Charakterisierung der Neuroglia-Differenzierung nach Neurotrauma und während der Hirnentwicklung mit neuen transgenen Mausmodellen

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades des

Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie

der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Anja Scheller

aus Wernigerode

Oktober, 2008

Die vorliegende Arbeit habe ich selbstständig von Juli 2004 bis Oktober 2008 (Betreuung durch PD. Dr Frank Kirchhoff) in der Arbeitsgruppe Neurophysiologie, Abteilung Neurogenetik, am Max-Planck-Institut für experimentelle Medizin in Göttingen durchgeführt. Ich habe nur die angewendeten Hilfsmittel verwendet.

1. Gutachter:
Prof. Dr. Gerd Multhaup
Frei Universität Berlin
Institut für Chemie und Biochemie – Biochemie
Thielallee 63
14195 Berlin

2. Gutachter:
PD Dr. Frank Kirchhoff
Max-Planck-Institut für experimentelle Medizin
Neurophysiologie, Abteilung Neurogenetik
Hermann-Rein-Str. 3
37075 Göttingen

Tag der Disputation: 11.12.2008

FÜR TIMO

INHALTSVERZEICHNIS

Inhaltsverzeichnis ..... **VII**

Abkürzungsverzeichnis X

Abbildungsverzeichnis XII

Tabellenverzeichnis XIII

1. Einleitung **1**

1.1. Physiologie und Pathologie der Gliazellen 1

1.1.1. Astrocyten und ihre Aktivierung 2

1.1.2. Oligodendrocyten und Vorläuferzellen im gesunden wie geschädigten Gewebe 5

1.1.3. Mikroglia – residente Immunzellen des ZNS 8

1.1.4. NG2-Zellen und gliale Subtypen im adulten ZNS 8

1.1.5. Neurale Stammzellen im adulten Hirngewebe und nach Verletzungen 11

1.1.6. Verwendung von transgenen Mausmodellen zur Beantwortung biologischer Fragestellungen 11

1.1.7. Tiermodelle traumatischer Hirnerkrankungen 14

2. Zielsetzung **16**

Analyse der Reaktionen glialer Zellpopulation nach akuten Hirnverletzungen 16

3. Material und Methoden **17**

3.1. Materialien 17

3.1.1. Reagenzien 17

3.1.2. Verbrauchsmaterial 17

3.1.3. Gebrauchsfertige Reaktionssysteme 17

3.1.4. Lösungen, Puffer und Medien 17

3.1.5. Enzyme 21

3.1.6. Antikörper 21

3.1.7. Nukleinsäuren und Nukleotide 22

3.1.8. Bakterienstämme 24

3.1.9. Viren 24

3.1.10. Tiere 25

3.1.11. Hard- und Software 26

3.2. Methoden 27

3.2.1. Sterilisation 27

3.2.2. Herstellung transformationskompetenter Zellen 27

3.2.3. Transformation von Bakterien 27

3.2.4. Transformation von COS1-Zellen 28

3.2.5. Präparation und Analyse von DNA 28

3.2.6. Polymerase-Kettenreaktion 29

3.2.7. DNA-Sequenzierung 30
3.2.8. Manipulation und Zucht von Mäusen 30
3.2.9. Histologische und immunchemische Methoden 30
3.2.10. Proteinbiochemische Analysen 32
3.2.11. Mikroskopie 35
3.2.12. Tierversuchsdurchführungen 35
3.2.13. Kortikale Stichläsionen 35
3.2.14. Vireninjektionen 36
3.2.15. Mittlere cerebrale Arterienocclusion 36

4. Ergebnisse 38

4.1. Analyse von Läsionen im ZNS doppelt-transgener fluoreszenter Mäusen 38
4.1.1. Verwendung transgener Mausmodelle mit fluoreszenter Proteinexpression unter zelltypspezifischen glialen Promotoren 38
4.1.2. Kortikale Stichläsionen in GFAP-EGFP/PLP-DsRed-transgenen Mäusen 38
4.1.3. Morphologie, transgene Expression und immunhistochemische Identität der aktivierten Gliazellen 40
4.1.4. Ischämische Verletzungen in den doppelt-transgenen fluoreszenten Mäusen 48
4.2. Analyse der posttraumatischen Differenzierung aktivierter Gliazellen 52
4.3. Herstellung und Charakterisierung eines neuen transgenen Mausmodells mit Komplementierung der Cre-DNA-Rekombinase 53
4.3.1. Beschreibung der verwendeten Konstrukte 53
4.3.2. Immunhistochemische Analyse der PLP-Promotor kontrollierten Cre-Komplementierung 54
4.3.3. GFAP-Promotor kontrollierte Cre-Komplementierung 58
4.4. *In vivo* Koinzidenzdetektion durch Cre-Komplementierung 60
4.4.1. Analyse der Rekombination in doppelt-transgenen Tieren mit Expression der Cre-Fragmente unter verschiedenen Promotoren 60
4.4.2. Analyse der Rekombination im Verlauf der Embryonalentwicklung 68
4.5. *In vivo* Koinzidenzdetektion nach akuten Hirnverletzungen 71
4.6. Cre-Komplementierung im ZNS nach Injektion rekombinanter adeno-assoziierter Viren 77

5. Diskussion 80

5.1. Identifizierung aktivierter Gliazellen nach akutem Hirntrauma 80
5.2. Aktivierte Glia differenzieren sich zu reifen Astrocyten 82
5.3. Cre-Komplementierung als Koinzidenzdetektor für gliale Promotoraktivität 88
5.3.1. Rekombination nach Cre-Komplementierung während der embryonalen Entwicklung 88
5.3.2. Postnatale Differenzierung der NG2-Glia 90
5.4. Funktionelle Koinzidenzdetektion mit rekombinanten Viren 90
5.5. Cre-Komplementierung als neue neurobiologische Methode 92

5.5.1. Hohe DNA-Rekombinase Aktivität nach Cre-Komplementierung 92
5.5.2. Cre-Komplementierung als neues System 93

6. Zusammenfassung 95

7. Summary 95

8. Anhang I 95

8.1. Komplementierungssysteme 99
8.2. Cre-Komplementierung 101
8.2.1. PLP-Promotor kontrollierte Cre-Komplementierung 101
8.2.2. GFAP-Promotor kontrollierte Cre-Komplementierung 101
8.2.3. Unterschiede zwischen PLP-Cre-Komplementierung und der intakten Cre-Rekombinase 103
8.2.4. Rekombination nach GFAP-Promotor kontrollierter Cre-Komplementierung 103
8.2.5. Koinzidenzdetektion von GFAP und PLP-Promotor in verschiedenen Hirnregionen 106

9. Anhang II 110

9.1. Publikationsliste 110
9.1.1. Publikationen 110
9.1.2. Poster 110
9.2. Danksagung 112
9.3. Lebenslauf 114
9.4. Referenzen 115

Abkürzungsverzeichnis

AMPA	α-Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolpropionat
APC	Adenomatous polyposis coli
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin (*bovine serum albumine*)
CINC	cytokine-induced neutrophil chemoattractant
CLSM	konfokale Laserscan-Mikroskopie
CMV	humanes Zytomegalievirus
COS1	Tumorzellen aus der Niere der afrikanischen grünen Meerkatze, SV40 transformiert
CSPG	Chondroitinproteoglycan
DAPI	Diaminophenylindol
DMEM	Dulbecco's Modifiziertes Eagle Medium
CNPase	2'-3'-zyklische Nukleotidphosphodiesterase
dNTP	Desoxyribonukleosid-Triphosphat
ECFP	cyanfarbenes fluoreszentes Protein (*enhanced cyan fluorescent* protein)
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGFP	grünes fluoreszentes Protein (*enhanced green fluorescent* protein)
EYFP	gelb fluoreszentes Protein (*enhanced yellow fluorescent* protein)
GABA	γ-Aminobuttersäure
GFAP	saures Gliafaserprotein (glial fibrillary acidic protein)
GLAST	L-Glutamat-L-Aspartat-Transporter
GLT1	glialer Glutamattransporter
HEPES	(N-[2-Hydroxyethyl]piperazinyl-N'-[2-ethansulfonsäure])
HRP	Meerrettich-Peroxidase (*horse radish peroxidase*)
IFN-γ	Interferon-γ
IL-1B	Interleukin-1B
kb	Kilobasenpaare
LacZ	β-Galaktosidase-Gen in *Escherichia coli*
LDF	*Laser Doppler Flow*
LoxP	Locus *of crossover* aus dem Bakteriophagen P
MCP-1	monocyte chemoattractant protein-1
mGluR	metabotroper Glutamatrezeptor
MIP	maximale Intensitätsprojektion (*maximum intensity projection*)
n	Anzahl
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
OD	optische Dichte
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung (*phosphate-buffered saline*)

PB	Natriumphosphatpuffer
PCR	Polymerase-Kettenreaktion *(polymerase chain reaction)*
PDGFRα	*plateled derived growth factor α*
PLP	Proteolipid-Protein
PNS	Peripheres Nervensystem
PS	Pferdeserum
rAAV	rekombinante adeno-assoziierte Viren
RFU	relative Fluoreszenzeinheit (*relative fluorescent unit*)
SDS	Natriumdodecylsulfat
SGZ	Subgranularzone
SVZ	Subventrikularzone
TAE	Tris/Acetat/EDTA-Puffer
Taq	Thermophilus Aquaticus
TEV	*Tobacco Etch Virus*
TgH	Transgene Maus hergestellt über homologe Rekombination
TgN	Transgene Maus hergestellt über nicht-homologe Rekombination
TNFα	Tumor-Nekrose-Faktor α
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-Aminoethansulfonsäure
U	Einheit der Enzymaktivität (*unit*)
ü.N.	über Nacht
UV	ultraviolettes Licht
WPRI	*woodchuck promotor regulatory element*
WT	Wildtyp
XFP	Zusammenfassung aller fluoreszenten Proteine
ZNS	zentrales Nervensystem

Die in dieser Arbeit verwendeten Dimensionen wurden dem Internationalen Einheitensystem (SI) entsprechend angegeben. Soweit sinnvoll und vorhanden sind in dieser Arbeit deutsche Fachbegriffe verwendet worden. Sofern keine geeigneten deutschen Fachbegriffe genutzt werden konnten oder deutsche Begriffe keine eindeutige Bezeichnung darstellten, wurden englische Fachbegriffe verwendet. Diese sind, ebenso wie alle anderen Begriffe aus Fremdsprachen, kursiv geschrieben. Markenprodukte werden ohne gesonderte Kennzeichnung als solche bezeichnet.

Abbildungsverzeichnis

1. Entwicklung einer verletzungsinduzierten Gliose 7
2. Ausmaß gemeinsamer Eigenschaften von glialen Zelltypen 10
3. Zelltypspezifische Expression fluoreszenter Proteine unter verschiedenen neuralen Promotoren 13
4. Verwendete Vektoren und Konstrukte in dieser Arbeit 23
5. Analyse der glialen Reaktion bei akuter kortikaler Hirnverletzung in doppelt-transgenen GFAP-EGFP/PLP-DsRed-Mäusen 40
6. Variabilität in der Morphologie aktivierter Gliazellen 41
7. Ausmaß der Expression von DsRed1 und EGFP in aktivierten Gliazellen 42
8. Fehlen von astroglialen Markern in AO-Zellen 44
9. Nachweis von oligodendroglialen Markern in AO-Zellen 45
10. Fehlen neuronaler Marker in AO-Zellen 46
11. Expression oligodendroglialer Vorläufermarker in den AO-Zellen 47
12. Fehlen von NG2 in AO-Zellen 48
13. Mittlere cerebrale Arterienocclusion – Ausmaß und Lokalisation 49
14. Induktion einer MCAO in doppelt-transgenen fluoreszenten Mäusen 51
15. Funktionelle *in vivo* Komplementierung und DNA-Rekombination in PLP-C/N-Cre-Mäusen 57
16. DNA-Rekombination in einer PLP-Cre-Maus 57
17. *In vivo* GFAP-Cre-Komplementierung (GFAP-CCre(F)/NCre(V)) 59
18. *In vivo* Koinzidenzdetektion der Aktivität von GFAP- und PLP-Promotor (GFAP-CCre(F)/PLP-NCre(D)) 63
19. *In vivo* Koinzidenzdetektion der Aktivität von GFAP- und PLP-Promotor (GFAP-NCre(T)/PLP-CCre(K)) 64
20. *In vivo* Koinzidenzdetektion der Aktivität von GFAP- und PLP-Promotor (GFAP-NCre(T)/PLP-CCre(R)) 65
21. *In vivo* Koinzidenzdetektion der Aktivität von GFAP- und PLP-Promotor (GFAP-NCre(W)/PLP-CCre(K)) 66
22. *In vivo* Koinzidenzdetektion der Aktivität von GFAP- und PLP-Promotor (GFAP-NCre(V)/PLP-CCre(K)) 67
23. Entwicklungsabhängige DNA-Rekombination der GFAP/PLP-Cre-Komplementierung 69
24. NG2-Immunreaktivität nach GFAP-PLP-Komplementierung in verschiedenen Alterstufen 70
25. Zeitabhängige Untersuchung der *in vivo* Koinzidenzdetektion nach einer Verletzung des ZNS 72
26. *In vivo* Koinzidenzdetektion nach akutem Hirntrauma im Kortex – (GFAP-NCre(T)/PLP-CCre(K)) 73
27. *In vivo* Koinzidenzdetektion nach akuter kortikaler Verletzung (GFAP-NCre(T)/PLP-CCre(R)) 74
28. *In vivo* Koinzidendetektion in den Linien GFAP-CCre(F)/PLP-NCre(D) und GFAP-NCre(V/W)/PLP-CCre(K) 76
29. Rekombination nach Ko-Injektion von Viren mit C-und NCre-terminalen Cre-Fragmenten unter der Kontrolle neuraler Promotoren 78

