

**Gesellschaft für
Versuchstierkunde**

Society for Laboratory
Animal Science

GV-SOLAS

Ausschuss für Genetik und Labortierzucht

Tierschutzrechtliche Einordnung induzierbarer Transgen- und Knock-out-Systeme

Inhaltsverzeichnis

1) Systeme mit induzierbarer Transgenexpression	- 2 -
2) Systeme mit induzierbarem Knock-out-Defekt	- 3 -
3) Tierschutzrechtliche Einordnung induzierbarer Transgen- und Knock-out-Systeme	- 5 -
4) Literatur	- 9 -

1) Systeme mit induzierbarer Transgenexpression

Transgene Labornager spielen in der biomedizinischen und Grundlagenforschung eine herausragende Rolle. Für spezifische Fragestellungen werden häufig Tierstämme benötigt, bei denen der Experimentator Einfluss auf den Zeitpunkt der Transgenexpression nehmen kann. Hierzu können einerseits bei der Herstellung des Transgenkonstrukts Promotoren verwendet werden, deren Aktivität über die parenterale Verabreichung von Substanzen oder über die Fütterung beeinflusst werden können. Der Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase (PEPCK, McGrane et al., 1988) und der Myxovirus-(influenza virus)-resistance-1 (Mx1, Kuhn et al., 1995) Promoter stellen Beispiele für solche, in gewissen Grenzen regulierbare Promotoren dar. So kann die Aktivität des leber- und nieren-spezifischen PEPCK-Promoters durch eine proteinarme und kohlenhydratreiche Ernährung vermindert bzw. durch eine proteinreiche und kohlenhydratarme Ernährung erhöht werden. In ähnlicher Weise kann der Mx1-Promoter in empfindlichen Geweben wie Hepatozyten oder Leukozyten durch IFN α oder durch IFN α -Induktoren wie Poly(I) Poly(C) oder andere inflammatorische Reize aktiviert werden.

Eine deutlich effizientere zeitliche Kontrolle der Transgenexpression kann durch zweiteilige Transgen-Systeme, wie das Tet-off (Tetracycline-off) oder das Tet-on (Tetracycline-on) System, erreicht werden (Gossen und Bujard, 1992; Gossen et al., 1995). Im vorliegenden Manuskript werden diese beiden Systeme stellvertretend für vergleichbare Tiermodelle beschrieben. Sowohl beim Tet-off als auch beim Tet-on System können die beiden beteiligten Transgenelemente durch Zucht oder durch gemeinsame Mikroinjektion in einem Tierstamm kombiniert werden. Wie in Abbildung 1 dargestellt wird die Gewebespezifität des Systems durch das Promoterelement des ersten Transgenkonstruktes erreicht. Das erste Transgen kodiert im Fall des Tet-off Systems für den Tetrazyklin-abhängigen Transaktivator tTA und im Fall des Tet-on Systems für den reversen Tetrazyklin-abhängigen Transaktivator rtTA. Beide Transaktivatoren können Tetrazyklin bzw. dessen Derivat Doxyzyklin (Tc / Dox) binden. Beim Tet-off System inhibiert der Komplex aus Tc / Dox und dem tTA-Transaktivator die Aktivität des TRE- (Tetracycline responsive element) Promoters des zu regulierenden Zielgens. Dieses System wird durch den Entzug von Tc / Dox eingeschaltet. Beim Tet-on System aktiviert der Komplex aus Tc / Dox und rtTA-

Tierschutzrechtliche Einordnung induzierbarer Transgen- und Knock-out-Systeme

Transaktivator den TRE-Promoter des Zielgens. Das Tet-on System wird durch den Entzug des Induktors Tc / Dox deaktiviert.

