

# Cre/loxP-vermittelte konditionale Mutagenese des cGMP-Signalwegs in der Maus

Robert Lukowski, Silke Weber, Pascal Weinmeister, Susanne Feil und Robert Feil

Institut für Pharmakologie und Toxikologie, Technische Universität München

Das Cre/loxP-Rekombinationssystem bietet zahlreiche Möglichkeiten zur gezielten Modifikation chromosomaler DNA und hat für die Mausgenetik große Bedeutung erlangt. Es wird hier besonders zur Generierung konditionaler, d.h. zeit- und gewebespezifischer Gendelektionen angewendet. Dieser Artikel gibt einen Überblick über das Cre/loxP-Rekombinationssystem und dessen Applikationen. Konditionale Mutagenesestrategien werden anhand gewebespezifischer Deletionen der cGMP-abhängigen Proteinkinase, einem Effektorprotein des sekundären Botenstoffes cGMP, dargestellt. Mit Hilfe dieser Mausmutanten konnten neue Einsichten zur (patho-)physiologischen Rolle des cGMP-Signalwegs bei Lernprozessen und Herz-Kreislaufkrankheiten gewonnen werden.

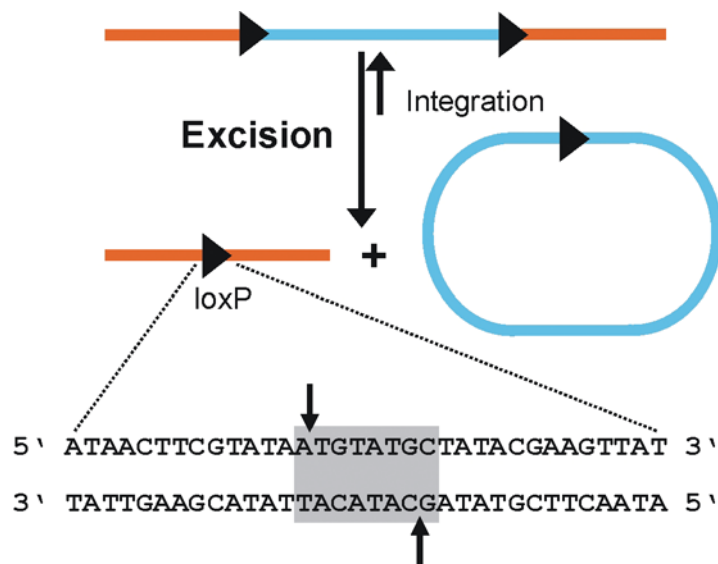


Abb. 1: Cre/loxP-vermittelte Excision und Integration von DNA. Die Basensequenz der loxP-Sequenz (Dreieck) ist angegeben und die zentrale Region, innerhalb der die Rekombination erfolgt, hervorgehoben. Die Schnittstelle ist durch Pfeile markiert. Weitere Erklärungen im Text.

## Das Cre/loxP-Rekombinationssystem

► Die Rekombination ist ein in allen Organismen vorkommender, durch spezialisierte Enzyme (Rekombinasen) katalysierter Prozess, der eine Spaltung und Neuverknüpfung von DNA beinhaltet. Hierdurch wird z.B. genetische Diversität und die Reparatur von Mutationen ermöglicht. Viele Rekombinasen haben ihren Ursprung in Bakteriophagen und Hefen und binden an konservierte DNA-Erkennungssequenzen<sup>[1]</sup>. Ein häufig verwendetes Rekombinationssystem leitet sich von der Cre-Rekombinase (cyclization recombination) des Bakteriophagen P1 ab<sup>[2]</sup>. Cre katalysiert die Rekombination zwischen zwei loxP-Erkennungssequenzen (locus of X-over of P1) unabhängig von weiteren Cofaktoren. Die loxP-Sequenz besteht aus einem zentralen Element aus acht Basenpaaren (bestimmt die Orientierung), welches von zwei palindromischen Sequenzen mit 13 Basenpaaren Länge flankiert