30. Differenzierungspotential von OPCs und Astrocyten 87
31. Koinzidente Aktivität von GFAP- und PLP-Promotor während der Embryonalentwicklung 89
32. Anwendungsbeispiele für Komplementierungen mit biologischer Relevanz 100
33. Western Blot-Analyse der PLP-C/NCre- bzw. der GFAP-C/NCre-Founder 102
34. DNA-Rekombination in Tieren mit Cre-Komplementierung und intakter Cre-Rekombinase unter Kontrolle des PLP-Promotors 105
35. Cre-Komplementierung unter der Kontrolle des humanen GFAP-Promotors in verschiedenen Hirnregionen (GFAP-CCre(F)/NCre(V)) 105
36. Koinzidenzdetektion der Aktivität der Promotoren GFAP und PLP – Linie GFAP-CCre(F)/PLP-NCre(D) 107
37. Koinzidenzdetektion der Aktivität der Promotoren GFAP und PLP – Linie GFAP-NCre(T)/PLP-CCre(K) 107
38. Koinzidenzdetektion der Aktivität der Promotoren GFAP und PLP – Linie GFAP-NCre(T)/PLP-CCre(R) 108
39. Koinzidenzdetektion der Aktivität der Promotoren GFAP und PLP – Linie GFAP-NCre(V)/PLP-CCre(K) 109
40. Koinzidenzdetektion der Aktivität der Promotoren GFAP und PLP – Linie GFAP-NCre(W)/PLP-CCre(K) 109

Tabellenübersicht:

Tabelle 1: Verwendete Erstantikörper für immunhistochemische Analysen und proteinbiochemische Verfahren 21
Tabelle 2: Verwendete Zweitantikörper für immunhistochemische Analysen und proteinbiochemische Verfahren 22
Tabelle 3: Verwendete Genotypisierungsprimer 24
Tabelle 4 Benennung der neuen transgenen Mauslinien mit Cre-Komplementierung 26
Tabelle 5 Vergleich der Expression von EGFP und DsRed1 in aktivierten Gliazellen 42
Tabelle 6 Verwendete Markerproteine mit ihrer zelltypspezifischen Expression 43
Tabelle 7 Benennung der neuen transgenen Mauslinien mit Cre-Komplementierung 53
Tabelle 8 Rekombination nach *in vivo* Koinzidentetektion in den neuen transgenen Mauslinien mit Cre-Komplementierung 61

1. EINLEITUNG

1.1. Physiologie und Pathologie der Gliazellen

Das menschliche Gehirn ist das Kontrollzentrum für alle lebenswichtigen Organe und ihre Funktionen. Es werden Signale empfangen, verarbeitet, integriert und weitergeleitet. Es gibt im Gehirn ca. 10^{11} Neurone, die rund 10^{14} Synapsen bilden. Neben den Nervenzellen gibt es einen weiteren sehr wichtigen Zelltyp: die Gliazellen (Somjen, 1988).

Als Glia werden alle nicht-neuronalen Zellen des Nervensystems bezeichnet. Der Name Glia leitet sich vom griechischen Wort für Leim ab und wurde von Rudolph Virchow begründet (Virchow 1854, zitiert nach (Somjen, 1988; Baumann und Pham-Dinh, 2001). Zu diesem Zeitpunkt wurden Gliazellen als passive Stützzellen der Neurone verstanden. Die Unterscheidung der Gliazellen erfolgt in Makro- sowie Mikroglia. Zu den Makroglia gehören die Astrocyten und Oligodendrocyten (Schwann-zellen im peripheren Nervensystem) sowie die Ependymzellen. Mikroglia sind die Makrophagen des Gehirns.

Durch die Verschaltung eines einzelnen Neurons mit zum Teil mehr als tausend anderen Neuronen über Synapsen kommt es zu einer hohen Komplexität im menschlichen Gehirn (1100-1300 Millionen Kontakte / mm³ (Oberheim et al., 2006). Diese Komplexität wird noch gesteigert durch Astrocyten, die sich in direkter Nachbarschaft zu den Synapsen befinden. Präsynaptische Endigung und Postsynapse stehen nicht nur miteinander in funktionellem Kontakt, sondern wechselwirken auch mit den benachbarten glialen Astrocytenfortsätzen. Gemeinsam bilden diese Kompartimente die dreigeteilte Synapse (*Tripartite Synapse*) (Araque et al., 1999).

Im prefrontalen Cortex steigt die Anzahl der Gliazellen im Verhältnis zu Neuronen von Nagern (0.3:1) zu Menschen (1.65:1) (Sherwood et al., 2006). Dies wird als phylogenetischer Vorteil höherer Säuger in ihrer Hirnkomplexität gegenüber niederen Säugern wie z.B. Nagern gewertet. Ein protoplasmatischer Astrocyt im menschlichen Gehirn kontaktiert und umhüllt ca. 2 Millionen Synapsen; im Vergleich hierzu umfassen protoplasmatische Astrocytenfortsätze in Mäusen nur etwa 90.000 Synapsen (Oberheim et al., 2006).

Verletzungen des zentralen Nervensystems (ZNS) initiieren einen Prozess, der als reaktive Gliose bezeichnet wird. Verschiedene neurale Zellen reagieren auf akute Hirntraumata mit exzitotoxischem Zelltod. Alle neuralen Zellen, die ionotrope Glutamat-Rezeptoren exprimieren, sind betroffen, da es nach einer Überaktivierung zu einem zu hohen Ca^{2+}-Einstrom kommt. Daher ist Glutamat nicht nur toxisch für Neurone, sondern auch für die glialen Zellen, wie Astrocyten und Oligodendrocyten (Matute et

al., 2006). Astrocyten, Mikrogliazellen und Oligodendrocyten-Vorläuferzellen reagieren auf akute Verletzungen oder neuronalen Zelltod durch Proliferation, verstärkte Expression von spezifischen zellulären Markern sowie mit einer Änderung ihrer Zelloberfläche und der Morphologie. Des Weiteren kommt es zur Sekretion von verschiedenen Stoffen wie Chemo- und Cytokinen (Streit et al., 1999; Levine et al., 2001; Kreutzberg, 1996; Raivich et al., 1999; Eng et al., 2000).

Der Verlust zentralnervöser Funktionen nach einer akuten Verletzung, einer Ischämie, einer Infektion oder bei degenerativen Erkrankungen ist zweifelsfrei auf die Dysfunktion bzw. das Absterben der Neurone zurückzuführen. Bekannt ist aber auch, dass sich die Gliazellen als erste Kommunikationspartner in einer Schlüsselposition für die Ausrichtung der klinischen Symptome befinden. Ein genaueres Verständnis, wie und warum Glia auf eine Schädigung des ZNS reagieren, sollte die darauf folgenden multizellulären Prozesse nicht nur besser erklären, es sollte auch möglich sein, Einfluss darauf zu nehmen.

1.1.1. Astrocyten und ihre Aktivierung

Als Interaktionspartner der Neurone übernehmen Astrocyten wichtige Aufgaben in physiologischen, aber auch pathologischen und regenerativen Prozessen des Gehirns. Neben der Versorgung der Neurone mit Sauerstoff und Nährstoffen entsorgen sie neuronale Stoffwechselprodukte (z.B. CO_2), nehmen überschüssige Neurotransmitter auf und bauen sie ab (Fields und Stevens-Graham, 2002). Sie sind essentiell für die neuronale Erregungsfortleitung, da sie die Neurotransmission beenden und zur Ionenhomöostase durch die Aufnahme von Kaliumionen beitragen. Astrogliale Fortsätze umhüllen eng Synapsen (Hirrlinger et al., 2004) und kontrollieren die extrazellulären Konzentrationen an Neurotransmittern durch verschiedene Transportersysteme (Bergles et al., 1999). Zudem exprimieren sie zahlreiche Neurotransmitter-Rezeptoren wie ionotrope AMPA- (α-Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-Isoxazolpropionat) (Grass et al., 2004; Matthias et al., 2003) oder NMDA- (N-Methyl- D-Aspartat) Glutamatrezeptoren (Schipke et al., 2001). Des Weiteren werden metabotrope purinerge, adrenerge und glutamaterge Rezeptoren von Astrocyten exprimiert. Diese Neurotransmitterrezeptoren erlauben es den Astroglia, neuronale Aktivität zu erkennen und über die Aktivierung verschiedener Signalwege darauf zu reagieren. Beispiele sind die Depolarisierung der astroglialen Zellmembran (Verkhratsky et al., 1998) sowie eine Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+}-Konzentration (Deitmer et al., 1998) nach neuronaler Aktivität. Astrocyten reagieren sowohl im gesunden wie auch verletzten Gewebe nicht als einzelne Zellen, sondern als ein Syncytium von miteinander verbundenen Zellen (Pekny und Nilsson, 2005).

Gliazellen sind in der Lage, Neurotransmitter (hier bezeichnet als Gliotransmitter) als Antwort auf neuronale Stimulierung freizusetzen (Zhang et al., 2004a; Zhang und

Haydon, 2005). Die Neurotransmitter, die von der Präsynapse freigesetzt werden, aktivieren Rezeptoren auf benachbarten Astrocytenfortsätzen, die ihrerseits dann Gliotransmitter freisetzen (Haydon, 2001). Von Astrocyten freigesetzte Transmitter sind unter anderem Glutamat (Zhang et al., 2004a), ATP (Pascual et al., 2005) oder D-Serin (Miller, 2004; Mothet et al., 2005). Diese sind in der Lage, die neuronale Netzwerkaktivität zu modulieren.

Die Aktivierung der Astroglia erfolgt generell nach akuten Verletzungen des ZNS, sowie auch bei neurodegenerativen Prozessen. Der Hauptablauf während der Aktivierung involviert zelluläre Hypertrophie, eine Änderung der astrocytären Genexpression sowie eine erhöhte Proliferation. Eine wichtige und lang bekannte Funktion von Astrocyten ist die Bildung der glialen Narbe (*glial scar*), die eine räumliche wie temporäre Ausbreitung der Verletzung unterbindet (Bush et al., 1999; Faulkner et al., 2004). Die Ausbreitung des Entzündungsprozesses auf benachbartes, nicht betroffenes neurales Gewebe wird verhindert. Astrocyten haben sowohl pro- als auch anti-inflammatorische Funktionen an verschiedenen Orten der Verletzung (John et al., 2003). Die Astroglia sezerniert molekulare Signalstoffe, die die Migration vieler Zelltypen beeinflussen. Zudem sind Astrocyten essentiell für die Aufrechterhaltung wie auch die Wiederherstellung der Blut-Hirn-Schranke nach einer Verletzung (Bush et al., 1999; Faulkner et al., 2004). In diesem Kontext ist auch wichtig, dass Astrocyten direkten Einfluss auf die Geschwindigkeit des cerebralen Blutflusses über ihre Endfüsse haben. Diese befinden sich zu 99 % in direktem Kontakt mit den Blutkapillaren (Hawkins und Davis, 2005). Da Astrocyten auf der anderen Seite mit Neuronen in Kontakt stehen, ist es ihnen möglich, bei neuronaler Aktivität direkten Einfluss auf den cerebralen Blutfluss zu nehmen. Die neuronale Glutamatausschüttung führt intrazellulär zu Calciumkonzentrationsänderungen in Astrocyten, was zu einer Cyclo-Oxigenase-(COX)-Produkt (Prostanoide) vermittelten Vasodilation über die perivaskulären astrocytären Endfüsse führt (Zonta et al., 2003; Simard et al., 2003; Iadecola und Nedergaard, 2007; Takano et al., 2006).

Die gliale Narbe besteht primär aus Astrocyten, bei schwereren Läsionen (geöffnete Meningen) wandern Fibroblasen und Makrophagen über die offene Blut-Hirn-Schranke, an deren Stabilität Astrocyten auch beteiligt sind, in den Verletzungsherd ein (Silver und Miller, 2004). Bei den meisten Hirnverletzungen ist die Proliferation der Astroglia gering und begrenzt von der Penumbra, die den Verletzungsherd umgibt (Faulkner et al., 2004). Die Hypertrophie ergibt sich aus einer erhöhten Expression von Intermediärfilamenten wie GFAP (*glial fibrillary acidic protein*, Bignami et al., 1972) und Vimentin (für einen Review siehe Silver und Miller, 2004). Weiterhin werden in Astrocyten nach einer Läsion Proteoglycane erhöht exprimiert (wie z.B. Chondroitinsulfatproteoglycane - CSPG). Zu dieser Klasse der wachstumsunterstützenden Proteine gehören Brevican, Neurocan, NG2, Phosphacan sowie Versican (Margolis und Margolis, 1993).

