- Buchholz,F., Angrand,P.O., and Stewart,A.F. (1996a). A simple assay to determine the functionality of Cre or FLP recombination targets in genomic manipulation constructs. *Nucleic Acids Res.* 24, 3118-3119.
- Buchholz,F., Ringrose,L., Angrand,P.O., Rossi,F., and Stewart,A.F. (1996b). Different thermostabilities of FLP and Cre recombinases: implications for applied site-specific recombination. *Nucleic Acids Res.* 24, 4256-4262.
- Buijs,R.M., Wortel,J., van Heerikhuizen,J.J., Feenstra,M.G., Ter Horst,G.J., Romijn,H.J., and Kalsbeek,A. (1999). Anatomical and functional demonstration of a multisynaptic suprachiasmatic nucleus adrenal (cortex) pathway. *Eur. J. Neurosci* 11, 1535-1544.
- Butler,P.D., Weiss,J.M., Stout,J.C., and Nemeroff,C.B. (1990). Corticotropin-releasing factor produces fear-enhancing and behavioral activating effects following infusion into the locus coeruleus. *J. Neurosci.* 10, 176-183.
- Cain,S.T., Owens,M.J., and Nemeroff,C.B. (1991). Subcellular distribution of corticotropin-releasing-factor-like immunoreactivity in rat central nervous system. *Neuroendocrinology* 54, 36-41.
- Cannon,W.B. (1929). *Bodily changes in pain, hunger, fear and rage* (New York: Appleton).
- Castelli,M.P., Ingianni,A., Stefanini,E., and Gessa,G.L. (1999). Distribution of GABA(B) receptor mRNAs in the rat brain and peripheral organs. *Life Sci.* 64, 1321-1328.
- Chalmers,D.T., Lovenberg,T.W., and De Souza,E.B. (1995). Localization of novel corticotropin-releasing factor receptor (CRF2) mRNA expression to specific subcortical nuclei in rat brain: comparison with CRF1 receptor mRNA expression. *J. Neurosci.* 15, 6340-6350.
- Charmandari,E., Tsigos,C., and Chrousos,G. (2005). Endocrinology of the stress response. *Annu Rev Physiol* 67, 259-284.
- Chen,Y., Brunson,K.L., Adelman,G., Bender,R.A., Frotscher,M., and Baram,T.Z. (2004). Hippocampal corticotropin releasing hormone: pre- and postsynaptic location and release by stress. *Neuroscience* 126, 533-540.
- Choi,J.S., Pham,T.T., Jang,Y.J., Bui,B.C., Lee,B.H., Joo,K.M., Cha,C.I., and Lee,K.H. (2006). Corticotropin-releasing factor (CRF) and urocortin promote the survival of cultured cerebellar GABAergic neurons through the type 1 CRF receptor. *J. Korean Med. Sci.* 21, 518-526.
- Chrousos,G.P., and Gold,P.W. (1992). The concepts of stress and stress system disorders. Overview of physical and behavioral homeostasis. *JAMA* 267, 1244-1252.
- Claes,S.J. (2004). Corticotropin-releasing hormone (CRH) in psychiatry: from stress to psychopathology. *Ann. Med.* 36, 50-61.
- Clark,A.J., Bissinger,P., Bullock,D.W., Damak,S., Wallace,R., Whitelaw,C.B., and Yull,F. (1994). Chromosomal position effects and the modulation of transgene expression. *Reprod. Fertil. Dev.* 6, 589-598.

- Cobos,I., Calcagnotto,M.E., Vilaythong,A.J., Thwin,M.T., Noebels,J.L., Baraban,S.C., and Rubenstein,J.L. (2005). Mice lacking *Dlx1* show subtype-specific loss of interneurons, reduced inhibition and epilepsy. *Nat Neurosci.* *8*, 1059-1068.
- Cortright,D.N., Nicoletti,A., and Seasholtz,A.F. (1995). Molecular and biochemical characterization of the mouse brain corticotropin-releasing hormone-binding protein. *Mol. Cell Endocrinol.* *111*, 147-157.
- Crawley,J., and Goodwin,F.K. (1980). Preliminary report of a simple animal behavior model for the anxiolytic effects of benzodiazepines. *Pharmacol. Biochem. Behav.* *13*, 167-170.
- Cryan,J.F., and Holmes,A. (2005). The ascent of mouse: advances in modelling human depression and anxiety. *Nat Rev Drug Discov.* *4*, 775-790.
- Cryan,J.F., and Mombereau,C. (2004). In search of a depressed mouse: utility of models for studying depression-related behavior in genetically modified mice. *Mol. Psychiatry* *9*, 326-357.
- Cullinan,W.E., Ziegler,D.R., and Herman,J.P. (2008). Functional role of local GABAergic influences on the HPA axis. *Brain Struct. Funct.* *213*, 63-72.
- Dautzenberg,F.M., and Hauger,R.L. (2002). The CRF peptide family and their receptors: yet more partners discovered. *Trends Pharmacol. Sci.* *23*, 71-77.
- Day,J.C., Koehl,M., Deroche,V., Le,M.M., and Maccari,S. (1998a). Prenatal stress enhances stress- and corticotropin-releasing factor-induced stimulation of hippocampal acetylcholine release in adult rats. *J. Neurosci.* *18*, 1886-1892.
- Day,J.C., Koehl,M., Le,M.M., and Maccari,S. (1998b). Corticotropin-releasing factor administered centrally, but not peripherally, stimulates hippocampal acetylcholine release. *J. Neurochem.* *71*, 622-629.
- de Kloet,E.R. (1995). Steroids, stability and stress. *Front Neuroendocrinol.* *16*, 416-425.
- de Kloet,E.R. (2004). Hormones and the stressed brain. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* *1018*, 1-15.
- de Kloet,E.R., Joels,M., and Holsboer,F. (2005). Stress and the brain: from adaptation to disease. *Nat Rev Neurosci.* *6*, 463-475.
- Deussing,J.M. (2006). Animal models of depression. *Drug Discovery Today: Disease Models* *3*, 375-383.
- Dewey,S.L., Smith,G.S., Logan,J., Brodie,J.D., Yu,D.W., Ferrieri,R.A., King,P.T., MacGregor,R.R., Martin,T.P., and Wolf,A.P. (1992). GABAergic inhibition of endogenous dopamine release measured in vivo with ¹¹C-raclopride and positron emission tomography. *J. Neurosci.* *12*, 3773-3780.
- Dirks,A., Groenink,L., Bouwknecht,J.A., Hijzen,T.H., Van Der,G.J., Ronken,E., Verbeek,J.S., Veening,J.G., Dederen,P.J., Korosi,A., Schoolderman,L.F., Roubos,E.W., and Olivier,B. (2002). Overexpression of corticotropin-releasing hormone in transgenic mice and chronic stress-like autonomic and physiological alterations. *Eur. J. Neurosci.* *16*, 1751-1760.
- Dufau,M.L., Tinajero,J.C., and Fabbri,A. (1993). Corticotropin-releasing factor: an antireproductive hormone of the testis. *FASEB J.* *7*, 299-307.
- Dunn,A.J., and Berridge,C.W. (1990). Physiological and behavioral responses to corticotropin-releasing factor administration: is CRF a mediator of anxiety or stress responses? *Brain Res. Brain Res. Rev.* *15*, 71-100.
- Dunn,A.J., Swiergiel,A.H., and Palamarchouk,V. (2004). Brain circuits involved in corticotropin-releasing factor-norepinephrine interactions during stress. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* *1018*, 25-34.
- Eisenstat,D.D., Liu,J.K., Mione,M., Zhong,W., Yu,G., Anderson,S.A., Ghattas,I., Puellas,L., and Rubenstein,J.L. (1999). *DLX-1*, *DLX-2*, and *DLX-5* expression define distinct stages of basal forebrain differentiation. *J. Comp Neurol.* *414*, 217-237.