wird. Ein chromosomales DNA-Segment, das zwischen zwei gleichgerichteten loxP-Sequenzen liegt (ein „gefloxtes“ DNA-Segment), wird durch die Cre-Rekombinase in Form eines zirkulären Produktes aus dem Chromosom herausgeschnitten und in der Zelle abgebaut (Abb. 1). Auf dem Chromosom bleibt eine einzelne loxP-Sequenz zurück. Über die Rückreaktion kann prinzipiell auch fremde DNA ins Chromosom integriert werden (Abb. 1). Diese intermolekulare Rekombination ist allerdings ineffizient, da die intramolekulare Excision bevorzugt abläuft. Je nach Orientierung und Lage der beiden loxP-Sequenzen können noch weitere DNA Transaktionen erzeugt werden, z.B. Inversionen und Chromosomentranslokationen (nicht gezeigt)<sup>[3]</sup>. Vor etwa zehn Jahren wurde klar, dass das Cre/loxP-System auch in Säugerzellen effizient funktioniert und insbesondere zur Herstellung so genannter gewebespezifischer Knockout-Mäuse verwendet werden kann<sup>[4]</sup>.

Seitdem hat es sich zu einer wertvollen Methode der Mausgenetik entwickelt und bereits viel zum Verständnis von Genfunktionen beigetragen.

### Generierung gewebespezifischer Knockout-Mäuse

Um Mäuse mit einer Cre/loxP-vermittelten gewebespezifischen Gendeletion zu generieren, werden zwei genetisch veränderte Mauslinien benötigt (Abb. 2A). Eine Linie trägt den loxP-flankierten Genabschnitt („gefloxte Zielmaus“), während die andere Linie Cre selektiv nur in bestimmten Zelltypen exprimiert („gewebespezifische Cre-Maus“)<sup>[1,3]</sup>. Zur Herstellung der geflochten Zielmaus wird i.d.R. ein wichtiges Exon des Zielgens durch homologe Rekombination in embryonalen Stammzellen mit zwei gleichgerichteten loxP-Sequenzen flankiert und in die Keimbahn eingebracht. Die loxP-Sequenzen werden so in die Exon-flankierenden Introns eingebaut, dass die geflochte Version des Gens funktionsfähig bleibt und die geflochte Zielmaus sich phänotypisch nicht vom Wildtyp unterscheidet. Zur Herstellung einer gewebespezifischen Cre-Maus wird ein Cre-Transgen ins Mausgenom integriert. Die Auswahl des Promotors, unter dessen Kontrolle Cre steht, bestimmt, zu welchem Zeitpunkt (meist schon während der Embryogenese) und in welchen Zelltypen (Gewebespezifität) Cre exprimiert wird. Nach Verkreuzung gefloxter und Cre-exprimierender Mäuse manifestiert sich in den Nachkommen die Excision des Zielexons und damit der Gen-Knockout in allen Zellen, die aktive Cre-Rekombinase bilden (Abb. 2A). Durch Einkreuzen verschiedener gewebespezifischer Cre-Mauslinien (eine Auswahl findet sich unter: [www.mshri.on.ca/nagy/cre-pub.html](http://www.mshri.on.ca/nagy/cre-pub.html)) können vielfältige konditionale Mutationen des Zielgens erzeugt werden.

### Weiterentwicklungen durch zeitliche Kontrolle der Rekombinaseaktivität

Für viele Fragestellungen ist es wünschenswert, nicht nur die Gewebespezifität, sondern auch den Zeitpunkt der Rekombination genau zu kontrollieren. Hierfür kann die Transkription von Cre oder die Aktivität der Rekombinase posttranslational reguliert werden<sup>[1,3]</sup>. Die Expression von Cre kann z.B. durch die Verwendung Interferon-induzierbarer<sup>[5]</sup> oder Tetracyclin-abhängiger<sup>[6]</sup> Promotoren kontrolliert werden. Zur posttranslationalen Regulation der Rekombinaseaktivität wurden Liganden-aktivierbare Cre-Rekombinasen entwickelt<sup>[7]</sup>. Dabei handelt es sich um Fusionsproteine aus Cre und mutierten Ligandenbindungsdomänen von Steroidrezeptoren (z.B. dem Östrogenrezeptor),

die keine Affinität zum endogenen Liganden (z.B. Östradiol) besitzen und zunächst inaktiv sind. Erst durch die Applikation eines synthetischen Liganden (z.B. Tamoxifen) wird die chimäre Rekombinase aktiviert. Die gewebespezifische Expression einer Liganden-aktivierbaren Cre-Rekombinase erlaubt damit eine örtliche und zeitliche Kontrolle der Rekombination bzw. Gendeletion (Abb. 2B).