Die Expression dieser Proteine vergrößert die gliale Narbe im Gehirn sowie im Rückenmark (Jones et al., 2003; Tang et al., 2003; McKeon et al., 1999). Proteoglycane wirken zudem als Barriere für die Regeneration von Axonen (für Review siehe (Silver und Miller, 2004). Es konnte gezeigt werden, dass Nervenfasern nach Verletzungen des ZNS besser wachsen, wenn reaktive Astrocyten fehlen (Bush et al., 1999; Faulkner et al., 2004). Verbesserte axonale Regeneration wurde auch gezeigt nach Deletion von GFAP, Vimentin oder EphA4, was zu einer veränderten astrocytären Reaktivität nach Verletzungen führt (Menet et al., 2003; Wilhelmsson et al., 2004). In diesem Kontext sei aber auch auf Publikationen verwiesen, die zeigen wie Astrocyten (radiale Glia) das Wachstum der Neuriten während der Entwicklung unterstützen (Hatten et al., 1991) und das reife Astrocyten essentiell für lokales Nervenfaserwachstum und die Plastizität im adulten Gewebe sein können (Gage et al., 1988). Von reaktiven Astrocyten stammendes Fibronectin unterstützt das erneute Wachstum von bestimmten Axonen entlang der Zelloberflächen von Astrocyten (Kawaja und Gage, 1991; Tom et al., 2004).

Ein Problem nach einer akuten Verletzung sind die darauf folgenden sekundären Effekte. Der akuten Verletzung folgt eine weitere Degeneration Stunden oder Tage später. Astrocyten schützen benachbarte Oligodendrocyten und Neurone vor Zelltod durch Exzitotoxizität über die Aufnahme von Glutamat (über Rezeptoren und Transporter). Während einer Ischämie im ZNS können Astrocyten aber die Zerstörung der Neurone abhängig vom Zeitpunkt bzw. der postischämischen Stufe auch verstärken (Swanson et al., 2004). Durch die Verbindung der Astrocyten über Gap Junctions und das damit verbundene große Syncytium ist die Verteilung von potentiellen schädlichen Ionen und Metaboliten über lange Distanzen möglich. Reaktive Astrocyten selbst sind in der Lage, Moleküle zu generieren, die cytotoxisches Potential haben. Als Beispiel ist hier Stickoxid (NO) zu nennen. Generiert für lokale Signalprozesse (Ikeda und Murase, 2004) über die NO-Synthase, kann NO benachbarte Neurone beschädigen und aktiv zur Zerstörung des Gewebes durch sekundäre Degeneration oder als Antwort auf entzündliche Prozesse beitragen (Neufeld und Liu, 2003; Antony et al., 2004).

Die Ursachen, warum Astrocyten dermaßen komplex reagieren und dabei inhibitorische wie auch permissive Signalstoffe unter bestimmten Bedingungen freisetzen, sind nur wenig verstanden. Die positive Reaktion der Astroglia, die sich ab einem bestimmten Ausmaß der Gewebszerstörung ins Negative umkehrt, ist abhängig von der Größe der Verletzung (Pekny und Nilsson, 2005; Myer et al., 2006).

1.1.2. Oligodendrocyten und Vorläuferzellen im gesunden wie geschädigten Gewebe

Der zweite wichtige Zelltyp der Makroglia, die ebenfalls enge Interaktionen mit den Neuronen bilden, sind die Oligodendrocyten im ZNS sowie die Schwannzellen im peripheren Nervensystem (PNS) (Pìo del Rìo Hortega, zitiert nach (Somjen, 1988). Oligodendrocyten bilden die Myelinscheide im Gehirn und ermöglichen dadurch die schnelle Erregungsfortleitung. Myelin ist eine spezialisierte Plasmamembran der Oligodendrocyten, die lamellenartig um Axone gewickelt ist und die erstmals 1854 von Rudolph Virchow beschrieben wurde (Virchow, 1854; zitiert nach (Baumann und Pham-Dinh, 2001)). Einzelne Oligodendrocyten können dabei mehrere Myelinsegmente an einem oder mehreren Axonen ausbilden. Die Myelinscheiden sind durch Ranviersche Schnürringe unterbrochen, an denen die Erregungsleitung saltatorisch stattfindet, wodurch die Leitungsgeschwindigkeit auch sehr dünner Axone effizient erhöht wird (Baumann und Pham-Dinh, 2001).

Die Aktivierung Ca^{2+}-abhängiger Signalwege durch Neurotransmitter steuert die Entwicklung der myelinisierenden Zellen (Belachew und Gallo, 2004; Fields und Stevens-Graham, 2002). Die Entwicklung der Oligodendrocyten involviert die Migration der Oligodendrocytenvorläuferzellen (*Oligodendrocyte Precursor Cells* – OPCs) zum endgültigen Bestimmungsort innerhalb des ZNS, gefolgt von lokaler Proliferation und Differenzierung zu reifen myelinbildenden Oligodendrocyten (Miller, 2002). Diese Prozesse werden durch extrazelluläre, axonabhängige Faktoren geregelt, mehrere dieser Signaltransduktionskaskaden werden über Ca^{2+} gesteuert. Viele Neurotransmitter führen zu Ca^{2+}-Signalen in OPCs und beeinflussen die Entwicklung der Vorläuferzellen über ATP. Dieser reguliert Migration, Proliferation und Differenzierung primär über die Aktivierung metabotroper P2Y-Rezeptoren (Agresti et al., 2005). Reife Oligodendrocyten sowie oligodendrogliale Vorläuferzellen exprimieren ähnlich wie Astrocyten eine Vielzahl verschiedener Rezeptoren, darunter auch AMPA- und Kainat-Rezeptoren (Matute et al., 2007). Ebenso konnte die Expression von NMDA-Rezeptoren und ihre Aktivierung nach Hirnverletzungen in Oligodendrocyten gezeigt werden (Karadottir et al., 2005; Salter und Fern, 2005; Micu et al., 2006). Des Weiteren exprimieren Zellen der Oligodendrocyten-Lineage metabotrope Glutamatrezeptoren, deren Expression stark entwicklungsabhängig reguliert ist und die in reifen Oligodendrocyten nahezu nicht mehr vorkommen (Deng et al., 2004). Neben Glutamat-Rezeptoren werden auch Glutamat-Transporter in Oligodendrocyten exprimiert, hierzu gehören z.B. GLT1 (*glutamate transporter 1*, EAAT2), (Danbolt, 2001) wie aber auch GLAST (*glutamate aspartate transporter*, EAAT1), (Matute et al., 2007). OPCs exprimieren zusätzlich den neuronalen exzitatorischen Aminosäure-Transporter 1 (EAAT3), (Domercq et al., 1999). Diese Daten zeigen, dass Oligodendrocyten, ähnlich wie Astrocyten, die wichtigsten Rezeptoren wie auch Transporter für Glutamat

exprimieren. Die Transporter regulieren die basale extrazelluläre Glutamat-Konzentration und verhindern so eine Überaktivierung der Glutamat-Rezeptoren unter physiologischen Konditionen.

Studien der letzten Jahre haben gezeigt, dass Oligodendrocyten sehr empfindlich auf Störungen der intrazellulären Ca^{2+}-Konzentrationen reagieren und der anfälligste gliale Zelltyp für Exzitotoxizität sind. Die Aktiverung von AMPA-, Kainat- und/oder NMDA-Rezeptoren in Oligodendrocyten führt zum Einstrom von Ca^{2+}-Ionen, die in den Mitochondrien akkumuliert werden. Daraufhin kommt es zu einer Depolarisation der Membranen, was zu einer erhöhten Produktion von freien Sauerstoff-Radikalen führt. Zudem werden proapoptotische Faktoren freigesetzt, die wiederum Caspasen aktivieren (Sanchez-Gomez et al., 2003).

OPCs werden bei einer Verletzung des ZNS aktiviert und reagieren sensitiver gegenüber einem Sauerstoff- und Glukosemangel nach einer ischämischen Schädigung (Fern und Moller, 2000) als reife Oligodendrocyten (für einen Review siehe (Matute et al., 2007). Sie setzen Glutamat durch eine Umkehrung ihrer Gutamat-Transporter unter hypoxischen Bedingungen frei (Domercq et al., 1999). Eine mittlere cerebrale Arterienocclusion (MCAO) kann einen raschen Zelltod der Oligodendrocyten induzieren (Mandai et al., 1997; Petito et al., 1998). Wie in Astrocyten werden in OPCs verschiedene Markerporteine verstärkt exprimiert und die Vorläuferzellen proliferieren. Einige Tage nach der akuten Durchblutungsstörung ist daher eine erhöhte Anzahl von oligodendroglialen Zellen in benachbarten Regionen (Penumbra) des Verletzungs-herdes (Core) (Mandai et al., 1997) wie auch von unreifen Oligodendrocyten (OPCs) in den Regionen um die lateralen Ventrikel zu erkennen (Gottlieb et al., 2000). So kann der Verlust von Oligodendrocyten zu einem Teil vom Hirngewebe durch die Generierung und Proliferation neuer Oligodendrocyten kompensiert werden.

OPCs exprimieren unter anderen den basischen Helix-Loop-Helix-Transkriptionsfaktor Olig2 (Buffo et al., 2005) sowie das Chondroitinproteoglycan NG2 (Nishiyama et al., 2005). Es gibt Hinweise darauf, dass diese Zellen Oligodendrocyten nicht nur während der Entwicklung, sondern auch nach pathologischen Demyelinisierungsprozessen bilden (Polito und Reynolds, 2005). Zudem konnte die RNA des PDGFRα (*platelet derived growth factor receptor α*) in OPCs nachgewiesen werden (Baumann und Pham-Dinh, 2001). OPCs exisiteren nicht nur während der Embryonalentwicklung, sondern auch im adulten Gewebe. Die Expression von NG2 ist als Marker für OPCs anerkannt (Baumann und Pham-Dinh, 2001), aber nicht alle NG2-positiven Zellen in adultem Gewebe entsprechen OPCs. Es wird momentan diskutiert, ob überhaupt alle NG2-positiven Zellen zur Oligodendrocyten-Lineage gehören (Matthias et al., 2003; Butt et al., 2005). Auf diesen Sachverhalt wird in Abschnitt 2.1.4 näher eingegangen werden.

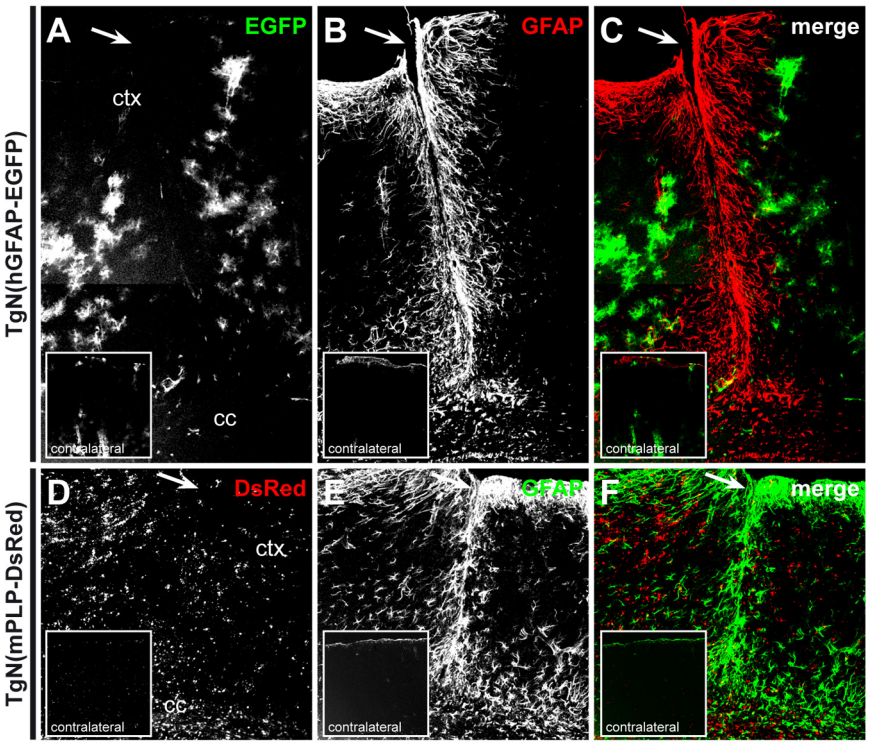


Abb. 1 Entwicklung einer verletzungsinduzierten Gliose

In transgenen Mäusen (TgN(GFAP-EGFP)$_{GFEA}$ und TgN(PLP-DsRed)$_{PRDA}$) wurde eine kortikale Stichverletzung gesetzt. Vier Wochen nach dem akuten Hirntrauma ist die Aktivierung der Astrocyten als ipsilaterale Hochregulierung des GFAP zu erkennen (Vergleich mit der kontralateralen Seite ohne Aktivierung (kleines Bild)). Oligodendrocyten wurden ebenfalls aktiviert (Oligodendrogliose). Der PLP-Promotor wurde in Folge dessen verstärkt abgelesen, nachweisbar gibt es mehr endogene mRNA nach Verletzungen, was in einer erhöhten Expression des Transgens (DsRed1) resultiert.