- Engeland, W.C., and Arnhold, M.M. (2005). Neural circuitry in the regulation of adrenal corticosterone rhythmicity. *Endocrine*. 28, 325-332.
- Erdo, S.L., and Wolff, J.R. (1990). gamma-Aminobutyric acid outside the mammalian brain. *J. Neurochem.* 54, 363-372.
- Fabbri, A., Tinajero, J.C., and Dufau, M.L. (1990). Corticotropin-releasing factor is produced by rat Leydig cells and has a major local antireproductive role in the testis. *Endocrinology* 127, 1541-1543.
- Forray, M.I., and Gysling, K. (2004). Role of noradrenergic projections to the bed nucleus of the stria terminalis in the regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Brain Res. Brain Res. Rev* 47, 145-160.
- Fried, P.A. (1972). Septum and behavior: a review. *Psychol. Bull.* 78, 292-310.
- Galindo, A., Del Arco, A., and Mora, F. (1999). Endogenous GABA potentiates the potassium-induced release of dopamine in striatum of the freely moving rat: a microdialysis study. *Brain Research Bulletin* 50, 209-214.
- Gallagher, J.P., Orozco-Cabal, L.F., Liu, J., and Shinnick-Gallagher, P. (2008). Synaptic physiology of central CRH system. *Eur. J. Pharmacol.* 583, 215-225.
- Gelman, D.M., Noain, D., Avale, M.E., Otero, V., Low, M.J., and Rubinstein, M. (2003). Transgenic mice engineered to target Cre/loxP-mediated DNA recombination into catecholaminergic neurons. *Genesis* 36, 196-202.
- Geyer, M.A., and Markou, A. (1995). Animal models of psychiatric disorders. In *Psychopharmacology: The Fourth Generation of Progress*, F. Bloom, and D. Kupfer, eds. (New York: Raven Press), pp. 787-798.
- Gladkevich, A., Korf, J., Hakobyan, V.P., and Melkonyan, K.V. (2006). The peripheral GABAergic system as a target in endocrine disorders. *Auton. Neurosci.* 124, 1-8.
- Goheen, R.B., Kott, J.N., and Westrum, L.E. (1997). Electron microscopy of colocalization of GABA and tyrosine hydroxylase expression in rat olfactory bulb transplants. *Exp. Neurol.* 143, 219-230.
- Gold, P.W., Chrousos, G., Kellner, C., Post, R., Roy, A., Augerinos, P., Schulte, H., Oldfield, E., and Loriaux, D.L. (1984). Psychiatric implications of basic and clinical studies with corticotropin-releasing factor. *Am. J. Psychiatry* 141, 619-627.
- Gonzalez-Hernandez, T., Barroso-Chinea, P., Acevedo, A., Salido, E., and Rodriguez, M. (2001). Colocalization of tyrosine hydroxylase and GAD65 mRNA in mesostriatal neurons. *Eur. J. Neurosci.* 13, 57-67.
- Gray, T.S. (1993). Amygdaloid CRF pathways. Role in autonomic, neuroendocrine, and behavioral responses to stress. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 697, 53-60.
- Griffin, C., Kleinjan, D.A., Doe, B., and van, H., V (2002). New 3' elements control Pax6 expression in the developing pretectum, neural retina and olfactory region. *Mech. Dev.* 112, 89-100.
- Grino, M., Chrousos, G.P., and Margioris, A.N. (1987). The corticotropin releasing hormone gene is expressed in human placenta. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 148, 1208-1214.
- Groenink, L., Dirks, A., Verdouw, P.M., Schipholt, M., Veening, J.G., Van Der, G.J., and Olivier, B. (2002). HPA axis dysregulation in mice overexpressing corticotropin releasing hormone. *Biol. Psychiatry* 51, 875-881.
- Guo, F., Gopaul, D.N., and van Duyne, G.D. (1997). Structure of Cre recombinase complexed with DNA in a site-specific recombination synapse. *Nature* 389, 40-46.
- Heim, C., Newport, D.J., Bonsall, R., Miller, A.H., and Nemeroff, C.B. (2001). Altered pituitary-adrenal axis responses to provocative challenge tests in adult survivors of childhood abuse. *Am. J. Psychiatry* 158, 575-581.
- Heinrichs, S.C., Menzaghi, F., Merlo, P.E., Britton, K.T., and Koob, G.F. (1995). The role of CRF in behavioral aspects of stress. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 771, 92-104.