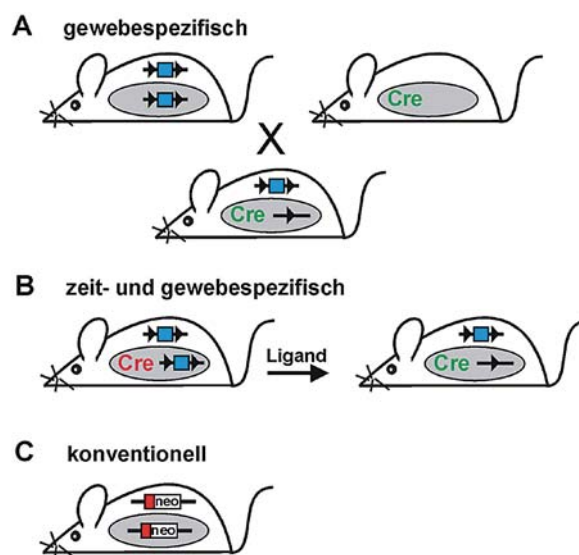
### Vergleich konventioneller und konditionaler Geninaktivierung

Beim konventionellen Knockout wird ein essenzielles Gensegment (i.d.R. ein Exon) permanent zerstört (Abb. 2C). Das inaktivierte Gen wird in die Keimbahn eingebracht, woraufhin dessen Funktion in allen Zellen der Maus verloren geht. Diese konventionellen Nullmutationen sind häufig embryonal letal oder verursachen komplexe, schwierig interpretierbare Phänotypen. Es ist meist nicht einfach, den Phänotyp bzw. die Genfunktion eindeutig einem bestimmten Gewebe zuzuordnen, da das Gen in allen Zellen ausgeschaltet ist. Beispielsweise könnte der Bluthochdruck einer konventionellen Knockout-Maus auf einer Funktion des Gens bei der Kontraktion der Gefäße und/oder der Volumenregulation in der Niere beruhen. Im Gegensatz dazu können durch die zeit- und gewebespezifische Geninaktivierung (Abb. 2A und 2B) letale Defekte vermieden und die Phänotypen ein-

deutig einer primären Funktion des Zielgens in bestimmten Zelltypen zugeordnet werden. Ein häufiges Problem dieser Methode ist allerdings, dass die Cre-Rekombinase nicht in allen Zellen des Zielgewebes exprimiert wird, sodass sich ein mosaikartiges Knockout-Profil ergibt. Darüber hinaus kann Cre auch in unerwünschten Zelltypen exprimiert werden, was zur „ektopischen“ Gendeletion führt. Um den Phänotyp einer konditionalen Mausmutante richtig zu deuten, ist es daher wichtig, sowohl die Effizienz im eigentlichen Zielgewebe, als auch die tatsächliche Gewebespezifität des Gen-Knockouts genau zu untersuchen. Das Rekombinationsprofil einer Cre-Maus kann durch Verwendung von Reporterstäben analysiert werden, in denen nur nach Cre-vermittelter Excision einer geflochten Stop-Kassette  $\beta$ -Galactosidase exprimiert wird<sup>[8]</sup>. Die  $\beta$ -Galactosidase-exprimierenden Zellen lassen sich durch eine Farbreaktion blau anfärben. Letztendlich sollte aber immer auch die Expression des betreffenden Zielgens überprüft werden, und zwar möglichst auf zellulärer Ebene.