Ein wichtiges Protein der Oligodendrocyten ist das Proteolipidprotein (PLP). Es kommt entwicklungsabhängig in zwei Spleißvarianten vor (plp/dm20). PLP ist ein Protein mit vier Transmembrandomänen, das während der Entwicklung des Myelins hochreguliert wird und der Hauptbestandteil des Myelins im reifen ZNS ist (Tuason et al., 2008). In PLP/DM20-defizienten Mäusen ist der axonale Transport eingeschränkt und es gibt eine fortschreitende axonale Degeneration in myelinisierten Fasern (Werner et al., 2007). DM20 wird in Mausembryonen in neuralen Vorläuferzellen ab Embryonaltag 9.5 (E9.5) exprimiert. Ab E14.5 kann DM20 in oligodendroglialen Vorläuferzellen detektiert werden (Tuason et al., 2008). Es kann ein entwicklungsspezifischer Wechsel in der PLP/DM20-Regulation beobachtet werden: OPCs exprimieren präferentiell DM20, während mit zunehmender Myelin-Entwicklung das Verhältnis in Richtung PLP verschoben wird, das in reifen Oligodendrocyten dann prominent vorkommt. PLP-mRNA ist schon in frühen Embryonalstadien detektierbar (Timsit et al., 1995) und wird nach einer Verletzung in Oligodendrocyten hochreguliert (Frei et al., 2000). Mutationen

im *plp/dm20*-Locus führen zu einem Spektrum von spastischen Krankheiten, zu denen die Pelizaeus-Merzbacher-Krankheit (PMD) und die spastische Paraplegie Typ 2 (SPG2) gehören (für einen Review siehe (Inoue, 2005; Nave und Trapp, 2008).

1.1.3. Mikroglia – residente Immunzellen des ZNS

Mikrogliazellen sind die residente Immunzellpopulation des ZNS (Kreutzberg, 1996). Sie wurden erstmals von Pìo Del Rìo-Hortega 1921 klassifiziert (Somjen, 1988). Monocyten des Blutes wandern während der embryonalen Entwicklung in das Gehirn und differenzieren zu hirnresidenten Mikrogliazellen (Kim und de, 2005).

Sie sind charakterisiert durch ein kleines Soma, mit feinen, weit verzweigten Fortsätzen. Mit ihren extrem beweglichen Fortsätzen sondieren Mikrogliazellen ständig die nähere Umgebung um das Mikrogliasoma. Bei akuten Hirnverletzungen kommt es zu einer Aktivierung der Mikrogliazellen. Die Fortsätze wandern, gefolgt vom Soma, in den Verletzungsherd ein, zusätzlich kommt es zu einer Änderung der Mikroglia-morphologie (Nimmerjahn et al., 2005; Davalos et al., 2005). Die Zellen gehen in den aktivierten Zustand über (Kim und de, 2005). Aktivierte Mikrogliazellen partizipieren in der Pathogenese verschiedener neurologischer Krankheiten durch die Sekretion von inflammatorischen Faktoren, wie Cytokinen oder NO (Hanisch, 2002). Diese Freisetzung führt zu einer erhöhten Rekrutierung der Mikroglia zum Verletzungsherd sowie zur Infiltration von immunmodulierenden Zellen aus dem peripheren Blut (Garden und Moller, 2006). Nach einer Abnahme des aktivierenden Stimulus partizipieren die Mikroglia bei der Reduktion der Immunantwort und induzieren ihre eigene Apoptose über die Sekretion anti-inflammatorischer Cytokine (Garden und Moller, 2006). Bei ausgeprägtem Zelltod im ZNS kommt es zur weiteren Aktivierung der Mikroglia; sie gehen in die amöboide Form über und agieren als Phagocyten des ZNS (Streit, 2002), um absterbendes Gewebe aufzunehmen.

1.1.4. NG2-Zellen und gliale Subtypen im adulten ZNS

Die Einteilung der makroglialen Zellen in Astrocyten und Oligodendrocyten zeigt ein stark vereinfachtes Bild der glialen Zellen des ZNS. Unbestritten ist die Existenz der reifen makroglialen Astro- wie auch Oligodendrocyten (siehe Abb. 3), deren Funktion und Eigenschaften in einer Vielzahl von Publikationen untersucht und teilweise geklärt wurden (Baumann und Pham-Dinh, 2001; Nave und Trapp, 2008; Giaume et al., 2007; Theodosis et al., 2008; Verkhratsky und Kirchhoff, 2007). Neuere Publikationen beschreiben einen weiteren Typ von Gliazellen, der als NG2-Glia bezeichnet wird. Die NG2-positive Glia wird divers beschrieben: Zellen mit Expression dieses Markers wurden als Synantocyten (Butt et al., 2005), NG2-Glia (Nishiyama et al., 2005; Zhu et al., 2008), Polydendrocyten (Nishiyama, 2007), Oligodendrocyten-Vorläuferzellen (Levine et al., 2001) oder auch als komplexe Astroglia/GluR-Zellen (Matthias et al.,

2003) publiziert. Zum einen werden NG2-positive Zellen als 4. Population von Gliazellen definiert, zum anderen wird NG2 als Marker von Vorläuferzellen angesehen. Wie OPCs der Entwicklung und reife Oligodendrocyten sind NG2-Glia dynamisch an neuronale Aktivität und die damit verbundene Freisetzung von Neurotransmittern gekoppelt.

Es gibt bisher keine zwingenden Beweise für funktional-differenzierte Klassen von Oligodendrocyten (Richardson et al., 2006). Unbestritten ist aber die Existenz diverser oligodendroglialer Vorläuferzellen, die sich sowohl in ihrem Entstehungsort als auch in ihrer Immunreaktivität unterscheiden. Auch für Astroglia wurden in den letzten Jahren eine Vielzahl von Subtypen während der Entwicklung, im adulten Gehirn und in pathologischen Situationen beschrieben (Matthias et al., 2003; Buffo et al., 2008).

Zur Identifizierung dieser Subtypen wurden vielfach transgene Mausmodelle mit zelltypspezifischer Expression fluoreszenter Proteine verwendet (siehe auch Abb. 2). Genauere Untersuchungen der TgN(GFAP-EGFP) (Nolte et al., 2001) zeigten das Vorkommen von mindestens zwei astroglialen Subtypen im Hippocampus der Maus, die EGFP exprimieren (Matthias et al., 2003). Ein hell-fluoreszenter Astrocyt, stark verzweigt, der Glutamat-Transporter exprimiert und als protoplasmatischer passiver Astrocyt bezeichnet wird. Dieser Zelltyp zeigt prominente einwärts-rektifizierende, spannungsunabhängige Kaliumströme. Diese Zellen werden auch als GluT-Zellen bezeichnet (Matthias et al., 2003). Zusätzlich konnte ein astroglialer Typ mit einfacher Morphologie, ohne starke Verzweigungen und mit schwacher EGFP-Expression identifiziert werden. Diese Zellen haben ein komplexeres Strommuster, sie zeigen spannungsabhängige auswärtsgerichtete Kaliumströme, eine einwärts-rektifizierende Komponente fehlt häufig. Zudem konnte gezeigt werden, dass diese komplexen Zellen ionotrope Glutamat-Rezeptoren (AMPA) exprimieren. Aufgrund ihres komplexen Ionenkanalstrommusters und ihrer AMPA-Rezeptor-Expression werden diese Zellen häufig als GluR-Zellen oder auch komplexe Zellen bezeichnet (Matthias et al., 2003). Ein Teil dieser GluR-Zellen wiederum ist positiv für NG2 oder exprimiert den exzitatorischen Aminosäure-Transporter 1 (EAAT3), der auch in Neuronen und OPCs exprimiert wird (Domercq et al., 1999). Eine ähnliche Komplexität der Astroglia konnte auch im Hirnstamm von Mäusen gezeigt werden (Grass et al., 2004). Unter Verwendung der gleichen transgenen Mauslinie war es möglich, in der respiratorischen Gruppe des Hirnstammes sogar drei Typen von Zellen zu identifizieren, die EGFP exprimieren, unterschiedliche Strommuster zeigen und ebenfalls entweder AMPA-Rezeptoren oder Glutamat-Transporter exprimieren. Alle beobachteten Zelltypen im Hirnstamm exprimieren Kainat-Rezeptoren. Nur eine der Populationen exprimiert NG2 (Grass et al., 2004).

Die Einteilung einer Zelle mit NG2-Expression differiert mit dem Alter der untersuchten Tiere (embryonal vs. postnatal), mit der untersuchten Region (Kortex vs. Hippocampus

vs. Hirnstamm vs. Rückenmark) und mit der untersuchten Spezies (Maus vs. Ratte). Es gibt eine Vielzahl von Publikationen, die zeigen, dass NG2-positive Vorläuferzellen während der Entwicklung und nach Demyelinisierungsprozessen Oligodendrocyten bilden (Polito und Reynolds, 2005). Studien unter Nutzung transgener Mausmodelle zeigen, dass es einen Subtyp von NG2-positiven Zellen gibt, der die Eigenschaften multipotenter neuraler Stammzellen widerspiegelt und neben der Entstehung von Astrocyten und Oligodendrocyten auch zu Neuronen führen kann (Aguirre und Gallo, 2004; Belachew et al., 2003). Des Weiteren sind NG2-positive Glia an der reaktiven Gliose beteiligt, indem sie auf jede Art der Verletzung des ZNS reagieren und an der Bildung der glialen Narbe beteiligt sind. Die Identifzierung der beschriebenen Subtypen der glialen Zellen basiert häufig auf der Verwendung transgener Mausmodelle. Die Untersuchung von Hirnregion und Alter in diesen Modellen führte zur Identifizierung der vorgestellten glialen Populationen. Die Aktivierung von Gliazellen nach Verletzungen ist bekannt, der Einfluss der verschiedenen Subpopulationen von Zellen aber noch nicht untersucht. Die Verbindung von transgenen Tieren mit pathologischen Maus-Modellen humaner Pathologien bietet ideale Möglichkeiten, um den Einfluss der glialen Populationen auf Progression und Heilung von z.B. ischämischen Erkrankungen zu untersuchen.

Abbildung 2 zeigt eine Interpretation der publizierten Daten. Der Grad der Überlappung zwischen den publizierten Subtypen ist dabei eine Funktion vom Alter, der Spezies und der untersuchten Hirnregion.

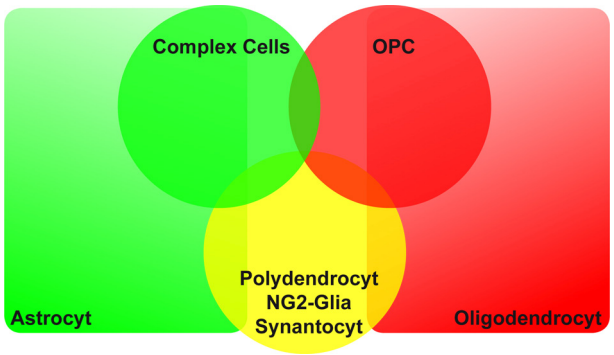


Abb. 2 Ausmaß gemeinsamer Eigenschaften von glialen Zelltypen

Neben den reifen protoplasmatischen Astrocyten (grün) und den reifen myelinisierenden Oligodendrocyten (rot) gibt es Gliazellen, deren immunhistochemische Eigenschaften die Einteilung in die verschiedenen Subtypen erschweren. Sie werden als komplexe Gliazellen (GluR-Zellen, roter Kreis), OPCs (grüner Kreis) oder NG2-Glia, aber auch als Synantocyten oder Polydendrocyten bezeichnet. Der Grad der Überlappung der publizierten Zelltypen ist eine Funktion von Alter, Region und Spezies, in der die Zellen untersucht wurden.

1.1.5. Neurale Stammzellen im adulten Hirngewebe und nach Verletzungen

Im adulten Großhirn findet eine kontinuierliche Neurogenese in zwei verschiedenen Regionen statt: in der Subventrikularzone (auch Subependymalzone) des lateralen Ventrikels (SVZ) und in der Subgranularzone des hippocampalen Gyrus Dentatus (SGZ). In beiden Regionen entstehen migrierende Neuroblasten (neuronale Vorläuferzellen), die sich zu Neuronen in den Granularschichten des Bulbus Olfactorius und des Gyrus Dentatus weiterentwickeln (Gage, 2000; Gould et al., 1999; Lois et al., 1996; van et al., 2002; Luskin, 1993; Pinto und Gotz, 2007). GFAP-exprimierende bi- oder unipolare Zellen in der SVZ und der SGZ haben wenige Fortsätze. Sie sind die wichtigsten neuralen Vorläuferzellen. Diese GFAP-positiven Vorläuferzellen exprimieren auch die Intermediärfilamente Vimentin und Nestin (Garcia et al., 2004), die in protoplasmatischen, ausdifferenzierten Astrocyten nicht nachweisbar sind.