- Heinrichs, S.C., Menzaghi, F., Pich, E.M., Baldwin, H.A., Rassnick, S., Britton, K.T., and Koob, G.F. (1994). Anti-stress action of a corticotropin-releasing factor antagonist on behavioral reactivity to stressors of varying type and intensity. *Neuropsychopharmacology* *11*, 179-186.
- Heinrichs, S.C., Min, H., Tamraz, S., Carmouche, M., Boehme, S.A., and Vale, W.W. (1997). Anti-sexual and anxiogenic behavioral consequences of corticotropin-releasing factor overexpression are centrally mediated. *Psychoneuroendocrinology* *22*, 215-224.
- Herman, J.P., and Cullinan, W.E. (1997). Neurocircuitry of stress: central control of the hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis. *Trends Neurosci.* *20*, 78-84.
- Herman, J.P., Figueiredo, H., Mueller, N.K., Ulrich-Lai, Y., Ostrander, M.M., Choi, D.C., and Cullinan, W.E. (2003). Central mechanisms of stress integration: hierarchical circuitry controlling hypothalamo-pituitary-adrenocortical responsiveness. *Front Neuroendocrinol.* *24*, 151-180.
- Heuser, I., Yassouridis, A., and Holsboer, F. (1994). The combined dexamethasone/CRH test: A refined laboratory test for psychiatric disorders. *Journal of Psychiatric Research* *28*, 341-356.
- Hogg, S. (1996). A review of the validity and variability of the elevated plus-maze as an animal model of anxiety. *Pharmacol. Biochem. Behav.* *54*, 21-30.
- Holsboer, F. (1999). The rationale for corticotropin-releasing hormone receptor (CRH-R) antagonists to treat depression and anxiety. *J. Psychiatr. Res.* *33*, 181-214.
- Holsboer, F., Von, B.U., Gerken, A., Stalla, G.K., and Muller, O.A. (1984). Blunted corticotropin and normal cortisol response to human corticotropin-releasing factor in depression. *N. Engl. J. Med.* *311*, 1127.
- Holscher, C. (2003). Time, space and hippocampal functions. *Rev. Neurosci.* *14*, 253-284.
- Horn, C., Hansen, J., Schnutgen, F., Seisenberger, C., Floss, T., Irgang, M., De-Zolt, S., Wurst, W., von, M.H., and Noplinger, P.R. (2007). Splinkerette PCR for more efficient characterization of gene trap events. *Nat. Genet.* *39*, 933-934.
- Hsu, D.T., Bakshi, V.P., Roseboom, P.H., and Kalin, N.H. (2003). Diurnal changes in corticotropin-releasing hormone messenger RNA in the rat thalamus. *Neurosci Lett.* *338*, 33-36.
- Hsu, D.T., Lombardo, K.A., Herringa, R.J., Bakshi, V.P., Roseboom, P.H., and Kalin, N.H. (2001). Corticotropin-releasing hormone messenger RNA distribution and stress-induced activation in the thalamus. *Neuroscience* *105*, 911-921.
- Hsu, S.Y., and Hsueh, A.J. (2001). Human stresscopin and stresscopin-related peptide are selective ligands for the type 2 corticotropin-releasing hormone receptor. *Nat. Med.* *7*, 605-611.
- Iijima, K., and Ohtomo, K. (1988). Immunocytochemical study using a GABA antiserum for the demonstration of inhibitory neurons in the rat locus ceruleus. *Am. J. Anat.* *181*, 43-52.
- Imaki, T., Naruse, M., Harada, S., Chikada, N., Imaki, J., Onodera, H., Demura, H., and Vale, W. (1996). Corticotropin-releasing factor up-regulates its own receptor mRNA in the paraventricular nucleus of the hypothalamus. *Brain Res. Mol. Brain Res.* *38*, 166-170.
- Jacobson, L., and Sapolsky, R. (1991). The role of the hippocampus in feedback regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis. *Endocr. Rev.* *12*, 118-134.
- Jacobson, L.H., and Cryan, J.F. (2007). Feeling strained? Influence of genetic background on depression-related behavior in mice: a review. *Behav. Genet.* *37*, 171-213.
- Justice, N.J., Yuan, Z.F., Sawchenko, P.E., and Vale, W. (2008). Type 1 corticotropin-releasing factor receptor expression reported in BAC transgenic mice: implications for reconciling ligand-receptor mismatch in the central corticotropin-releasing factor system. *J. Comp Neurol.* *511*, 479-496.