### Analyse der cGMP-Signaltransduktion durch konditionale Mutagenese

Signalwege, an denen zyklische Nukleotide als Botenstoffe beteiligt sind, spielen bei vielen physiologischen Prozessen, aber auch bei Krankheiten eine wichtige Rolle<sup>[9]</sup>. In den letzten Jahren ist insbesondere das zyklische



**Abb. 2: Konditionale und konventionelle Deletion von Mausgenen. (A) Zur gewebespezifischen Gendeletion wird eine geflochte Zielmaus (Dreiecke stellen loxP-Sequenzen dar und blaue Vierecke ein Exon) mit einer gewebespezifischen Cre-Maus verkreuzt. Die Cre-Expression wird durch gewebespezifische Promotoren kontrolliert. Die Excision des Exons findet nur in den Zellen statt, in denen der Promotor aktiv ist (graue Ellipse). (B) Eine zeitliche Kontrolle der Rekombination kann durch die Verwendung von Liganden-aktivierbaren Cre-Rekombinasen erfolgen, die zunächst inaktiv sind (Rot) und erst nach Gabe des Liganden (z.B. Tamoxifen) aktiviert werden (Grün). (C) Bei der konventionellen Gendeletion wird ein Exon (rotes Viereck) permanent in der Keimbahn zerstört, z.B. durch Einbau eines Neomycinresistenzgens (neo). Weitere Erklärungen im Text.**

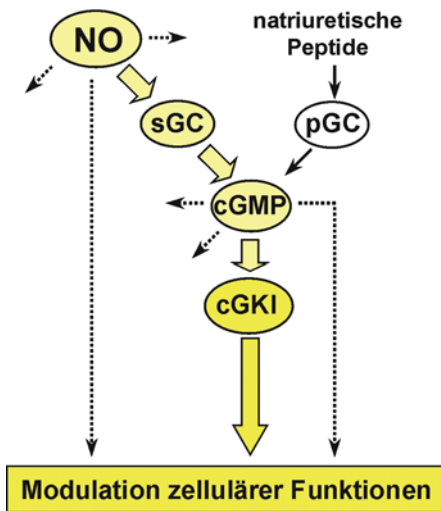


Abb. 3: Die cGMP-Signalkaskade. Erklärung siehe Text.

Guanosin-3',5'-monophosphat (cGMP) ins Blickfeld gerückt, u.a. weil es viele Effekte des nobelpreisgekrönten Signalmoleküls Stickstoffmonoxid (NO) vermittelt (Abb. 3). NO stimuliert die lösliche Guanylylzyklase (sGC), welche aus GTP cGMP bildet. Alternativ kann cGMP auch durch membran-gebundene Guanylylzyklasen (pGC) erzeugt werden, die durch natriuretische Peptide aktiviert werden. Die cGMP-abhängige Proteinkinase Typ I (cGKI) vermittelt möglicherweise viele Effekte von NO/cGMP<sup>[10]</sup>. Die Funktionsanalyse des NO/cGMP/cGKI-Signalwegs war jedoch lange erschwert, da sowohl NO als auch cGMP über verschiedene Mechanismen signalisieren können (Abb. 3) und es zudem keine hochspezifischen Aktivatoren und Inhibitoren der cGKI gibt. Durch die Generierung konventioneller cGKI-Knockout-Mäuse konnten einige Fragen beantwortet werden, z.B. dass der Tonus der glatten Muskulatur und die Thrombozytenaggregation durch diese Proteinkinase reguliert werden<sup>[11]</sup>. Ein großes Problem bei der Analyse der cGKI-Nullmutanten ist jedoch, dass sie bereits im Alter von vier bis sechs Wochen versterben<sup>[12]</sup>. Um die (patho-)physiologische Relevanz der cGKI zu späteren Zeitpunkten und in spezifischen Geweben studieren zu können, wurden mit Hilfe des Cre/loxP-Systems verschiedene konditionale cGKI-Knockout-Mäuse im Nerven- und Herzkreislaufsystem generiert<sup>[11,13]</sup>. Diese Maus-

mutanten zeigen eine normale Lebenserwartung und können in Langzeitexperimenten (z.B. Lerntests, Atherosklerosemodell) eingesetzt werden.