Eine reaktive Gliose ist die Antwort einer Verletzung des ZNS zur Abschottung des verletzten Gewebes, der Wiederherstellung der Gewebe-Integrität sowie die Einschränkung der Entzündungsreaktion und des neuralen Zelltodes. Die verschiedenen glialen Zelltypen (Astroglia, Oligodendroglia, NG2-Glia und Mikroglia) sind an der reaktiven Gliose beteiligt (Buffo et al., 2008). Reife Astrocyten zeigen in gesundem Gewebe (cerebraler Kortex) keinerlei Proliferation, während reaktive GFAP-positive Zellen sich teilen können. Es konnte gezeigt werden, dass es scheinbar auch reife Astrocyten gibt, die nach einer Aktivierung durch eine Stabläsion proliferieren und direkt an der Astrogliose beteiligt sind, sie „dedifferenzieren“ (Buffo et al., 2008). Diese proliferierenden Astrocyten bleiben *in vivo* Astrocyten, während sie unter Zellkulturbedingungen multipotent sein können und auch ihre Fähigkeit zur Selbsterneuerung beibehalten. Vorläufer, die NG2- bzw. PDGFRα exprimieren, können sowohl vor als auch nach einer Läsion keine Neurone bilden (Buffo et al., 2008). Es konnte gezeigt werden, dass die proliferierenden Astrocyten nicht von GFAP-positiven Zellen der SGZ oder der SVZ stammen. Einige GFAP-positive Zellen im ZNS müssen somit Stammzelleigenschaften besitzen, die nach einer Läsion erhalten bleiben und so ein vielversprechender Zelltyp für Therapieansätze zur Regeneration von geschädigten Hirnarealen sein können (Buffo et al., 2008).

1.1.6. Verwendung von transgenen Mausmodellen zur Beantwortung biologischer Fragestellungen

Der Chemie-Nobelpreis 2008 wurde für die Entdeckung, Anwendung und Weiterentwicklung des grünen fluoreszenten Proteins aus der Qualle *Aquorea victoria* durch Osamu Shimomuto, Martin Chalfie und Roger Y. Tsien verliehen (Shimomura et al., 1962; Shimomura, 2005; Chalfie et al., 1994; Tsien, 1998). GFP war das erste natürliche Protein, das entdeckt wurde, dessen Chromophor Bestandteil der nativen

Peptidkette ist. Gentechnisch veränderte Organismen mit zelltypspezifischer Expression diverser XFP's werden sowohl *in vitro* als auch *in vivo* eingesetzt, um neurobiologische Fragestellungen zu beantworten. Der große Vorteil fluoreszenter Proteine ist ihre intrinsische Fluoreszenz, die es ermöglicht, nicht invasiv Zellen zu beobachten. Die Verwendung spezieller Lichtquellen (z.B. gepulste Infrarot-Laser) ermöglicht diese Beobachtungen sogar in lebenden narkotisierten Mäusen. Seit der ersten Publikation 1997, in denen die Astroglia eine Variante des GFPs exprimierten (GFP-S65T, Zhuo et al., 1997), wurden diverse fluoreszente Mäuse veröffentlicht, die zelltypspezifisch im ZNS wie PNS fluoreszente Proteine exprimieren (Jung et al., 2000; Feng et al., 2000; Nolte et al., 2001; Hirrlinger, Scheller et al., 2005; Lichtman et al., 2008). Mit Hilfe neuronaler Zellen, die über ein Transgen EYFP exprimieren, konnte gezeigt werden, wie motil neuronale Spines *in vivo* sind (Xu et al., 2007; Trachtenberg et al., 2002; Grutzendler et al., 2002). Aber nicht nur neuronale Zellen sind sehr aktiv, auch Astroglia sind *in situ* motil, wenn sie in Kontakt mit aktiven Synapsen stehen. Diese Motilität konnte nicht beobachtet werden, wenn sie nur Kontakt zu neuronalen Somata haben (Hirrlinger et al., 2004). Die extrem hohe Motilität von Mikrogliazellen im Kortex wurde ebenfalls *in vivo* dargestellt. Mikrogliale Ausläufer tasten ständig ihre nähere Umgebung ab und untersuchen das Gewebe nach pathologischen Vorkommnissen, um dann sofort darauf zu reagieren (Davalos et al., 2005; Nimmerjahn et al., 2005). Es gibt auch diverse Linien, in den Oligodendrocyten fluoreszent markiert sind, hierzu gehören z.B. die TgN(PLP-GFP-S65T) aus dem Jahr 2000 (Fuss et al., 2000), die TgN(CNP-EGFP) aus dem Jahr 2001 (Belachew et al., 2001) sowie die TgN(PLP-DsRed1) aus dem Jahr 2005 (Hirrlinger, Scheller et al., 2005), die im Gegensatz zu den beiden erstgenannten Mäusen kein Quallenprotein der GFP-Familie in den Oligodendrocyten exprimiert, sondern das DsRed1 aus der Seeanemone *Discosoma striata*. Es gehört zur Familie der Riffkorallenproteine und liegt im Gegensatz zum EGFP als Tetramer vor. Ein Vorteil dieses roten Proteins ist seine deutlich höhere Helligkeit (maximaler Extinktionskoeffizient von EGFP = 16.100/M cm; DsRed1 = 35.360/M cm). Damit ist DsRed1 mehr als doppelt so hell wie EGFP (Nagai et al., 2002). Ein Nachteil des Riffkorallen-Proteins ist die Bildung von Proteinaggregaten. DsRed1-Tetramere schliessen sich mit zunehmendem Alter der Mäuse sowie bei einem erhöhten Vorkommen der Proteine selbstständig zu fluoreszenten Aggregaten zusammen (Hirrlinger, Scheller et al., 2005). Dies behindert die Identifikation und Beobachtung feiner Fortsätze der Oligodendrocyten im höheren Alter. In einem sehr jungen Altersstadium (P8, siehe Abb. 1) ist es aber noch möglich, die oligodendroglialen Ausläufer zu erkennen.

Eine Übersicht über einen kleinen Teil transgener Mausmodelle mit fluoreszenter Proteinexpression ist in der Abb. 3 gezeigt.

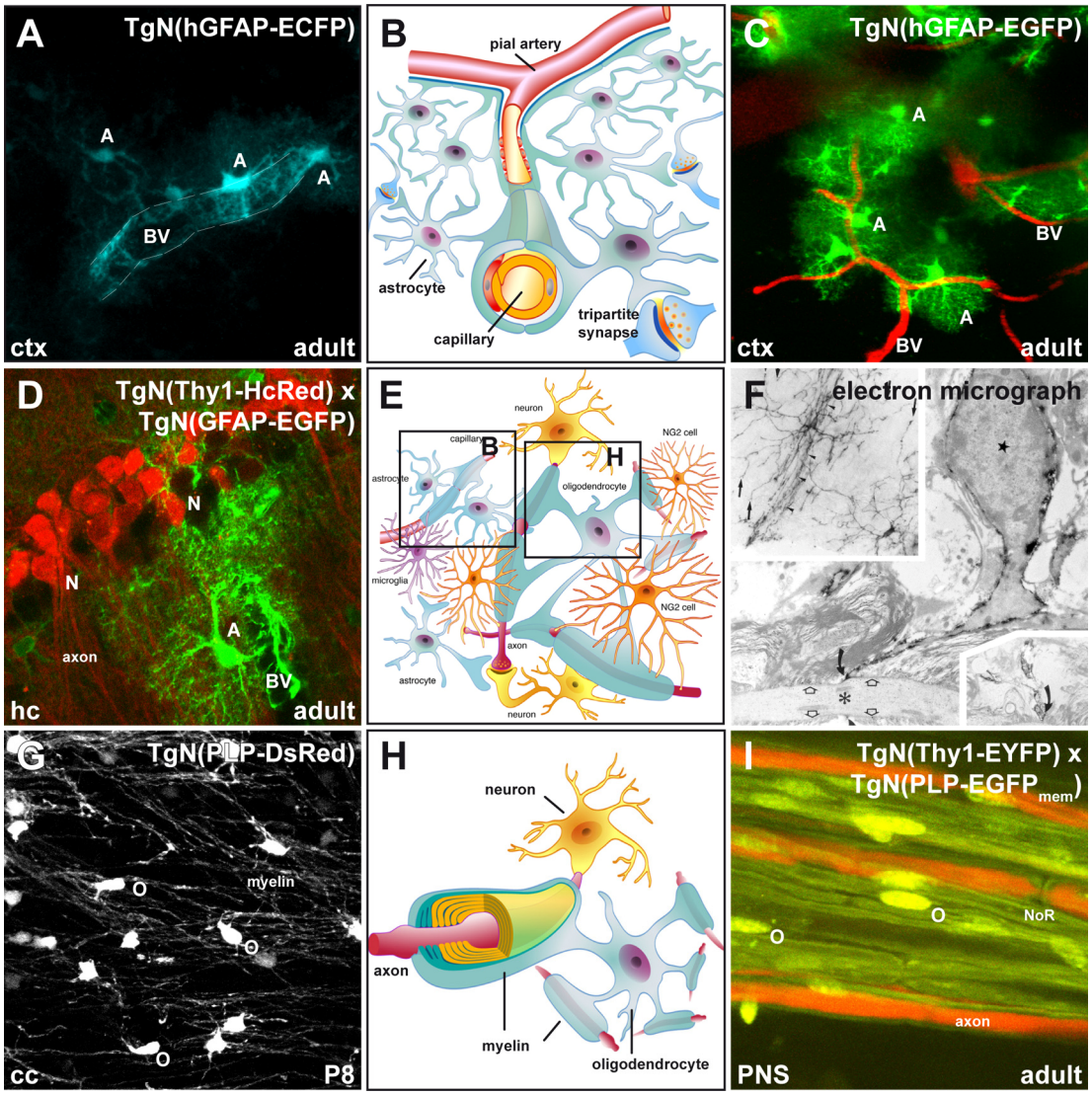


Abb. 3 Zelltypspezifische Expression fluoreszenter Proteine unter verschiedenen neuralen Promotoren

In dieser Abbildung wird ein Überblick über verschiedene transgene Mausmodelle gegeben (A, C, D, G und I). Die zelltypspezifische Expression von fluoreszenten Proteinen wird verwendet, um Gliazellen und Neurone zu visualisieren und ihre Interaktionspartner zu zeigen. In A und C ist der enge Kontakt von Astrocyten mit Blutgefäßen dargestellt. Die Blutgefäße sind in C mit Texas Red markiert. Die Aufnahme stammt aus dem Kortex einer lebenden Maus. In B ist eine Darstellung aller Zellen gezeigt, die am Aufbau der Blut-Hirn-Schranke und der neurovaskulären Einheit beteiligt sind. In D ist die enge Interaktion von Astrocyten (grün) und Neuronen (rot) visualisiert. E ist eine vereinfachte Darstellung von glialen und neuronalen Zellen des ZNS mit einem Teil ihrer Interaktionen. In F ist ein elektronenmikroskopischer Ausschnitt gewählt, der den Kontakt von NG2-Glia (Synantocyten) zu Axonen an den Myelinscheiden zeigt (nach (Butt et al., 1999)). In G ist eine transgene Maus gezeigt, in der Oligodendrocyten visualisiert sind. H zeigt eine Darstellung der Oligodendrocyt-Neuron-Interaktion am Axon. Die Bildung des Myelins ist unersetzlich für die schnelle Erregungsfortleitung in Neuronen. I: Schwannzellen und Axone in einer doppelt-transgenen Maus *in vivo*. Die Aufnahmen in C und I wurden freundlicherweise von Herrn. Dr. Fabien Nadrigny zu Verfügung gestellt.

1.1.7. Tiermodelle traumatischer Hirnerkrankungen

Traumatische Hirnverletzungen betreffen 0.3 % der Amerikaner jedes Jahr (1.5 Millionen Fälle) und sind der Hauptgrund für Invalidität, verbunden mit Arbeitsunfähigkeit (Nortje und Menon, 2004) sowie Todesfolge (56000 Todesfälle jährlich; Dutton und McCunn, 2003). Akute Hirnverletzungen betreffen alle Zellen des ZNS und haben verschiedene Auswirkungen auf das Gewebe und die Zelltypen. Primäre zelluläre Verletzungen ziehen sekundäre Reaktionen einschließlich Änderungen des cerebralen Blutflusses, lokaler und systemischer Entzündung, Änderungen in der Sauerstoffversorgung, dem Stoffwechsel sowie neuralen Zelltod nach sich (Dutton und McCunn, 2003).

Astrocyten reagieren auf akute traumatische Hirnverletzungen mit ausgeprägten Änderungen der Genexpression, zellulärer Hypertrophie und Zellproliferation. Wie stark die astrocytären Reaktionen auftreten, ist abhängig vom Grad der traumatischen Verletzung. Reaktive Astrogliosen wurden ausführlich charakterisiert, viele astrocytäre Eigenschaften in Zellkulturexperimenten definiert, trotzdem sind die umfassenden Reaktionen der Astrocyten *in vivo* auf Hirnverletzungen noch nicht vollständig geklärt. Es konnte gezeigt werden, dass reaktive Astrocyten eine essentielle protektive Rolle bei leichten bis mittleren Hirnverletzungen übernehmen (Myer et al., 2006). Reaktive Astrocyten dämmen die kortikale Degeneration von Neuronen und Entzündungsprozesse nach Verletzungen nachweisbar ein, bei schweren Verletzungen haben sie aber keinen Einfluss auf den Verlauf der Schädigung (Myer et al., 2006).