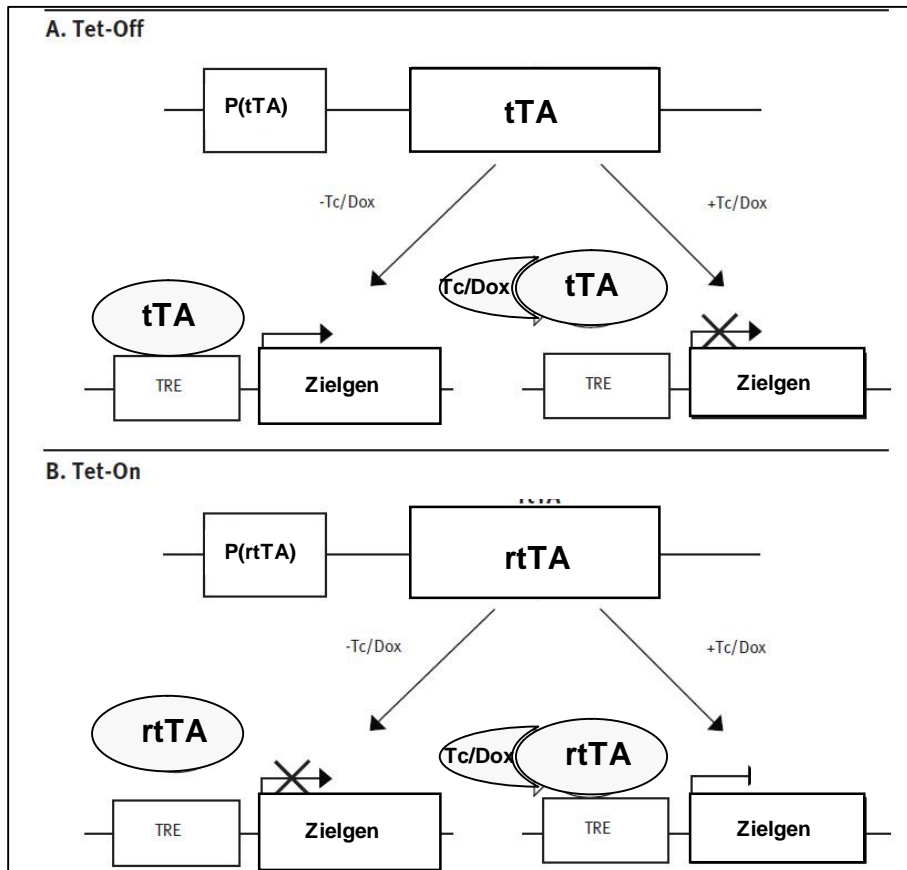


Abb. 1: Beim Tet-off System (A) wird der TRE- (Tetracycline responsive element) Promoter des zu regulierenden Transgens durch den Entzug von Tc / Dox aktiviert. Beim Tet-on System (B) wird der TRE-Promoter durch die Zugabe von Tc / Dox eingeschaltet. Die Gewebespezifität beider Systeme wird durch das Promotorelement des ersten Transgenkonstruktes [$P(tTA)$ bzw. $P(rtTA)$] bestimmt. Die Abbildung wurde freundlicherweise von „The Jackson Laboratory“ zur Verfügung gestellt und für das vorliegende Manuskript angepasst.

2) Systeme mit induzierbarem Knock-out-Defekt

Die konstitutiven und konditionalen Knock-out-Systeme spielen in der Forschung ebenfalls eine große Rolle. Zum Aufbau eines konditionalen Knock-out-Systems ist einerseits ein Tierstamm erforderlich, bei dem essentielle Teile des Zielgens mit loxP [locus of cross-over (x) des Bakteriophagen P1] Erkennungsstellen flankiert wurden. Das entsprechend genetisch veränderte, aber funktionell nicht beeinträchtigte Allel wird als „Flox“- (= flanked by loxP sites) Allel bezeichnet. Das Cre- (= causes recombination) Protein ist eine DNA-Rekombinase, die loxP Sequenzen erkennen