- Kalsbeek, A., Buijs, R.M., van Heerikhuizen, J.J., Arts, M., and van der Woude, T.P. (1992). Vasopressin-containing neurons of the suprachiasmatic nuclei inhibit corticosterone release. *Brain Res.* *580*, 62-67.
- Kash, S.F., Tecott, L.H., Hodge, C., and Baekkeskov, S. (1999). Increased anxiety and altered responses to anxiolytics in mice deficient in the 65-kDa isoform of glutamic acid decarboxylase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *96*, 1698-1703.
- Kato, T., Kubota, M., and Kasahara, T. (2007). Animal models of bipolar disorder. *Neurosci. Biobehav. Rev* *31*, 832-842.
- Keith, B.J., und Paxinos, G. (1997). *The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates* Academic Press).
- Kendler, K.S., Gatz, M., Gardner, C.O., and Pedersen, N.L. (2006). A Swedish national twin study of lifetime major depression. *Am. J. Psychiatry* *163*, 109-114.
- Kessler, R.C., Berglund, P., Demler, O., Jin, R., Koretz, D., Merikangas, K.R., Rush, A.J., Walters, E.E., and Wang, P.S. (2003). The epidemiology of major depressive disorder: results from the National Comorbidity Survey Replication (NCS-R). *JAMA* *289*, 3095-3105.
- King, B.R., Smith, R., and Nicholson, R.C. (2002). Novel glucocorticoid and cAMP interactions on the CRH gene promoter. *Mol. Cell Endocrinol.* *194*, 19-28.
- Kling, M.A., DeBellis, M.D., O'Rourke, D.K., Listwak, S.J., Geraciotti, T.D., Jr., McCutcheon, I.E., Kalogeras, K.T., Oldfield, E.H., and Gold, P.W. (1994). Diurnal variation of cerebrospinal fluid immunoreactive corticotropin-releasing hormone levels in healthy volunteers. *J. Clin. Endocrinol. Metab* *79*, 233-239.
- Koenig, M., Hoffman, E.P., Bertelson, C.J., Monaco, A.P., Feener, C., and Kunkel, L.M. (1987). Complete cloning of the Duchenne muscular dystrophy (DMD) cDNA and preliminary genomic organization of the DMD gene in normal and affected individuals. *Cell* *50*, 509-517.
- Koob, G.F. (1999). Corticotropin-releasing factor, norepinephrine, and stress. *Biol. Psychiatry* *46*, 1167-1180.
- Koob, G.F., and Heinrichs, S.C. (1999). A role for corticotropin releasing factor and urocortin in behavioral responses to stressors. *Brain Res.* *848*, 141-152.
- Korf, J., Aghajanian, G.K., and Roth, R.H. (1973). Increased turnover of norepinephrine in the rat cerebral cortex during stress: role of the locus coeruleus. *Neuropharmacology* *12*, 933-938.
- Korotkova, T.M., Brown, R.E., Sergeeva, O.A., Ponomarenko, A.A., and Haas, H.L. (2006). Effects of arousal- and feeding-related neuropeptides on dopaminergic and GABAergic neurons in the ventral tegmental area of the rat. *Eur. J. Neurosci.* *23*, 2677-2685.
- Korte, S.M. (2001). Corticosteroids in relation to fear, anxiety and psychopathology. *Neurosci. Biobehav. Rev.* *25*, 117-142.
- Kwak, S.P., Morano, M.I., Young, E.A., Watson, S.J., and Akil, H. (1993). Diurnal CRH mRNA rhythm in the hypothalamus: decreased expression in the evening is not dependent on endogenous glucocorticoids. *Neuroendocrinology* *57*, 96-105.
- Lamont, E.W., and Kokkinidis, L. (1998). Infusion of the dopamine D1 receptor antagonist SCH 23390 into the amygdala blocks fear expression in a potentiated startle paradigm. *Brain Res.* *795*, 128-136.
- Lantinga-van Leeuwen, I.S., Leonhard, W.N., van de, W.A., Breuning, M.H., Verbeek, S., de, H.E., and Peters, D.J. (2006). Transgenic mice expressing tamoxifen-inducible Cre for somatic gene modification in renal epithelial cells. *Genesis* *44*, 225-232.
- Lee, E.H.Y., Hung, H.C., Lu, K.T., Chen, W.H., and Chen, H.Y. (1992). Protein synthesis in the hippocampus associated with memory facilitation by corticotropin-releasing factor in rats. *Peptides* *13*, 927-937.

- Lettice, L.A., Heaney, S.J., Purdie, L.A., Li, L., de, B.P., Oostra, B.A., Goode, D., Elgar, G., Hill, R.E., and de, G.E. (2003). A long-range Shh enhancer regulates expression in the developing limb and fin and is associated with pre-axial polydactyly. *Hum. Mol. Genet.* *12*, 1725-1735.
- Lewis, K., Li, C., Perrin, M.H., Blount, A., Kunitake, K., Donaldson, C., Vaughan, J., Reyes, T.M., Gulyas, J., Fischer, W., Bilezikjian, L., Rivier, J., Sawchenko, P.E., and Vale, W.W. (2001). Identification of urocortin III, an additional member of the corticotropin-releasing factor (CRF) family with high affinity for the CRF2 receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *98*, 7570-7575.
- Lister, R.G. (1987). The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse. *Psychopharmacology (Berl)* *92*, 180-185.
- Liu, G.X., Cai, G.Q., Cai, Y.Q., Sheng, Z.J., Jiang, J., Mei, Z., Wang, Z.G., Guo, L., and Fei, J. (2007). Reduced anxiety and depression-like behaviors in mice lacking GABA transporter subtype 1. *Neuropsychopharmacology* *32*, 1531-1539.
- Lopez, A.J. (1998). Alternative splicing of pre-mRNA: developmental consequences and mechanisms of regulation. *Annu. Rev. Genet.* *32*, 279-305.
- Lovenberg, T.W., Chalmers, D.T., Liu, C., and De Souza, E.B. (1995). CRF2 alpha and CRF2 beta receptor mRNAs are differentially distributed between the rat central nervous system and peripheral tissues. *Endocrinology* *136*, 4139-4142.
- Lu, A., Steiner, M.A., Whittle, N., Vogl, A.M., Walser, S.M., Ableitner, M., Refojo, D., Ekker, M., Rubenstein, J.L., Stalla, G.K., Singewald, N., Holsboer, F., Wotjak, C.T., Wurst, W., and Deussing, J.M. (2008). Conditional mouse mutants highlight mechanisms of corticotropin-releasing hormone effects on stress-coping behavior. *Mol. Psychiatry* *13*, 1028-1042.
- Lucki, I. (1997). The forced swimming test as a model for core and component behavioral effects of antidepressant drugs. *Behav. Pharmacol.* *8*, 523-532.
- Luo, X., Kiss, A., Makara, G., Lolait, S.J., and Aguilera, G. (1994). Stress-specific regulation of corticotropin releasing hormone receptor expression in the paraventricular and supraoptic nuclei of the hypothalamus in the rat. *J. Neuroendocrinol.* *6*, 689-696.
- Makino, S., Schulkin, J., Smith, M.A., Pacak, K., Palkovits, M., and Gold, P.W. (1995). Regulation of corticotropin-releasing hormone receptor messenger ribonucleic acid in the rat brain and pituitary by glucocorticoids and stress. *Endocrinology* *136*, 4517-4525.
- Mansi, J.A., Rivest, S., and Drolet, G. (1996). Regulation of corticotropin-releasing factor type 1 (CRF1) receptor messenger ribonucleic acid in the paraventricular nucleus of rat hypothalamus by exogenous CRF. *Endocrinology* *137*, 4619-4629.
- Mastorakos, G., Webster, E.L., Friedman, T.C., and Chrousos, G.P. (1993). Immunoreactive corticotropin-releasing hormone and its binding sites in the rat ovary. *J. Clin. Invest* *92*, 961-968.
- Matlin, A.J., Clark, F., and Smith, C.W. (2005). Understanding alternative splicing: towards a cellular code. *Nat Rev Mol. Cell Biol.* *6*, 386-398.
- Menzaghi, F., Howard, R.L., Heinrichs, S.C., Vale, W., Rivier, J., and Koob, G.F. (1994). Characterization of a novel and potent corticotropin-releasing factor antagonist in rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* *269*, 564-572.
- Merali, Z., Du, L., Hrdina, P., Palkovits, M., Faludi, G., Poulter, M.O., and Anisman, H. (2004). Dysregulation in the suicide brain: mRNA expression of corticotropin-releasing hormone receptors and GABA(A) receptor subunits in frontal cortical brain region. *J. Neurosci.* *24*, 1478-1485.
- Merchenthaler, I. (1984). Corticotropin releasing factor (CRF)-like immunoreactivity in the rat central nervous system. Extrahypothalamic distribution. *Peptides* *5 Suppl 1*, 53-69.