In Abbildung 4 sind exemplarisch gewebespezifische Deletionen der cGKI und die daraus resultierenden Phänotypen gezeigt. So wurde durch Einkreuzen einer hippocampuspezifischen Cre-Maus in die gefloxtc cGKI-Maus die cGKI-Expression selektiv in der CA1-CA3-Region des Hippocampus ausgeschaltet, aber in anderen Hirnregionen (Gyrus dentatus, Kleinhirn) und peripheren Geweben intakt gelassen (Abb. 4A). Die hippocampuspezifische Deletion der cGKI ging mit einer verminderten Induktion der Langzeitpotenzierung der synaptischen Übertragung in akut isolierten Gehirnschnitten einher (Abb. 4B)<sup>[14]</sup>. In einem anderen Projekt wurde die cGKI spezifisch in den Purkinjezellen des Kleinhirns inaktiviert, was zu einem Defekt der synaptischen Langzeitdepression und des motorischen Lernens führte (nicht gezeigt)<sup>[15]</sup>. Die Untersuchung der Hirnregion-spezifischen cGKI-Knockout-Mäuse weist damit auf eine wichtige Funktion des cGMP/cGKI-Signalwegs für bestimmte Formen der synaptischen Plastizität und des Lernens hin.

Durch Verwendung einer Tamoxifen-aktivierbaren Cre-Rekombinase, die selektiv im glatten Muskel exprimiert wird<sup>[16]</sup>, gelang es, die cGKI zeitlich kontrolliert in glatten Gefäßmuskelzellen adulter Tiere auszuschalten und ihre Rolle bei der Ausbildung der Atherosklerose zu untersuchen<sup>[17]</sup>. Dazu wurde die konditionale cGKI-Deletion in hypercholesterolämischen Mäusen, die atherosklerotische Plaques bilden, durch Verabreichung des Liganden Tamoxifen induziert. Die immunhistochemische Analyse der cGKI-Expression zeigte eine starke Reduktion des Proteins in der glatten Muskelschicht, wobei die Expression in makrophagenartigen Zellen innerhalb der Plaques unverändert war (Abb. 4C). Die glattmuskelspezifischen cGKI-Mutanten zeigten eine gegenüber Kontrolltieren verminderte Plaquefläche im Aortenbogen (Abb. 4D). Dieser Befund weist darauf hin, dass die Aktivierung des cGMP/cGKI-Signalwegs in glatten Gefäßmuskelzellen die Atherosklerose eher fördert und nicht, wie auf Grund von *in vitro* Daten bisher angenommen, hemmt.

**Zusammenfassung und Ausblick**

Das Cre/loxP-Rekombinationssystem hat sich in den letzten Jahren zu einem wichti-