Wenn mit Hilfe eines Tiermodels akute Hirnverletzungen untersucht werden sollen, wird häufig die kortikale Stichverletzung gewählt (*cortical stab wound model*). Dieses Model ist anwendbar, wenn geklärt werden soll, welche neuralen Zellen mit welcher Reaktion auf eine akute Verletzung reagieren, indem sie z.B. proliferieren (Norton, 1999). Vorteile dieses Tiermodells sind die einfache Ausführung und die mögliche Analyse zu jedem Zeitpunkt nach der Operation. Zudem können verschieden starke Traumata miteinander verglichen werden, in dem die Verletzungen unterschiedlich groß gesetzt werden können (kortikale Verletzung vs. Verletzung im Kortex und Corpus Callosum).

Ein Schlaganfall ist die dritthäufigste Todesursache in den westlichen Industrieländern (Laterza et al., 2006) und die häufigste Ursache für Behinderungen bei Erwachsenen (Dobkin, 2005). Beim Schlaganfall kommt es zu einem kurzfristigen oder anhaltenden Mangel an Sauerstoff und Glukose im Gehirn. Hervorgerufen wird dies meist durch einen Verschluss der Blutgefäße (Thrombose). Die mittlere cerebrale Arterie dient mit ihren weiten Verzweigungen der Versorgung der lateralen Anteile jeder Hemisphäre. Damit stellt diese Arterie das wichtigste Versorgungsgefäß der Hirnrinde und des Striatums dar. Durch Verschluss einer dieser Arterien kommt es zur Schädigung durch

Hypoxie in der jeweilig versorgten ipsilateralen Hemisphäre, wobei die kontralaterale Hemisphäre ungeschädigt bleibt. Daraus resultierend kommt es zu oxidativem Stress, der zum Absterben neuraler Zellen führt. Nach einem Zusammenbruch verschiedener Ionengradienten (Lipton, 1999) wird die zerstörerische Glutamat-Exzitotoxizität initiiert (Westbrook, 1993). Daraufhin folgt eine Depolarisierung der Zellen und eine Ausschüttung exzitatorischer Aminosäuren nach extremer Aktivierung ionotroper Glutamatrezeptoren (Koistinaho und Koistinaho, 2005). Neurone und Oligodendrocyten sind am empfindlichsten nach ischämischen Schock, Astrocyten sind weniger anfällig und bilden den Hauptschutz des Gehirns vor Glutamat-Exzitotoxizität. Sie agieren als Auffangbecken für Glutamat (Danbolt, 2001).

Zur Induktion der Ischämie im Tiermodell wird der Verschluss der mittleren cerebralen Arterie (*middle cerebral artery occlusion* - MCAO) verwendet (Nagasawa und Kogure, 1989). In diesem Modell, kommt es sowohl zum nekrotischen als auch apoptotischen Zelltod. Die Nekrose dominiert in der ischämischen Kern-Region (Core), die je nach Dauer des Arterienverschlusses im Kortex oder im Striatum des Tieres liegt. Um diesen Kern herum liegen geringere Schäden, welche nicht ausreichen, eine Nekrose zu induzieren, jedoch oftmals genügen, um eine Apoptose einzuleiten (Lipton, 1999). Dieser Bereich um den ischämischen Kern wird Penumbra genannt und liegt bei dem hier verwendeten MCAO-Modell hauptsächlich im Kortex. Innerhalb der Penumbra werden durch die Ischämie neben Apoptose und Neuroinflammation auch neuro-regenerative Prozesse initiiert. Ein Vorteil dieses Modells ist die Möglichkeit, den Schweregrad der Ischämie durch die selbstgewählte Länge der Sauerstoffunter-versorgung zu steuern. Die erhöhte Permeabilität der Blut-Hirn-Schranke ist eine Kon-sequenz des ischämischen Schlaganfalls (Ilzecka, 1996). Die Öffnung der Blut-Hirn-Schranke führt zum Eintritt zahlreicher Komponenten des Blut-Kreislaufes ins Gehirn, die auch toxisch im ZNS wirken können und damit die Hirnschädigung verstärken (Lossinsky, Shivers, 2004). Astrocyten und Neurone rekrutieren Mikrogliazellen aus dem benachbarten Gewebe, die nach ihrer Aktivierung proinflammatorische Cytokine sezernieren (Man et al., 2007). Dies führt ebenfalls zu einer Verschärfung der neuronalen Verletzung und damit der synaptischen Dysfunktion.

2. ZIELSETZUNG

Analyse der Reaktionen glialer Zellpopulation nach akuten Hirnverletzungen

Akute Hirnverletzungen führen neben einer Schädigung sowie dem Tod der Nervenzellen auch zum Tod von Gliazellen wie Oligodendrocyten und Astroglia. Traumatische Hirnverletzungen sind ein Hauptgrund für körperliche Behinderungen nach Unfällen und können sogar zum Tod des Verletzten führen (Nortje und Menon, 2004). Wie die neuralen Zelltypen auf akute traumatische Verletzung reagieren, ist immer noch eine wichtige Fragestellung bei der Untersuchung pathologischer Vorkommnisse im ZNS. Astroglia, Oligodendroglia, NG2-Glia und Mikroglia sind gemeinsam an einer reaktiven Gliose beteiligt und trennen das geschädigte Gewebe vom umgebenden gesunden Gewebe durch Ausbildung der glialen Narbe ab (Bush et al., 1999; Faulkner et al., 2004).

Um zu klären, welchen Aktivierungs- und Differenzierungsprozessen Gliazellen im verletzten Hirngewebe unterliegen, wurden doppelt-transgene GFAP-EGFP/PLP-DsRed1-Mäuse verwendet. Diese Mäuse exprimieren unter dem Promotor des sauren Gliafaserproteins (GFAP) das grün-fluoreszente Protein EGFP aus der Qualle *Aequorea victoria* (Nolte et al., 2001) und unter dem Promotor des Proteolipidproteins (PLP) das rot-fluoreszente Protein DsRed1 aus der Seeanemone *Discosoma striata* (Hirrlinger, Scheller et al., 2005). Es sollen in dieser Arbeit zwei verschiedene Mausmodelle akuter Hirnverletzungen miteinander verglichen werden. Bei der kortikalen Stichverletzung kommt es im betroffenen Gewebe zu einem Zusammenbruch der Blut-Hirn-Schranke mit nachfolgenden entzündlichen Reaktionen. Dies führt zu einer Aktivierung der glialen Zellen (reaktive Gliose). Über den Nachweis entwicklungs- und zelltypspezifischer Markerproteine sollen die glialen Reaktionen in den fluoreszenten transgenen Mäusen analysiert werden. Als zweites Modell der akuten Hirnverletzung soll in den doppelt-transgenen Mäusen eine akute Ischämie (mittlere cerebrale Arterienocclusionen, MCAO) als ein Modell für den Schlaganfall induziert werden. Vorteil dieses Tiermodells ist, dass der Grad der Verletzung der Blut-Hirn-Schranke beeinflusst werden kann. Je länger das Gewebe mit Sauerstoff und Glukose unterversorgt ist, desto drastischer gestaltet sich der Zusammenbruch der Blut-Hirn-Schranke (Belayev et al., 1996). Auf diese Weise können Unterschiede in der glialen Reaktion nach einem starken ischämischen Trauma verglichen mit kurzfristigeren Sauerstoff- und Glukoseunterversorgungen untersucht werden. Zusätzlich soll analysiert werden, welches Differenzierungspotential aktivierte Gliazellen nach einer Verletzung haben.

3. MATERIAL UND METHODEN

3.1. Materialien

3.1.1. Reagenzien

Standardlaborchemikalien, die nicht gesondert aufgeführt sind, wurden von handelsüblichen Firmen wie Amersham Biosciences, Freiburg; Roche, Penzberg; Carl Roth, Karlsruhe; Serva, Heidelberg; BD Falcon, Heidelberg; Eppendorf, Hamburg; Riedel de Haën, Hannover; Merck, Darmstadt; Sigma-Aldrich, Taufkirchen; BioRad, München, Invitrogen, Karlsruhe bezogen. Zellkulturmedien und -lösungen wurden von Gibco-Invitrogen, Karlsruhe bezogen.

3.1.2. Verbrauchsmaterial

Die hier nicht aufgeführten Standardlaborverbrauchsmaterialen wie Pipettenspitzen, Objektträger, 24-Well-Zellkulturschalen usw. wurden bei den handelsüblichen Firmen wie Eppendorf, Hamburg; Greiner-Nunc, Nürtingen; Menzel-Gläser, Braunschweig; BD Falcon, Heidelberg und Gilson, Middleton, WI (USA) bestellt. Zudem wurden Einmalkanülen (BD Biosciences, Heidelberg), Einmalspritzen (Braun, Melsungen) und Borosilicatglaskapillaren (Hilgenberg GmbH, Malsfeld/Kassel) verwendet.

3.1.3. Gebrauchsfertige Reaktionssysteme

ECL Plus Western-Blot Detection Reagents	Amersham Bioscience
Invisorb-DNA Tissue HTS 96-Kit	Invitek
Invisorb-DNA Tissue Mini Kit	Invitek
QIAfilter Midi Kit	Qiagen
QIAprep 8 Miniprep Kit	Qiagen
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen

3.1.4. Lösungen, Puffer und Medien

Puffer und wässrige Lösungen wurden alle mit deionisiertem Wasser aus der Reinstwasseranlage Arium 611 von Sartorius (Sartorius AG, Göttingen) hergestellt.

3.1.4.1. Allgemeine Puffer

PBS (Phosphat-gepufferte Salzlösung)

Kaliumphosphatpuffer pH 7,4	10	mM
NaCl	150	mM

PBS-Tween (Phosphat-gepufferte Salzlösung mit Tween 20)

Kaliumphosphatpuffer pH 7,4	10	mM
NaCl	150	mM
Tween 20	0,02	% (v/v)

3.1.4.2. Puffer für die molekularbiologischen Arbeitsmethoden

DNA-Probenpuffer

Bromphenolblau	0,25	%	(w/v)
Xylencyanol	0,25	%	(w/v)
Ficoll (Typ 400)	15	%	(v/v)

in H_2O

Tris-Acetat-EDTA-Puffer (TAE, 50x, 1000 ml)

Tris-Base	2	M
Eisessig	57,1	ml
EDTA (0,5 M, pH 8)	1	mM

Ethylendiamintetraacetat

auf 1000 ml mit H_2O auffüllen

Tris-EDTA (TE-Puffer)

Tris-HCl (pH 7,4)	10	mM
EDTA (0,5 M)	1	mM

Tris-EDTA (TE-Puffer) für Mikroinjektion

Tris-HCl (pH 7,4)	5	mM
EDTA (0,5 M)	0,1	mM

Gitschier Puffer (MGB, modifiziert, 10x) (Kogan et al., 1987)

Tris pH 8,8	67	mM
Ammoniumsulfat $(NH_4)_2SO_4$	170	mM
Magnesiumchlorid	65	mM

auf 1000 ml mit H_2O auffüllen

Gitschier-Puffer für Verdau

1x MGB

Triton-X100	0,5	%
Proteinase K	5	mg/ml

mit H_2O auffüllen (pro Schwanz / 200 µl)

3.1.4.3. Lösungen für die Proteinbiochemie

Coomassie-Entfärbelösung

Essigsäure	10	%

in H_2O

Coomassie-Färbelösung

Coomassie-Brilliant Blau R250	0,2	%
Essigsäure	10	%
Methanol	30	%

in H_2O

LDS Sample Puffer (NuPAGE) (4x)

Glycerol	40	%
Tris-Base	5,6	mM
Tris-HCl	4,22	mM
Lithiumdodecylsulfat	2,94	mM

EDTA	0,016	mM	
Serva Blue G250	0,075	%	(v/v)
Phenolrot Lösung	0,025	%	(v/v)

1x Puffer; pH 8,5

Lysis-/Waschpuffer

Tris-HCl pH 7,5	50	mM
NaCl	150	mM
Nonidet P40	1	% (w/v)
Natriumdesoxycholat	0,5	% (w/v)

1 Tablette Proteaseinhibitorcocktail (Roche, Penzberg) / 20 ml frisch dazugegeben

MES-Puffer (SDS Running Buffer) (NuPAGE) (20x)

MES	1	M
(2-(N-morpholino) Ethansulfonsäure)		
Tris Base	1	M
SDS	69,3	mM
EDTA	20,5	mM

1x Puffer;pH 7,3

Transfer-Puffer (NuPAGE) (20x)

Bicine	500	mM
Bis-Tris	500	mM
EDTA	20,5	mM
Chlorobutanol	1	mM

1x Puffer; pH 7,2; (mit 10 % Methanol)

3.1.4.4. Medien für die Bakterienkultivierung

LB-Medium (Luria's Broth)

Bacto Trypton	10	g
Bacto Hefeextrakt	5	g
NaCl	10	g

auf 1000 ml mit H_2O auffüllen, pH 7,5 mit 10 M NaOH einstellen und autoklavieren; für die Selektion Antibiotika zugeben (Endkonzentration: 100 mg / ml); für LB-Agarplatten vor dem Autoklavieren 15 g Agar und nach dem Abkühlen Antibiotika (Endkonzentration: 50 mg / ml, Kanamycin bzw. Ampicillin (Merck, Darmstadt)) zugeben.