Tierschutzrechtliche Einordnung induzierbarer Transgen- und Knock-out-Systeme

und eine von zwei loxP-Stellen flankierte DNA-Region entfernen kann. Durch die Kreuzung eines Cre exprimierenden transgenen Mausstamms mit einem Mausstamm mit Flox-Allel kann in der resultierenden Doppelmutante das „gefloxt“ Allel in gewebespezifischer Weise in das Knock-out-Allel überführt und so ein konditionaler Knock-out erreicht werden. Es besteht auch die Möglichkeit, konditionale Knock-out-Systeme in zeitspezifischer Weise zu regulieren. Hierzu werden Fusionsproteine genutzt, bei denen das Cre-Rekombinase-Protein mit mutierten Formen der Ligandenbindungsdomäne des humanen Östrogen-Rezeptors (Feil et al., 1996; Metzger and Chambon, 2001, Metzger et al., 2003) bzw. alternativ des humanen Progesteron-Rezeptors (Kellendonk et al., 1996) kombiniert ist. Diese Fusionsproteine werden als CreER bzw CrePR bezeichnet und können durch die Gabe von Tamoxifen bzw. von RU486 aktiviert werden.

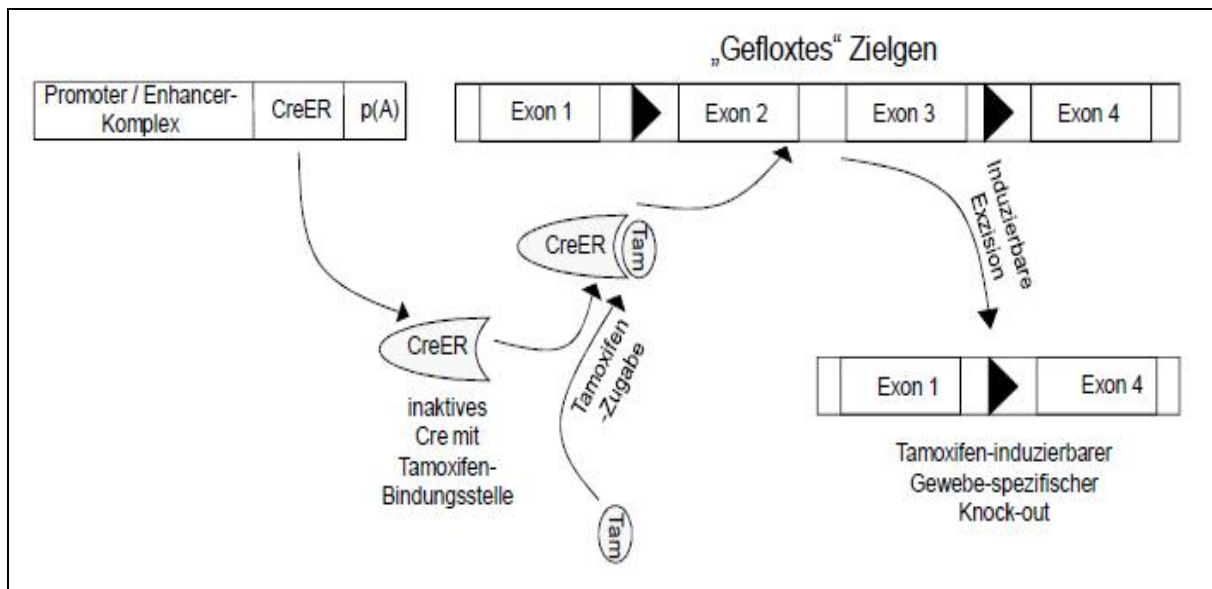


Abb. 2: CreER-mediertes, konditionales Knock-out-System: Das von einem gewebespezifischen Promoter / Enhancer-Komplex regulierte CreER-Fusionsgen exprimiert das CreER-Fusionsprotein, welches durch die Applikation von Tamoxifen aktiviert werden kann. Der CreER / Tamoxifen-Komplex trennt die mit loxP-Rekombinationsstellen flankierten Anteile des „geflochten“ Zielgens heraus und führt so in gewebespezifischer Weise einen Knock-out-Defekt herbei. Die Abbildung wurde freundlicherweise von der Universität Mainz zur Verfügung gestellt. [▶ = loxP Rekombinationsstelle; Tam = Tamoxifen, p(A) = Polyadenylierungssignal]

Ein induzierbares, gewebespezifisches Knock-out-System kann alternativ auch durch die Kombination der Cre / loxP Technologie mit dem Tet-on System erreicht werden. Hierzu werden die beiden Systeme mit Hilfe eines Transgenstamms miteinander

kombiniert, bei dem die Cre-Rekombinase unter die transkriptionelle Regulation des Tc / Dox-induzierbaren TRE-Promoters gestellt ist (Saam und Gordon, 1999).