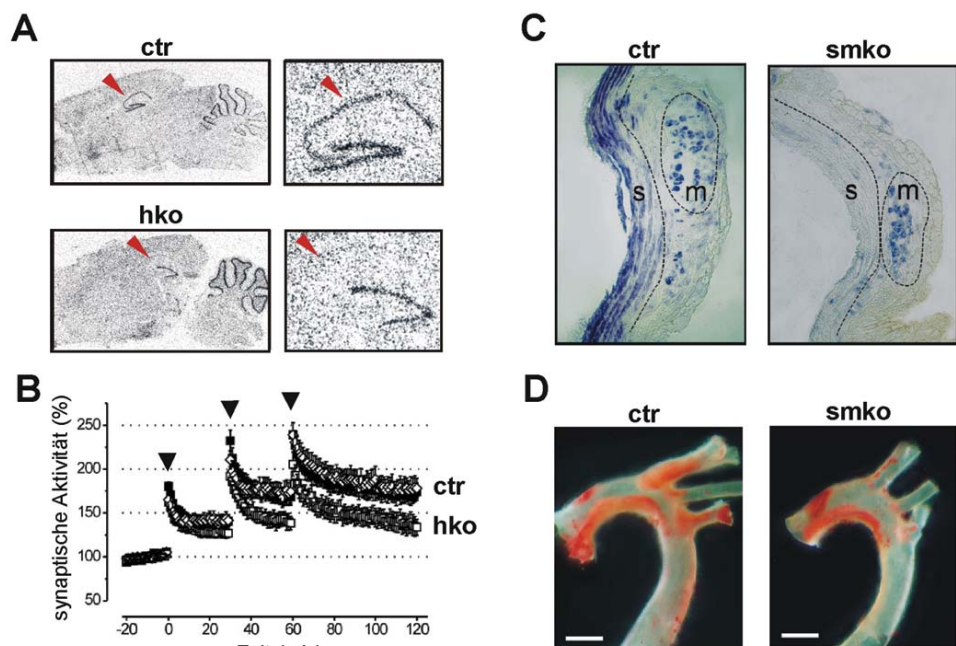


Abb. 4: Untersuchung gewebespezifischer cGKI-Knockout-Mäuse. (A) Nachweis der cGKI-mRNA durch *in situ* Hybridisierung in Gehirnschnitten von Kontrollmäusen (ctr) und hippocampuspezifischen cGKI-Mutanten (hko). Die CA1-CA3-Region des Hippocampus ist durch rote Pfeile angedeutet und die gesamte Region rechts vergrößert. (B) Langzeitpotenzierung der synaptischen Übertragung in der CA1 Region von ctr- und hko-Mäusen nach mehrfacher elektrischer Stimulation (Pfeilspitzen). Die basale Aktivität wurde auf 100% gesetzt. (C) Immunhistochemischer Nachweis der cGKI (Blau) in atherosklerotischen Plaques von Kontrollmäusen (ctr) und glattmuskelspezifischen cGKI-Mutanten (smko). Die glatte Muskelschicht (s) und makrophagenartige Zellen (m) sind angedeutet. (D) Anfärbung atherosklerotischer Plaques (Rot) im Aortenbogen von ctr- und smko-Mäusen. (A, B modifiziert nach<sup>[14]</sup>, copyright 2003 by the Society for Neuroscience; C, D modifiziert nach<sup>[17]</sup>, copyright 2003 by the National Academy of Sciences, U.S.A.)



(v.l.n.r.): Pascal Weinmeister, Silke Weber, Robert Lukowski, Susanne Feil, Robert Feil

### Zur Arbeitsgruppe

Unser Ziel ist es, die zeit- und gewebespezifische Mutagenese zur Untersuchung biologischer Fragestellungen anzuwenden und weiterzuentwickeln. Ein wesentlicher Aspekt ist die Identifizierung von Signalwegen, welche die Adaptationsfähigkeit von Zellen infolge veränderter Umweltbedingungen (zelluläre Plastizität) regulieren. Hiervon erhoffen wir uns ein besseres Verständnis verschiedenster (patho-)physiologischer Prozesse, von Herzkreislaufkrankheiten über das Lernen bis hin zum Altern (weitere Informationen unter: [www.ipt.med.tu-muenchen.de/forschun/Feil.htm](http://www.ipt.med.tu-muenchen.de/forschun/Feil.htm)).

gen Werkzeug der Mausgenetik entwickelt. Momentan wird es hauptsächlich zur Herstellung gewebespezifischer Knockout-Mäuse angewendet. Wie am Beispiel der cGMP-Signaltransduktion gezeigt, konnten mit Hilfe konditionaler Mausmodelle bereits viele biologische Fragestellungen beantwortet werden, die mit anderen Methoden nur unzureichend untersucht werden konnten. So zeigte sich, dass der cGMP/cGKI-Signalweg an Lernvorgängen im Gehirn beteiligt ist und die Atherosklerose möglicherweise fördert. Gerade letzterer Befund war überraschend und hat eine neue Diskussion über die Bedeutung dieses Signalwegs für das Zellwachstum ausgelöst<sup>[18]</sup>. Es ist anzunehmen, dass das Cre/loxP-Rekombinationssystem in Zukunft nicht nur zum Ausschalten von Genen verwendet wird, sondern zunehmend auch zur Markierung von Zellen (fate mapping), zum Einschalten von Genen, zur gezielten Integration von DNA und zur Induktion chromosomaler Translokationen. All diese DNA-Transaktionen können natürlich zeit- und gewebespezifisch durchgeführt werden. Damit wird eine Vielzahl somatischer Mutagenese-strategien zur Verfügung stehen, mit deren Hilfe wir Mausmodelle für weitverbreitete somatische Krankheiten des Menschen (z.B. Tumor- und Herzkreislaufkrankungen) etablieren können.

### Danksagung

Wir danken der DFG, der VolkswagenStiftung und Franz Hofmann für die Unterstützung unserer Forschung sowie Sabine Brummer und Anna-Maria Knorn für die praktische Hilfe.