3.1.4.5. Lösungen für die Zellkultur

Das zur Kultur von eukaryontischen Zellen verwendeten Medium (DMEM 5 mM Glukose,) wurde käuflich erworben (Invitrogen). Vor Gebrauch wurden hitze-inaktiviertes (56°C, 25 min) fetales Kälberserum (FKS, Invitrogen, Endkonzentration

10 %) und gegebenenfalls 1 % Penicillin/Streptomycin-Lösung (Invitrogen) zugesetzt. Zudem wurde noch 1 % L-Glutamin hinzugefügt.

3.1.5. Enzyme

REDTaq™DNA PolymeraseSigma-Aldrich Co.
Für die Polymerase wurde der mitgelieferte 10-fach-konzentrierte Puffer verwendet.

3.1.6. Antikörper

3.1.6.1. Erstantikörper

Tabelle 1: Verwendete Erstantikörper für immunhistochemische Analysen und proteinbiochemische Verfahren

AK	Firma / zur Verfügung gestellt von:	Klon	Klonalität	Spezies	Verdünnung	Verwendung
Calbindin	Swant	-	pc	Kaninchen	1:1000	IHC
Calbindin	Sigma	-	mc	Maus	1:300	IHC
Calretinin	Chemicon	-	pc	Kaninchen	1:1000	IHC
CC1 (APC)	Calbiochem	CC1	mc	Maus	1:50	IHC
CNP	Sigma	11-5B	mc	Maus	1:150	IHC
Cre	Covance	-	pc	Kaninchen	1:1000	WB
Flag-M2	Sigma	A8592	mc	Maus	1:1000	WB
GAD67	Chemicon	-	mc	Maus	1:1000	IHC
GAPDH	Ambion	-	pc	Kaninchen	1:20000	WB
GFAP	Novocastra	-	mc	Maus	1:200	IHC
GFP	Rockland	-	pc	Ziege	1:1000	IHC
GFP	Abcam	-	pc	Kaninchen	1:1000	IHC
NeuN	Chemicon	-	mc	Maus	1:100	IHC
NG2	Prof. Dr. Jaqueline Trotter, Mainz	-	mc	Ratte	1:500	IHC
Olig2	Prof. Dr. Charles D. Stiles, Boston	DF 308	mc	Maus	1:200	IHC
Parvalbumin	Swant	-	pc	Kaninchen	1.100	IHC
PLP	Prof. Dr. K.-A. Nave	-	pc	Kaninchen	1:600	IHC
S100β	Swant	-	pc	Kaninchen	1:500	IHC
Sox10	R&D Systems	-	pc	Ziege	1:50	IHC
Tuj1	Covance	-	mc	Maus	1:250	IHC

3.1.6.2. Zweitantikörper

Tabelle 2: Verwendete Zweitantikörper für immunhistochemische Analysen und proteinbiochemische Verfahren

AK	Firma:	aus	Verdünnung
anti-Kaninchen Alexa 488-konjugiert	Molecular Probes	Esel	1:2000
anti-Kaninchen Alexa 546-konjugiert	Molecular Probes	Esel	1:2000
anti-Kaninchen Alexa 555-konjugiert	Molecular Probes	Esel	1:2000
anti-Kaninchen Cy2-konjugiert	Dianova	Esel	1:100
anti-Kaninchen Cy3-konjugiert	Dianova	Esel	1:1000
anti-Kaninchen Cy5-konjugiert	Dianova	Esel	1:500
anti-Kaninchen HRP-konjugiert	Dianova	Ziege	1:5000
anti-Maus Alexa 488-konjugiert	Molecular Probes	Esel	1:2000
anti-Maus Alexa 555-konjugiert	Molecular Probes	Esel	1:2000
anti-Maus Alexa 633-konjugiert	Molecular Probes	Esel	1:2000
anti-Maus Cy2-konjugiert	Dianova	Esel	1:100
anti-Maus Cy2-konjugiert	Dianova	Ziege	1:100
anti-Maus Cy3-konjugiert	Dianova	Ziege	1:1000
anti-Maus Cy5-konjugiert	Dianova	Ziege	1:500
anti-Maus HRP-konjugiert	Dianova	Ziege	1:10000
anti-Ratte Alexa 488-konjugiert	Molecular Probes	Esel	1:2000
anti-Ratte Alexa 633-konjugiert	Molecular Probes	Esel	1:2000
anti-Ratte Cy5-konjugiert	Dianova	Esel	1:500
anti-Ziege Alexa 633-konjugiert	Molecular Probes	Esel	1:2000
anti-Ziege Cy3-konjugiert	Dianova	Esel	1:1000

3.1.7. Nukleinsäuren und Nukleotide

3.1.7.1. Vektoren und Konstrukte

Die verwendeten Vektoren sowie Konstrukte sind in der Abb. 4 dargestellt.

3.1.7.2. Andere Nukleinsäuren und Nukleotide

Desoxyribonukleosid-Triphosphate (dNTPs)	Boehringer, Mannheim
Marker 1 kb	Fermentas, St. Leon-Rot
Marker 100 bp	Fermentas, St. Leon-Rot

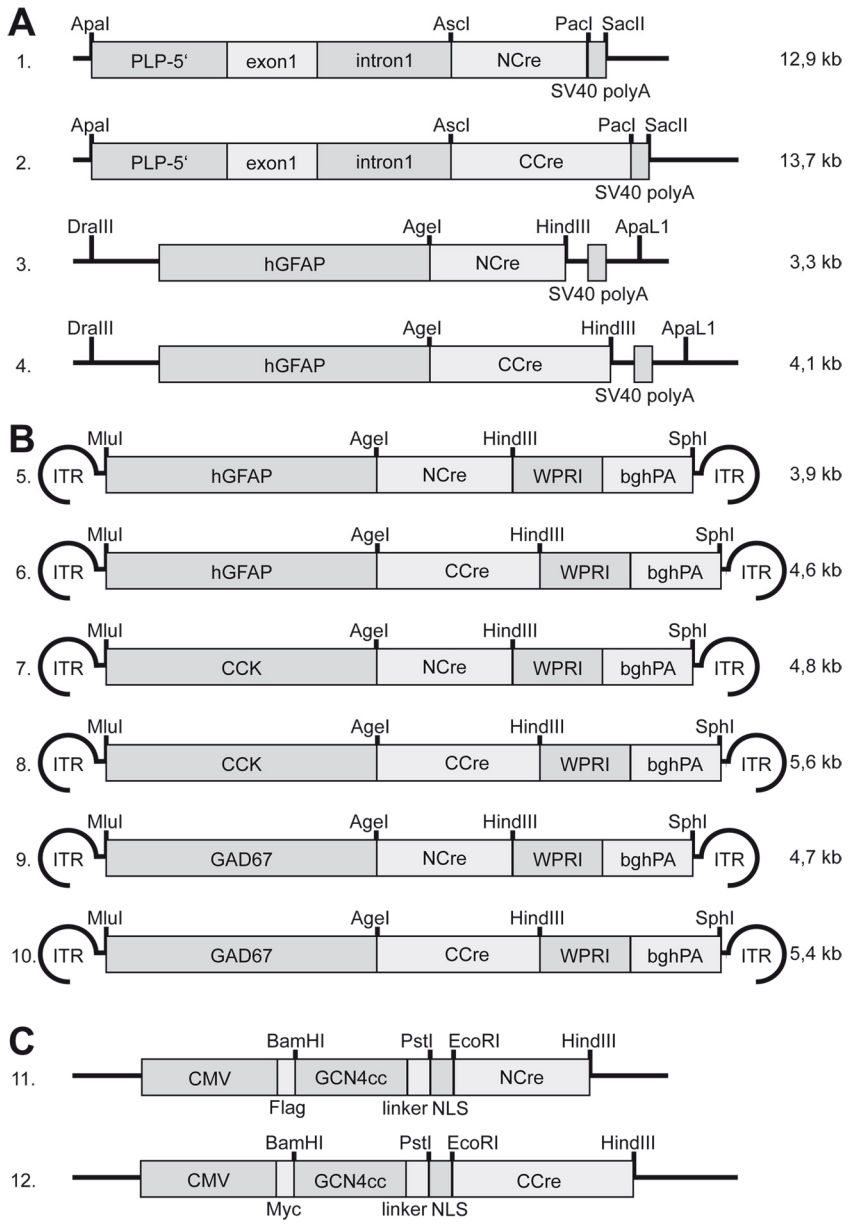


Abb. 4 Verwendete Vektoren und Konstrukte in dieser Arbeit

Die hier gezeigten Konstrukte (A) wurden zur Mikroinjektion in Mausoocyten verwendet. Die Konstrukte in B wurden zur Herstellung von rekombinanten adeno-assoziierten Viren (rAAV's) verwendet. Diese wurden zur Infektion von Zellen in Mäusen benutzt. Die beiden gezeigten Plasmide (C) wurden verwendet um nach der Transfektion von COS1-Zellen Zelllysate als Positivkontrollen für die Western Blots herzustellen.

3.1.7.3. Primer

Die verwendeten Oligonukleotide wurden mit Hilfe des Programms PrimerSelect des Programmpaketes DNAStar/Lasergene 6 ausgewählt und von Fritz Benseler (Abteilung Molekulare Neurobiologie, Max-Planck-Institut für experimentelle Medizin, Göttingen) hergestellt. Die Verdünnungen erfolgten in vollentsalztem Wasser (im Folgenden als H_2O bezeichet), die Lagerung bei -20°C. Alle Sequenzen sind in 5' → 3'-Richtung angegeben.

Tabelle 3: Verwendete Genotypisierungsprimer

Primer-Nr.	Mauslinie	Position	Richtung	Sequenz	verwendet mit:
4750	GFAP-C/NCre GFEx	GFAP-Promotor	sense	CAGGTTGGAGAGGAGACGCATCA	7983/7984
3471	PLP-C/NCre	PLP-Promotor	sense	ATGCGTACCTGACTTTCTCCTTCT	7983/7985
7983	GFAP/PLP-NCre	N-Cre	antisense	CCATCAGGTTCTTCCTGACTTCATCA	3471/4750
7984	GFAP/PLP-CCre	C-Cre	antisense	CTCCATCAGGGATCTGACTTGGTCAA	3471/4750
3735	ROSY	ROSA26	sense	AAAGTCGCTCTGAGTTGTTAT	3736/37
3736	ROSY	ROSA26 wt	antisense	GCGAAGAGTTTGTCCTCAACC	3735/37
3737	ROSY	ROSA26 KI	antisense	GGAGCGGGAGAAATGGATATG	3735/36
4749	GFEx	EXFP	antisense	CCAGCTTGTGCCCCAGGATGT	4750
4192	PLCF	Cre	antisense	CAGGGTGTTATAAGCAATCCC	4193
4193	PLCF	Cre	sense	CCTGGAAAATGCTTCTGTCCG	4192
2392	PRDx	DsRed	antisense	CGCCGACATCCCCGACTACAA	2393
2393	PRDx	DsRed	sense	GCGGCCGCTACAGGAACAGGT	2392

3.1.8. Bakterienstämme

3.1.8.1. Prokaryontische Zelllinien

E.coli XL1-blue Stratagene, La Jolla (USA)

3.1.8.2. Eukaryontische Zelllinien

COS1 Tumorzellen aus der Niere der afrikanischen grünen Meerkatze, SV40 transformiert

3.1.9. Viren

Die verwendeteten rekombinanten adeno-assoziierten Viren wurden von Prof. Dr. Rolf Sprengel, Universität Heidelberg zur Verfügung gestellt. Eine Übersicht üner die viralen Konstrukte ist in Abb. 4 dargestellt. Die Lagerung der Partikel bis zu ihrer Verwendung erfolgte bei -80°C.

3.1.10. Tiere

3.1.10.1. Wildtyp-Mäuse

Es wurden die Stämme C57Bl6/J und FVB/N für Verpaarungen sowie NMRI als Ammen nach der Mikroinjektion verwendet.

3.1.10.2. Transgene Mäuse

In den transgenen Mauslinien TgN(hGFAP-EGFP)$_{GFEA/GFEC}$ kontrolliert der humane GFAP-Promotor die Expression des fluoreszenten Proteins EGFP selektiv in Astrocyten. Das saure Gliafaserprotein gehört zu den Intermediärfilamenten und wird astrocytär exprimiert. Die Linie GFEA wurde in Nolte et al., 2001 publiziert, die Linie GFEC stammt aus einer weiteren Mikroinjektionsrunde (Hirrlinger, Scheller et al., 2005; Lalo et al., 2006).

Bei den Mauslinien TgN(mPLP-DsRed)$_{PRDA/PRDB}$ sind die Oligodendrocyten mit dem Protein DsRed1 markiert. Dies wurde ermöglicht, da der zelltypspezifische Promotor des Proteolipidproteins (PLP) die Expression des DsRed1 kontrolliert. Die PLP-DsRed1-transgene Maus wurde erzeugt, indem eine 14,5 kb große 5'-Sequenz des PLP-Gens (Exon1 und Intron1, B. Fuss) in die Multiple-Cloning-Site des DsRed1-Vektors (Clontech) inseriert wurde. Die aufgereinigte DNA wurde über Mikroinjektion in Mausoocyten injiziert. Die Stammlinie wurde mit FVB/N-Mäusen verpaart. Die heterozygoten Nachkommen zeigten eine robuste DsRed1-Expression in Oligodendrocyten (Hirrlinger, Scheller et al., 2005).