- Merchenthaler, I., Vigh, S., Schally, A.V., Stumpf, W.E., and Arimura, A. (1984). Immunocytochemical localization of corticotropin releasing factor (CRF)-like immunoreactivity in the thalamus of the rat. *Brain Res.* 323, 119-122.
- Mitsui, S., Nakamura, T., Okui, A., Kominami, K., Uemura, H., and Yamaguchi, N. (2006). Multiple promoters regulate tissue-specific alternative splicing of the human kallikrein gene, KLK11/hippostasin. *FEBS J.* 273, 3678-3686.
- Moga, M.M., and Moore, R.Y. (1997). Organization of neural inputs to the suprachiasmatic nucleus in the rat. *J. Comp Neurol.* 389, 508-534.
- Monory, K., Massa, F., Egertova, M., Eder, M., Blaudzun, H., Westenbroek, R., Kelsch, W., Jacob, W., Marsch, R., Ecker, M., Long, J., Rubenstein, J.L., Goebbels, S., Nave, K.A., During, M., Klugmann, M., Wolfel, B., Dodt, H.U., Zieglgansberger, W., Wotjak, C.T., Mackie, K., Elphick, M.R., Marsicano, G., and Lutz, B. (2006). The endocannabinoid system controls key epileptogenic circuits in the hippocampus. *Neuron* 51, 455-466.
- Morgane, P.J., Galler, J.R., and Mokler, D.J. (2005). A review of systems and networks of the limbic forebrain/limbic midbrain. *Prog. Neurobiol.* 75, 143-160.
- Muglia, L.J., Jenkins, N.A., Gilbert, D.J., Copeland, N.G., and Majzoub, J.A. (1994). Expression of the mouse corticotropin-releasing hormone gene in vivo and targeted inactivation in embryonic stem cells. *J. Clin. Invest* 93, 2066-2072.
- Nagy, A. (2003). *Manipulating the Mouse Embryo* Cold Spring Harbour Laboratory Press).
- Nagy, A. (2000). Cre recombinase: the universal reagent for genome tailoring. *Genesis* 26, 99-109.
- Nemeroff, C.B., Bissette, G., Akil, H., and Fink, M. (1991). Neuropeptide concentrations in the cerebrospinal fluid of depressed patients treated with electroconvulsive therapy. Corticotrophin-releasing factor, beta-endorphin and somatostatin. *Br. J. Psychiatry* 158, 59-63.
- Nemeroff, C.B., Owens, M.J., Bissette, G., Andorn, A.C., and Stanley, M. (1988). Reduced corticotropin releasing factor binding sites in the frontal cortex of suicide victims. *Arch. Gen. Psychiatry* 45, 577-579.
- Nemeroff, C.B., Widerlov, E., Bissette, G., Walleus, H., Karlsson, I., Eklund, K., Kilts, C.D., Loosen, P.T., and Vale, W. (1984). Elevated concentrations of CSF corticotropin-releasing factor-like immunoreactivity in depressed patients. *Science* 226, 1342-1344.
- Nestler, E.J., Barrot, M., Dileone, R.J., Eisch, A.J., Gold, S.J., and Monteggia, L.M. (2002). Neurobiology of depression. *Neuron* 34, 13-25.
- Nie, Z., Schweitzer, P., Roberts, A.J., Madamba, S.G., Moore, S.D., and Siggins, G.R. (2004). Ethanol augments GABAergic transmission in the central amygdala via CRF1 receptors. *Science* 303, 1512-1514.
- Ninan, P.T. (1999). The functional anatomy, neurochemistry, and pharmacology of anxiety. *J. Clin. Psychiatry* 60 Suppl 22, 12-17.
- Orozco-Cabal, L., Pollandt, S., Liu, J., Shinnick-Gallagher, P., and Gallagher, J.P. (2006). Regulation of synaptic transmission by CRF receptors. *Rev. Neurosci.* 17, 279-307.
- Owens, M.J., and Nemeroff, C.B. (1991). Physiology and pharmacology of corticotropin-releasing factor. *Pharmacol. Rev.* 43, 425-473.
- Pellow, S., Chopin, P., File, S.E., and Briley, M. (1985). Validation of open:closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *J. Neurosci. Methods* 14, 149-167.
- Pesole, G., Mignone, F., Gissi, C., Grillo, G., Licciulli, F., and Liuni, S. (2001). Structural and functional features of eukaryotic mRNA untranslated regions. *Gene* 276, 73-81.
- Porsolt, R.D., Bertin, A., and Jalfre, M. (1977a). Behavioral despair in mice: a primary screening test for antidepressants. *Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.* 229, 327-336.