3) Tierschutzrechtliche Einordnung induzierbarer Transgen- und Knock-out-Systeme

Das Bundesministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz (BMELV) hat ein Informationspapier über die tierschutzrechtliche Einordnung der Herstellung gentechnisch veränderter Tiere erstellt (Cramer et al., 1996), das folgende Kernaussagen trifft:

- a) Die Generierung von Transgen- oder Knock-out-Stämmen stellt nach Deutschem Tierschutzgesetz (TierSchG) einen Tierversuch dar und unterliegt der Genehmigungspflicht.
- b) Die Weiterzucht gentechnisch veränderter Tiere über die zweite Nachkommengeneration hinaus ist weder anzeige- noch genehmigungspflichtig, sondern stellt eine Zuchtmaßnahme nach §11 TierSchG dar. Auch die Weiterzucht von Tieren, die Träger von Erbgutveränderungen mit gesundheitsschädlichen Auswirkungen sind, ist nicht verboten, sofern dies wissenschaftlichen Zwecken dient [§11b (4) TierSchG]. Die Tierzüchter sind verpflichtet, alle Maßnahmen zu ergreifen, um das Wohlergehen der Tiere unter den für sie erforderlichen Haltungsbedingungen zu gewährleisten. Voraussetzung für die Wahrnehmung dieser Fürsorgepflicht sind adäquate Fachkenntnisse aller in die Betreuung des Tierbestandes involvierten Personen (§ 11 (2) 1 TierSchG, Wilson et al., 1995; Nevalainen et al., 2000; Nevalainen et al., 1999), insbesondere über die Art und Funktion spezifischer Mutationen der Tiere. Die Fürsorgepflicht impliziert darüber hinaus eine qualifizierte tierärztliche Überwachung und gegebenenfalls Behandlung des Tierbestandes mit adäquater Dokumentation der durchgeführten Maßnahmen.
- c) Werden an gentechnisch veränderten Tieren Versuche durchgeführt, die zu Schmerzen, Leiden oder Schäden führen können, so unterliegen diese in Abhängigkeit vom Versuchszweck der Anzeige- oder Genehmigungspflicht.

Die aufgeführten Kernpunkte des Informationspapiers des Bundesministeriums für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz gelten selbstverständlich auch für induzierbare transgene oder Knock-out-Tiere. Die tierschutzrechtliche Bewertung der Induktionsmaßnahmen erfolgt in Abhängigkeit von folgenden Faktoren:

- A) Zweck der Induktion: Die Induktion kann zu einem Versuchszweck erfolgen. Sie kann aber auch eine tierärztliche Behandlung von Zucht- oder zum Zweck der Bevorratung gehaltener Tiere im Rahmen der Fürsorgepflicht des Verantwortlichen nach §11 TierSchG darstellen. So ist beispielsweise das Tet-off System ohne jede Intervention aktiv, kann aber durch die Zugabe von Tc / Dox ausgeschaltet werden (siehe Abb.1). Beim Tet-off System kann somit eine Tc / Dox-Applikation dazu genutzt werden, die Expression eines gesundheitsschädlichen Genprodukts bei Zucht- und Vorratstieren zu unterbinden.
- B) Beeinträchtigung der Tiere durch die Induktion *per se*: Es ist zu klären, ob die Induktion durch beispielsweise die Applikation von Tc / Dox (Tet-on), Tamoxifen (CreER medierter konditionaler Knock-out) oder RU486 (CrePR medierter konditionaler Knock-out) im Einzelfall *per se* Schmerzen, Leiden oder Schäden hervorrufen kann. Erfolgt die Applikation der Induktoren der Transgen- oder Knock-out-Systeme auf parenteralem Weg, so muss immer von einer Belastung durch die Verabreichung selbst (Injektionsschmerz) ausgegangen werden. Aber auch die Applikation von Induktoren über die Fütterung oder über das Trinkwasser kann als belastend eingestuft werden, wenn die Möglichkeit besteht, dass dadurch die Nahrungsaufnahme temporär beeinträchtigt wird.
- C) Beeinträchtigung der Tiere durch die Folgen der Induktion: Es ist abzuklären, ob die Induktion eines Transgen- oder Knock-out-Systems zu Schmerzen, Leiden oder Schäden bei den betroffenen Tieren führen kann. Bei induzierbaren Transgen-Systemen kann hiervon in solchen Fällen ausgegangen werden, in denen das Zielgenprodukt pathogene Eigenschaften hat. Aber es können auch durch die Überexpression eines physiologischen Genprodukts schädigende Effekte verursacht werden. So führt beispielsweise die