### Literatur

- [1] **Nagy, A.** (2000): Cre recombinase: the universal reagent for genome tailoring. *Genesis* 26, 99–109.
- [2] **Sauer, B., and Henderson, N.** (1988): Site-specific DNA recombination in mammalian cells by the Cre recombinase of bacteriophage P1. *Proc Natl Acad Sci USA* 85, 5166–5170.
- [3] **Metzger, D., and Feil, R.** (1999): Engineering the mouse genome by site-specific recombination. *Curr Opin Biotechnol* 10, 470–476.
- [4] **Gu, H., Marth, J. D., Orban, P. C., Mossman, H., and Rajewsky, K.** (1994): Deletion of a DNA polymerase beta gene segment in T cells using cell type-specific gene targeting. *Science* 265, 103–106.
- [5] **Kuhn, R., Schwenk, F., Aguet, M., and Rajewsky, K.** (1995): Inducible gene targeting in mice. *Science* 269, 1427–1429.
- [6] **St-Onge, L., Furth, P. A., and Gruss, P.** (1996): Temporal control of the Cre recombinase in transgenic mice by a tetracycline responsive promoter. *Nucleic Acids Res* 24, 3875–3877.
- [7] **Feil, R., Brocard, J., Mascrez, B., LeMeur, M., Metzger, D., and Chambon, P.** (1996): Ligand-activated site-specific recombination in mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 93, 10887–10890.
- [8] **Soriano, P.** (1999): Generalized lacZ expression with the ROSA26 Cre reporter strain. *Nat Genet* 21, 70–71.
- [9] **Beavo, J. A., and Brunton, L. L.** (2002): Cyclic nucleotide research – still expanding after half a century. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3, 710–718.
- [10] **Hofmann, F.** (2005): The biology of cyclic GMP-dependent protein kinases. *J Biol Chem* 280, 1–4.
- [11] **Feil, R., Lohmann, S. M., de Jonge, H., Walter, U., and Hofmann, F.** (2003): Cyclic GMP-dependent protein kinases and the cardiovascular system: insights from genetically modified mice. *Circ Res* 93, 907–916.

[12] **Pfeifer, A., Klatt, P., Massberg, S., Ny, L., Saubier, M., Hirneiss, C., Wang, G. X., Korth, M., Aszodi, A., Andersson, K. E., Krombach, F., Mayerhofer, A., Ruth, P., Fassler, R., and Hofmann, F.** (1998): Defective smooth muscle regulation in cGMP kinase I-deficient mice. *Embo J* 17, 3045–3051.

[13] **Feil, R., Hofmann, F., and Kleppisch, T.** (2005): Function of cGMP-dependent protein kinases in the nervous system. *Rev Neurosci* 16, 23–42.

[14] **Kleppisch, T., Wolfsgruber, W., Feil, S., Allmann, R., Wotjak, C. T., Goebels, S., Nave, K. A., Hofmann, F., and Feil, R.** (2003): Hippocampal cGMP-dependent protein kinase I supports an age- and protein synthesis-dependent component of long-term potentiation but is not essential for spatial reference and contextual memory. *J Neurosci* 23, 6005–6012.

[15] **Feil, R., Hartmann, J., Luo, C., Wolfsgruber, W., Schilling, K., Feil, S., Barski, J. J., Meyer, M., Konnerth, A., De Zeeuw, C. I., and Hofmann, F.** (2003): Impairment of LTD and cerebellar learning by Purkinje cell-specific ablation of cGMP-dependent protein kinase I. *J Cell Biol* 163, 295–302.

[16] **Kuhbandner, S., Brummer, S., Metzger, D., Chambon, P., Hofmann, F., and Feil, R.** (2000): Temporally controlled somatic mutagenesis in smooth muscle. *Genesis* 28, 15–22.

[17] **Wolfsgruber, W., Feil, S., Brummer, S., Kupfänger, O., Hofmann, F., and Feil, R.** (2003): A proatherogenic role for cGMP-dependent protein kinase in vascular smooth muscle cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 100, 13519–13524.

[18] **Feil, R., Feil, S., and Hofmann, F.** (2005): A heretical view on the role of NO and cGMP in vascular proliferative diseases. *Trends Mol Med* 11, 71–75.

### Korrespondenzadresse:

**Dr. Robert Feil**  
Biedersteiner Str. 29  
D-80802 München, Germany  
Tel.: 089-4140-3269  
Fax: 089-4140-3261  
[feil@ipt.med.tu-muenchen.de](mailto:feil@ipt.med.tu-muenchen.de)