- Porsolt,R.D., Le,P.M., and Jalfre,M. (1977b). Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatments. *Nature* 266, 730-732.
- Potter,E., Sutton,S., Donaldson,C., Chen,R., Perrin,M., Lewis,K., Sawchenko,P.E., and Vale,W. (1994). Distribution of corticotropin-releasing factor receptor mRNA expression in the rat brain and pituitary. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 91, 8777-8781.
- Raadsheer,F.C., van Heerikhuizen,J.J., Lucassen,P.J., Hoogendijk,W.J., Tilders,F.J., and Swaab,D.F. (1995). Corticotropin-releasing hormone mRNA levels in the paraventricular nucleus of patients with Alzheimer's disease and depression. *Am. J. Psychiatry* 152, 1372-1376.
- Radulovic,J., Ruhmann,A., Liepold,T., and Spiess,J. (1999). Modulation of learning and anxiety by corticotropin-releasing factor (CRF) and stress: differential roles of CRF receptors 1 and 2. *J. Neurosci.* 19, 5016-5025.
- Reichardt,H.M., Kellendonk,C., Tronche,F., and Schutz,G. (1999). The Cre/loxP system--a versatile tool to study glucocorticoid signalling in mice. *Biochem. Soc. Trans.* 27, 78-83.
- Reul,J.M., and Holsboer,F. (2002). Corticotropin-releasing factor receptors 1 and 2 in anxiety and depression. *Curr. Opin Pharmacol.* 2, 23-33.
- Reyes,T.M., Lewis,K., Perrin,M.H., Kunitake,K.S., Vaughan,J., Arias,C.A., Hogenesch,J.B., Gulyas,J., Rivier,J., Vale,W.W., and Sawchenko,P.E. (2001). Urocortin II: a member of the corticotropin-releasing factor (CRF) neuropeptide family that is selectively bound by type 2 CRF receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 98, 2843-2848.
- Riegel,A.C., and Williams,J.T. (2008). CRF Facilitates Calcium Release from Intracellular Stores in Midbrain Dopamine Neurons. *Neuron* 57, 559-570.
- Rodriguez,C.I., Buchholz,F., Galloway,J., Sequerra,R., Kasper,J., Ayala,R., Stewart,A.F., and Dymecki,S.M. (2000). High-efficiency deleter mice show that FLPe is an alternative to Cre-loxP. *Nat Genet* 25, 139-140.
- Rosen,J.B., and Donley,M.P. (2006). Animal studies of amygdala function in fear and uncertainty: Relevance to human research. *Biological Psychology* 73, 49-60.
- Rubtsov,M.A., Polikanov,Y.S., Bondarenko,V.A., Wang,Y.H., and Studitsky,V.M. (2006). Chromatin structure can strongly facilitate enhancer action over a distance. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 103, 17690-17695.
- Ruest,L.B., Hammer,R.E., Yanagisawa,M., and Clouthier,D.E. (2003). Dlx5/6-enhancer directed expression of Cre recombinase in the pharyngeal arches and brain. *Genesis* 37, 188-194.
- Rulicke,T., and Hubscher,U. (2000). Germ line transformation of mammals by pronuclear microinjection. *Exp. Physiol* 85, 589-601.
- Rusak,B., and Zucker,I. (1979). Neural regulation of circadian rhythms. *Physiol Rev* 59, 449-526.
- Sakanaka,M., Shibasaki,T., and Lederis,K. (1987). Corticotropin releasing factor-like immunoreactivity in the rat brain as revealed by a modified cobalt-glucose oxidase-diaminobenzidine method. *J. Comp Neurol.* 260, 256-298.
- Sapolsky,R.M. (2001). Depression, antidepressants, and the shrinking hippocampus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 98, 12320-12322.
- Sauvage,M., and Steckler,T. (2001). Detection of corticotropin-releasing hormone receptor 1 immunoreactivity in cholinergic, dopaminergic and noradrenergic neurons of the murine basal forebrain and brainstem nuclei - potential implication for arousal and attention. *Neuroscience* 104, 643-652.
- Sawchenko,P.E., Swanson,L.W., and Vale,W.W. (1984). Corticotropin-releasing factor: co-expression within distinct subsets of oxytocin-, vasopressin-, and neurotensin-immunoreactive neurons in the hypothalamus of the male rat. *J. Neurosci.* 4, 1118-1129.
- Sayin,U., Purali,N., Ozkan,T., Altug,T., and Buyukdevrim,S. (1992). Vigabatrin has an anxiolytic effect in the elevated plus-maze test of anxiety. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 43, 529-535.