Tierschutzrechtliche Einordnung induzierbarer Transgen- und Knock-out-Systeme

leberspezifische Überexpression des pro-inflammatorischen Zytokins IFN γ zu einer Hepatitis (Toyonaga et al., 1994). Andererseits muss die Induktion eines gewebespezifischen Knock-out-Defektes nicht zwangsweise eine Belastung der Trägartiere nach sich ziehen.

D) Durchführung weiterer Eingriffe

Wie in Tabelle 1 zusammengefasst, unterliegt die Induktion eines Transgen- oder Knock-out-Systems für Versuchszwecke durch beispielsweise die Applikation von Tc/Dox (Tet-on), Tamoxifen (CreER medierter konditionaler Knock-out) oder RU486 (CrePR medierter konditionaler Knock-out) immer dann der Anzeige- oder Genehmigungspflicht, wenn die Induktion *per se* oder deren biologische Folgen eine Belastung der Tiere (Schmerzen, Leiden oder Schäden) herbeiführt oder wenn weitere Eingriffe durchgeführt werden. Im Umkehrschluss entfällt eine Anzeige- oder Genehmigungspflicht nur in solchen Fällen, in denen weder durch die Induktion selbst noch durch deren Folgen Belastungen verursacht werden und in denen keine weiteren Eingriffe praktiziert werden.

Beeinträchtigung der Tiere durch die Induktion <i>per se</i>	Beeinträchtigung der Tiere durch die Folgen der Induktion	weitere Eingriffe	Genehmigungs- oder Anzeigepflicht
X	X	X	ja
X	X	-	ja
X	-	X	ja
X	-	-	ja
-	X	X	ja
-	X	-	ja
-	-	X	ja
-	-	-	nein

Tabelle 1: Tierschutzrechtliche Bewertung der Induktion eines Transgen- oder Knock-out-Systems für Versuchszwecke (+ bedeutet: Kriterium erfüllt; - bedeutet: Kriterium nicht erfüllt)

Tierschutzrechtliche Einordnung induzierbarer Transgen- und Knock-out-Systeme

Die Haltungsinhaber nach §11 TierSchG haben eine Verpflichtung, die gesundheitsschädlichen Auswirkungen von Mutationen bei Zucht- und Vorrattieren zu minimieren. Diese Fürsorgepflicht erstreckt sich auch auf induzierbare Transgen- und Knock-out-Systeme. So sind Stammkreuzungen zur Kombination der erforderlichen Allelkomponenten eines induzierbaren Systems auf das unabdingbare Maß zu reduzieren, wenn bei den Nachkommen gesundheitliche Belastungen zu befürchten sind. Sofern es bei den Zucht- und Vorrattieren induzierbarer Transgen- und Knock-out-Systeme zu systembedingten Belastungen kommen kann, ist eine adäquate Gesundheitsüberwachung zu installieren und es sind eindeutige Kriterien für die vorzeitige Tötung belasteter Tiere zu definieren. Falls induzierbare Transgen- und Knock-out-Systeme im Rahmen der Fürsorgeverpflichtung der Haltungsinhaber nach §11 TierSchG aktiviert oder deaktiviert werden, unterliegt dies keiner Anzeige- oder Genehmigungspflicht, auch dann nicht, wenn die tierärztliche Behandlung selbst Schmerzen induzieren sollte. Solche tierärztlichen Maßnahmen werden überwiegend das Tet-off System betreffen, bei dem das Transgen-System durch die Applikation von Tc / Dox ausgeschaltet wird. So kann die Expression schädigender Transgenprodukte wie beispielsweise die von Onkogenen in Zucht- oder Vorrattieren inhibiert werden. Es sind jedoch auch Fälle möglich, bei denen durch die Aktivierung eines Tet-on Systems eine Verbesserung der Gesundheit der Trägartiere erreicht werden kann. Dieser Fall tritt beispielsweise bei Defektmutanten auf, wenn der spezifische Defekt durch die Aktivierung eines Tet-on Systems kompensiert werden kann.