- Schenkel, J. *Transgene Tiere*. 1995. Heidelberg, Berlin, Oxford, Spektrum Akademischer Verlag.
- Schimchowitsch, S., Vuillez, P., Tappaz, M.L., Klein, M.J., and Stoeckel, M.E. (1991). Systematic presence of GABA-immunoreactivity in the tubero-infundibular and tubero-hypophyseal dopaminergic axonal systems: an ultrastructural immunogold study on several mammals. *Exp. Brain Res.* *83*, 575-586.
- Schmitt, U., and Hiemke, C. (1999). Effects of GABA-transporter (GAT) inhibitors on rat behaviour in open-field and elevated plus-maze. *Behav. Pharmacol.* *10*, 131-137.
- Selye, H. *Geschichte und Grundzüge des Stresskonzepts*. 1981. Bern, Huber. Stress, Theorien, Untersuchungen, Maßnahmen. Nitsch, J. R.
- Seth, K.A., and Majzoub, J.A. (2001). Repressor element silencing transcription factor/neuron-restrictive silencing factor (REST/NRSF) can act as an enhancer as well as a repressor of corticotropin-releasing hormone gene transcription. *J. Biol. Chem.* *276*, 13917-13923.
- Sheng, H., Sun, T., Cong, B., He, P., Zhang, Y., Yan, J., Lu, C., and Ni, X. (2008a). Corticotropin-releasing hormone stimulates SGK-1 kinase expression in cultured hippocampal neurons via CRH-R1. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* *295*, E938-E946.
- Sheng, H., Zhang, Y., Sun, J., Gao, L., Ma, B., Lu, J., and Ni, X. (2008b). Corticotropin-releasing hormone (CRH) depresses n-methyl-D-aspartate receptor-mediated current in cultured rat hippocampal neurons via CRH receptor type 1. *Endocrinology* *149*, 1389-1398.
- Shepard, J.D., Barron, K.W., and Myers, D.A. (2000). Corticosterone delivery to the amygdala increases corticotropin-releasing factor mRNA in the central amygdaloid nucleus and anxiety-like behavior. *Brain Res.* *861*, 288-295.
- Simeone, A., Acampora, D., Pannese, M., D'Esposito, M., Stornaiuolo, A., Gulisano, M., Mallamaci, A., Kastury, K., Druck, T., and Huebner, K. (1994). Cloning and characterization of two members of the vertebrate *Dlx* gene family. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *91*, 2250-2254.
- Singewald, N., and Philippu, A. (1998). Release of neurotransmitters in the locus coeruleus. *Prog. Neurobiol.* *56*, 237-267.
- Skutella, T., Criswell, H., Moy, S., Probst, J.C., Breese, G.R., Jirikowski, G.F., and Holsboer, F. (1994). Corticotropin-releasing hormone (CRH) antisense oligodeoxynucleotide induces anxiolytic effects in rat. *Neuroreport* *5*, 2181-2185.
- Slominski, A., Wortsman, J., Tuckey, R.C., and Paus, R. (2007). Differential expression of HPA axis homolog in the skin. *Mol. Cell Endocrinol.* *265-266*, 143-149.
- Sonenberg, N. (1994). mRNA translation: influence of the 5' and 3' untranslated regions. *Current Opinion in Genetics & Development* *4*, 310-315.
- Soriano, P. (1999). Generalized lacZ expression with the ROSA26 Cre reporter strain. *Nat. Genet.* *21*, 70-71.
- Spector, D.L. (1998). *Cells* Cold Spring Harbor Laboratory Press).
- Steckler, T., and Holsboer, F. (1999). Corticotropin-releasing hormone receptor subtypes and emotion. *Biol. Psychiatry* *46*, 1480-1508.
- Stenzel-Poore, M.P., Cameron, V.A., Vaughan, J., Sawchenko, P.E., and Vale, W. (1992). Development of Cushing's syndrome in corticotropin-releasing factor transgenic mice. *Endocrinology* *130*, 3378-3386.
- Stenzel-Poore, M.P., Heinrichs, S.C., Rivest, S., Koob, G.F., and Vale, W.W. (1994). Overproduction of corticotropin-releasing factor in transgenic mice: a genetic model of anxiogenic behavior. *J. Neurosci.* *14*, 2579-2584.
- Sullivan, P.F., Neale, M.C., and Kendler, K.S. (2000). Genetic epidemiology of major depression: review and meta-analysis. *Am. J. Psychiatry* *157*, 1552-1562.

- Sun,N., and Cassell,M.D. (1993). Intrinsic GABAergic neurons in the rat central extended amygdala. *J. Comp Neurol.* *330*, 381-404.
- Swanson,L.W., and Petrovich,G.D. (1998). What is the amygdala? *Trends Neurosci.* *21*, 323-331.
- Swanson,L.W., Sawchenko,P.E., Rivier,J., and Vale,W.W. (1983). Organization of ovine corticotropin-releasing factor immunoreactive cells and fibers in the rat brain: an immunohistochemical study. *Neuroendocrinology* *36*, 165-186.
- Tan,H., Zhong,P., and Yan,Z. (2004). Corticotropin-releasing factor and acute stress prolongs serotonergic regulation of GABA transmission in prefrontal cortical pyramidal neurons. *J. Neurosci.* *24*, 5000-5008.
- Thompson,R.C., Seasholtz,A.F., and Herbert,E. (1987). Rat corticotropin-releasing hormone gene: sequence and tissue-specific expression. *Mol. Endocrinol.* *1*, 363-370.
- Trepel M. (2004). *Neuroanatomie. Struktur und Funktion* (München: Urban & Fischer).
- Tsigos,C., and Chrousos,G.P. (2002). Hypothalamic-pituitary-adrenal axis, neuroendocrine factors and stress. *Journal of Psychosomatic Research* *53*, 865-871.
- Ungless,M.A., Singh,V., Crowder,T.L., Yaka,R., Ron,D., and Bonci,A. (2003). Corticotropin-releasing factor requires CRF binding protein to potentiate NMDA receptors via CRF receptor 2 in dopamine neurons. *Neuron* *39*, 401-407.
- Urani,A., Chourbaji,S., and Gass,P. (2005). Mutant mouse models of depression: candidate genes and current mouse lines. *Neurosci. Biobehav. Rev* *29*, 805-828.
- Vagner,S., Galy,B., and Pyronnet,S. (2001). Irresistible IRES. Attracting the translation machinery to internal ribosome entry sites. *EMBO Rep.* *2*, 893-898.
- Vale,W., Spiess,J., Rivier,C., and Rivier,J. (1981). Characterization of a 41-residue ovine hypothalamic peptide that stimulates secretion of corticotropin and beta-endorphin. *Science* *213*, 1394-1397.
- Valentino,R.J., Foote,S.L., and ston-Jones,G. (1983). Corticotropin-releasing factor activates noradrenergic neurons of the locus coeruleus. *Brain Res.* *270*, 363-367.
- Valentino,R.J., Rudoy,C., Saunders,A., Liu,X.B., and Van Bockstaele,E.J. (2001). Corticotropin-releasing factor is preferentially colocalized with excitatory rather than inhibitory amino acids in axon terminals in the peri-locus coeruleus region. *Neuroscience* *106*, 375-384.
- Vamvakopoulos,N.C., Karl,M., Mayol,V., Gomez,T., Stratakis,C.A., Margioris,A., and Chrousos,G.P. (1990). Structural analysis of the regulatory region of the human corticotropin releasing hormone gene. *FEBS Lett.* *267*, 1-5.
- Van Bockstaele,E.J., and Chan,J. (1997). Electron microscopic evidence for coexistence of leucine5-enkephalin and gamma-aminobutyric acid in a subpopulation of axon terminals in the rat locus coeruleus region. *Brain Res.* *746*, 171-182.
- Van Praag,H.M., De Kloet,R., und Van Os,J. (2004). *Stress, the Brain and Depression* Cambridge University Press).
- Vann,S.D., and Aggleton,J.P. (2004). The mammillary bodies: two memory systems in one? *Nat. Rev. Neurosci.* *5*, 35-44.
- Vaughan,J., Donaldson,C., Bittencourt,J., Perrin,M.H., Lewis,K., Sutton,S., Chan,R., Turnbull,A.V., Lovejoy,D., and Rivier,C. (1995). Urocortin, a mammalian neuropeptide related to fish urotensin I and to corticotropin-releasing factor. *Nature* *378*, 287-292.
- Vicentini,E., Arban,R., Angelici,O., Maraia,G., Perico,M., Mugnaini,M., Ugolini,A., Large,C., Domenici,E., Gerard,P., Bortner,D., Mansuy,I.M., Mangiarini,L., and Merlo-Pich,E. (2009). Transient forebrain over-expression of CRF induces plasma corticosterone and mild behavioural changes in adult conditional CRF transgenic mice. *Pharmacol. Biochem. Behav.* *93*, 17-24.

- Walker,D.L., Toufexis,D.J., and Davis,M. (2003). Role of the bed nucleus of the stria terminalis versus the amygdala in fear, stress, and anxiety. *European Journal of Pharmacology* 463, 199-216.
- Walsh,R.N., and Cummins,R.A. (1976). The Open-Field Test: a critical review. *Psychol. Bull.* 83, 482-504.
- Weiss,J.M., Stout,J.C., Aaron,M.F., Quan,N., Owens,M.J., Butler,P.D., and Nemeroff,C.B. (1994). Depression and anxiety: role of the locus coeruleus and corticotropin-releasing factor. *Brain Res. Bull.* 35, 561-572.
- Wilson,C., Bellen,H.J., and Gehring,W.J. (1990). Position effects on eukaryotic gene expression. *Annu. Rev Cell Biol.* 6, 679-714.
- World Health Organization. The ICD-10 Classification of Mental and Behavioural Diseases. Clinical Descriptions and Diagnostic Guidelines. 1992. Geneva, Switzerland.
- Yan,X.X., Toth,Z., Schultz,L., Ribak,C.E., and Baram,T.Z. (1998). Corticotropin-releasing hormone (CRH)-containing neurons in the immature rat hippocampal formation: light and electron microscopic features and colocalization with glutamate decarboxylase and parvalbumin. *Hippocampus* 8, 231-243.
- Yao,M., and Denver,R.J. (2007). Regulation of vertebrate corticotropin-releasing factor genes. *Gen. Comp Endocrinol.* 153, 200-216.
- Yoon,D.J., Sklar,C., and David,R. (1988). Presence of immunoreactive corticotropin-releasing factor in rat testis. *Endocrinology* 122, 759-761.
- Zerucha,T., Stuhmer,T., Hatch,G., Park,B.K., Long,Q., Yu,G., Gambarotta,A., Schultz,J.R., Rubenstein,J.L., and Ekker,M. (2000). A highly conserved enhancer in the *Dlx5/Dlx6* intergenic region is the site of cross-regulatory interactions between *Dlx* genes in the embryonic forebrain. *J. Neurosci.* 20, 709-721.

9 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all denjenigen bedanken, die zur Fertigstellung der Dissertation beigetragen haben. Insbesondere bedanken möchte ich dabei bei:

Dr. Jan Deussing für die praktische Betreuung dieser Arbeit sowie seinen zahlreichen Anregungen und Ideen die maßgeblich zum Gelingen derselben beigetragen haben.

Prof. Dr. Wolfgang Wurst, der mir als Betreuer meiner Dissertation die Möglichkeit gab, in einem spannenden und vielseitigen Wissenschaftsfeld zu forschen.

Prof. Dr. Dr. Dr. Florian Holsboer, der mir als Direktor des Max-Planck-Instituts für Psychiatrie die Möglichkeit bot, meine Dissertation an einem renommierten Institut mit optimalem Arbeitsumfeld durchführen zu können.

Prof. Dr. Angelika Schnieke und **Prof. Dr. Alfons Gierl** für ihre Bereitschaft meine Dissertation zu beurteilen und die Promotionsprüfung durchzuführen.

Dr. Chadi Touma, unter dessen kompetenter Aufsicht sämtliche Verhaltensexperimente durchgeführt und ausgewertet wurden.

Dr. Damian Refojo, dessen Türe für Fragen und Probleme aller Art immer offen stand.

Unseren technischen Mitarbeitern **Claudia Kühne**, **Marcel Schieven**, **Sabrina Meyr**, **Tanja Orschmann** und **Robert Menz**, deren helfende Hände mich bei vielen Experimenten, sowie bei der Genotypisierung der Mauslinien unterstützten.

Johanna Stalla und **Ursula Habersetzer** für die Durchführung der Corticosteron-Messungen.

Adriane Tasdemir, **Susanne Weidemann** und **Susanne Bourier** für die Durchführung der Pronucleus- und Blastocysten-Injektionen.

Dr. Ralf Kühn, der mich mit diversen Plasmiden, Antikörpern und Tips versorgte.

Den gesamten Mitgliedern der **AG Deussing**, die für ein freundschaftliches und humorvolles Arbeitsklima sorgten und mit dazu beigetragen haben, dass ich die Zeit als Doktorand in guter Erinnerung behalten werde.