4) Literatur

- Cramer M, Iglauer F, Reifenberg K, Rütter U, Bottermann H, Crowell K, Müller P Wille M (1996) Die Erzeugung und Zucht transgener Mäuse und Ratten unter Tierschutzgesichtspunkten, Informationspapier des Bundesministeriums für Ernährung, Landwirtschaft und Forsten (BML) vom 15.04.1996, publiziert im Anhang 4 des Tierschutzberichtes 1997
- Feil R, Brocard J, Mascrez B, LeMeur M, Metzger D, Chambon P (1996) Ligand-activated site-specific recombination in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:10887–10890.
- Gossen M, Bujard H (1992) Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 5547–5551
- Gossen M, Freundlieb S, Bender G, Muller G, Hillen W, Bujard H (1995) Transcriptional activation by tetracyclines in mammalian cells. *Science* 268: 1766–1769
- Kellendonk C, Tronche F, Monaghan AP, Angrand PO, Stewart F and Schütz G (1996) Regulation of Cre recombinase activity by the synthetic steroid RU 486. *Nucl. Acids Res.* 24, 1404-1411.
- Kuhn R, Schwenk F, Aguet M, Rajewsky K (1995) Inducible gene targeting in mice. *Science* 269:1427-9
- McGrane MM, de Vente J, Yun J, Bloom J, Park E, Wynshaw-Boris A, Wagner T, Rottman FM, Hanson RW (1988) Tissue-specific expression and dietary regulation of a chimeric phosphoenolpyruvate carboxykinase/bovine growth hormone gene in transgenic mice. *J Biol Chem.*;263:11443-11451.
- Metzger D, Chambon P (2001) Site- and time-specific gene targeting in the mouse. *Methods Enzymol* 24:71–80.
- Metzger D, Indra AK, Li M, Chapellier B, Glyselink NB, Chambon P (2003) Targeted conditional somatic mutagenesis in the mouse: temporally-controlled knockout of retinoid receptors in epidermal keratinocytes. *Methods Enzymol* 364:379–408.
- Nevalainen T, Berge E, Gallix P, Jilge B, Melloni E, Thomann P, Waynforth B and van Zutphen LFM (1999) FELASA guidelines for education of specialists in laboratory animal science (Category D) *Lab Anim* 33: 1-15

Tierschutzrechtliche Einordnung induzierbarer Transgen- und Knock-out-Systeme

Nevalainen T, Dontas I, Forslid A, Howard BR, Klusa V, Käsermann HP, Melloni E, Nebendahl K, Stafeu FR, Vergara P and Versteegen J (2000) Recommendations for the education & training of persons carrying out animal experiments (Category B) accepted by the FELASA Board of Management; Lab Anim 34: 229-235

Saam JR and Gordon JI (1999) Inducible gene knockouts in the small intestinal and colonic epithelium. J Biol Chem 274: 38071-82

Toyonaga T, Hino O, Sugai S, Wakasugi S, Abe K, Shichiri M, Yamamura K. (1994) Chronic active hepatitis in transgenic mice expressing interferon-gamma in the liver. Proc Natl Acad Sci U S A 91: 614-8.

Wilson MS, Berge E, Maess, J, Mahouy G, Natoff I, Nevalainen T, van Zutphen LFM and Zaninelli P (1995). FELASA recommendations on education and training of persons working with laboratory animals: Categories A and C, Lab Anim 29: 121-131

Autoren: Franz Iglauer, Reinhart Kluge, Jutta Davidson, Johannes Schenkel, Ingrid Renner-Müller, Kurt Reifenberg