Zudem wurden doppelt-transgene fluoreszente Mäuse verwendet, die aus Verpaarungen der Linie GFEC mit PRDB stammen (Kurzform GCPB).

Die Mauslinie ROSY (TgH(ROSA26-loxP-stop-loxP-EYFP)$_{ROSY}$) ist ein Reporter, um spezifisch Zellen zu markieren, in denen die Cre-Rekombinase aktiv ist. Im ROSA26-Locus befindet sich ein Stop-gefloxtes EYFP, das über homologe Rekombination eingefügt wurde (Srinivas et al., 2001). In den Zellen, in denen die Cre-Rekombinase nicht vorhanden ist, wird das EYFP nicht exprimiert und ist somit auch nicht detektierbar. Ist die Cre-Rekombinase aber aktiv, wird das Stop-Codon über die beiden gefloxten Schnittstellen ausgeschnitten und es kommt zu einer EYFP-Expression. Der Expressionsgrad des EYFP ist postnatal unter der Kontrolle des ROSA26-Locus sehr schwach, so dass es mit Hilfe eines GFP-Antikörpers verstärkt werden muss. Da sich EYFP von EGFP auf DNA-Ebene nur um ein paar Nucleotide unterscheidet, ist auch die Proteinsequenz sehr ähnlich (vier Aminosäuren Unterschied) (Ormo et al., 1996). Daher können die DNA-Sequenzen mit den gleichen Primern vervielfältigt werden und die beiden Proteine werden häufig von den gleichen Antikörpern erkannt. Die hier verwendeten GFP-Antikörper (polyklonaler Ziegenantikörper von Rockland und

polyklonaler Kaninchenantikörper von Abcam) erkennen beide neben den GFP-Varianten auch die YFP-Proteinversionen.

Bei TgN(PLP-Cre)$_{PLCF}$-Mäusen wird die Expression der Cre-Rekombinase durch den PLP-Promotor gesteuert (Delaunay et al., 2008). Die Maus wurde von Dr. Sandra Göbbels zur Verfügung gestellt.

Es wurden für diese Arbeit neue transgenen Tiermodelle mit Cre-Komplementierung hergestellt. Dabei wurde die Expression von zwei Fragmenten der Cre-Rekombinase, (ein C-terminaler Teil (CCre) und ein N-terminaler Teil (NCre)), durch die beiden glialen Promotoren GFAP und PLP gesteuert. Die neuen Linien wurden wie folgt benannt:

Tabelle 4 Benennung der neuen transgenen Mauslinien mit Cre-Komplementierung

Promotor	Fragment	Linie	Bezeichnung
PLP	CCre	K	PLP-CCre(K)
PLP	CCre	R	PLP-CCre(R)
PLP	NCre	A	PLP-NCre(A)
PLP	NCre	C	PLP-NCre(C)
PLP	NCre	D	PLP-NCre(D)
GFAP	CCre	F	GFAP-CCre(F)
GFAP	NCre	T	GFAP-NCre(T)
GFAP	NCre	V	GFAP-NCre(V)
GFAP	NCre	W	GFAP-NCre(W)

Doppelt-transgene Linien, die die Cre-Fragmente unter dem gleichen Promotor kontrollieren werden bezeichnet als: PLP-CCre(K)/NCre(A), was einer Verpaarung der Linien PLP-CCre(K) x PLP-NCre(A) entspricht. Doppelt-transgene Linien, die die Cre-Fragmente unter der Kontrolle unterschiedlicher Promotoren exprimieren, werden als GFAP-NCre(T)/PLP-CCre(K), was einer Verpaarung der Linien GFAP-NCre(T) x PLP-CCre(K) entspricht, bezeichnet.

3.1.11. Hard- und Software

Datenbankrecherchen (Sequenzsuche und -vergleiche, Literatursuche) wurden mit Hilfe des Internetservice des "National Center for Biotechnology Information" (Internetadresse: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/) und Sequenzanalysen mit dem Programm SeqMan (DNA Star) durchgeführt, Grafiken wurden mit den Programmen Adobe InDesign CS3, SimVector 3.0, ImageJ und Adobe Photoshop CS3 erstellt. Statistische Daten wurden mit dem Programm Excel 3.0 verarbeitet. Die konfokalen Bilder wurden mit der LSM-Image-Software (LSM = *Laser Scanning Microscopy*; Software: LSM Image Browser) exportiert und mit Adobe InDesign CS3, ImageJ und Adobe Photoshop CS3 bearbeitet. Epifluoreszenzbilder wurden mit der Software Kappa-Image-Base-Control 2.7.2 (Kappa, Optoelectronics GmbH, Göttingen/Gleichen)

erstellt, exportiert und mit den Programmen Adobe InDesign CS3, ImageJ und Adobe Photoshop CS3 bearbeitet.

In dieser Arbeit wurden Handelsnamen bzw. Warenzeichen nicht gesondert gekennzeichnet.

3.2. Methoden

3.2.1. Sterilisation

Die Sterilisation von Lösungen erfolgte im Dampfdruckautoklaven für 30 min bei 120°C und 10^5 Pascal. Hitzeempfindliche Lösungen wurden sterilfiltriert (Porengrösse: 0,2 µm).

3.2.2. Herstellung transformationskompetenter Zellen

Die Bakterien (E.coli XL1-Blue) wurden in 250 ml TB-Medium (+30 µg/ml Tetrazyklin) bei 18°C bis zu einer optischen Dichte bei 600 nm (OD600) von 0,6 inkubiert (24-40 h) (Inoue et al., 1990). Nach Inkubation auf Eis für 10 min wurde die Bakteriensuspension bei 4°C für 10 min mit 2500 /min im Sorvall GS3-Rotor zentrifugiert. Das in 80 ml kaltem TB Jap-Medium resuspendierte Sediment wurde nach Inkubation für 10 min auf Eis bei 4°C für 10 min mit 2500 /min (Sorvall GS3-Rotor) zentrifugiert und in 18,6 ml kaltem TB Jap-Medium und 1,4 ml DMSO aufgenommen. Nach Inkubation auf Eis für 10 min wurden Aliquots in Stickstoff eingefroren und bei -70°C gelagert.

3.2.3. Transformation von Bakterien

Es wurden 200 µl transformationskompetente E.coli XL1 Blue-Bakterien bei 4°C aufgetaut und auf Eis für 10 min mit 3,4 µl einer 10 %igen (v/v) Verdünnung β-Mercaptoethanol inkubiert. Nach Zugabe von 5-10 µl des Ligationsansatzes und Inkubation auf Eis für 30 min (erschütterungsfrei) erfolgte ein Hitzeschock bei 42°C für 30-40 s. Nach Abkühlen auf Eis für 2 min und Zugabe von 800 µl vorgewärmtem LB-Medium (37°C) folgte eine Schüttelinkubation von 45 min bei 37°C, während der die Bakterien das Antibiotikum-Resistenzgen exprimieren. Anschließend wurde 0,1-1 ml des Ansatzes auf Antibiotika-haltige LB-Platten ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert.

Bei einer Retransformation kann auf das β-Mercaptoethanol verzichtet werden. Es genügt 1 µl des Plasmids.

3.2.4. Transformation von COS1-Zellen

Bei der Transfektion von eukaryontischen Zellen wurde nach dem Invitrogen-Protokoll gearbeitet (Invitrogen, Karlsruhe).

Die für die Transfektion vorgesehenen Zellen wurden in großen Kulturschalen (12 cm) mit 25 ml Medium bei 37°C und 5 % CO_2 kultiviert. Sobald die Zellen konfluent waren, wurden sie mit Trypsin/EDTA geerntet, die Zelldichte mittels einer Neubauer-Zählkammer ermittelt und die entsprechende Anzahl Zellen auf 6 cm Schalen bzw. 12-, 24- oder 96-*well* Platten ausgesät. Zum Zeitpunkt der Transfektion lag die Konfluenz zwischen 40 und 80 %. Für die Bildung der DNA-Lipofectamine-Komplexe wurde je nach Zellkulturschale eine Gesamtmenge zwischen 0,2-24 µg zu transfizierender Plasmid-DNA mit Opti-MEM I und 0,5-60 µl Lipofectamine 2000 mit Opti-MEM I versetzt (siehe Invitrogen-Protokoll). Die beiden Mischungen wurden nach 5 min Inkubation bei RT zusammenpipettiert, stark gemischt und weitere 20 min bei RT inkubiert. Hierbei formen sich die DNA-Lipofectamine-Komplexe. Diese Komplexe sind für 6 h bei RT stabil. Dann wurde die Transfektionsmischung auf die Zellen gegeben, die zuvor frisches Medium bekamen. Die Platten wurden dann 24 h – 48 h bei 37°C im Inkubator (unter 5 % CO_2-Begasung) kultiviert.

3.2.5. Präparation und Analyse von DNA

3.2.5.1. Plasmidpräparationen aus Bakterien

Plasmidpräparationen basierten auf einem modifizierten Protokoll von (Birnboim und Doly, 1979). Die Aufreinigung kleiner Mengen Plasmid-DNA (5-10 µg) beruht auf der Bindung von DNA an ein Silikatgel unter Hochsalzbedingungen (Vogelstein und Gillespie, 1979). Für Präparationen wurden Bakterienkolonien von LB-Platten mit sterilen Zahnstochern in 4 ml LB-Medium (+100 µg / ml Ampicillin/Kanamycin) überführt und über Nacht unter Schütteln bei 37°C inkubiert. Präparationen mittlerer Plasmid-Mengen erfolgten nach Animpfen von 250 ml Über-Nacht-Kulturen in LB-Medium. Die Aufreinigung wurde mit QIAprep-Kits (Qiagen) nach Angaben des Herstellers durchgeführt (Qiagen Plasmid Handbuch).

3.2.5.2. Präparation genomischer DNA aus Mausschwanzgewebe

Genomische DNA (bis 50 µg) wurde aus Schwanzbiopsiematerial (ca. 0,5 cm) mit dem Invisorb-Kit (Invitek) nach Angaben des Herstellers gewonnen (Invitek DNA Präparationshandbuch) und bei 4°C gelagert. Für die Genotypisierung über die PCR-Analyse wurde 1 µl eingesetzt.

3.2.5.3. Schnell-Präparation genomischer DNA aus Mausschwanzgewebe

Genomische DNA (bis 50 µg) aus Schwanzbiopsiematerial (ca. 0,5 cm) wurde ü.N in einem einfachen Gitschier-Puffer (Kogan et al., 1987) mit 0,5 % Triton X-100 und 5 mg/ml Proteinase K bei 54°C verdaut. Im Anschluss erfolgte eine Zentrifugation für 10 min bei 5000 Umdrehungen. Die Hitzeinaktivierung der Proteinase erfolgte für 20 min bei 98°C im Wasserbad. Die verdauten Schwanzproben wurden auf RT abgekühlt und für mindestens eine Stunde oder über Nacht eingefroren. Nach dem Auftauen wurden die Proben für 10 min bei 5000 Umdrehungen zentrifugiert, damit sich die nicht-verdauten Reste und die Haare absetzen. Mit dem Überstand wurde eine 1:50 Verdünnung gemacht, von der dann 1-2 µl pro PCR-Ansatz verwendet wurden.

3.2.5.4. Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die DNA-Konzentration einer Lösung wurde mit Hilfe eines Spektralphotometers bestimmt. Dazu wurde nach Verdünnung der Lösung (1:50 bis 1:100) die Absorption bei 260 nm in einer Quarzküvette gemessen. Für dsDNA entspricht eine OD_{260}=1 einer Konzentration von 50 µg/ml. Durch Messung der Absorption bei 280 nm wurde der Verunreinigungsgrad der Lösung bestimmt, wobei ein Wert von 1,5-2,0 für das Verhältnis $OD_{260:280}$ eine wenig verunreinigte Lösung anzeigt.

3.2.5.5. Agarose-Gelelektrophorese von DNA

Zur Auftrennung von DNA-Fragmenten zwischen 0,5 und 5 kb Größe wurden 1,5 % Agarosegele verwendet. Die Agarose wurde in 1xTAE-Puffer aufgekocht, um sie zu lösen und nach Zusatz von Ethidiumbromid (Endkonzentration: 1 µg/ml) in einen Gelschlitten gegossen. Die Probentaschen wurden durch den Einsatz verschiedener Gelkämme in den Gelschlitten erhalten. Der Schlitten wurde in eine Flachgelkammer gelegt und mit Laufpuffer (1xTAE) bedeckt. Vor dem Auftrag wurden die DNA-Proben mit Probenpuffer (6x) versetzt. Die angelegte Spannung betrug, abhängig von der Größe der Gelkammer und der Agarosekonzentration, 80-180 V (5-10 V/cm) (Netzgerät: Pharmacia). Durch die Interkalation von Ethidiumbromid in die DNA konnte diese nach der Elektrophorese auf einem UV-Illuminator (Intas UV-Systeme) sichtbar gemacht und fotografiert werden. Gelkammer, Kämme und Schlitten wurden von der institutseigenen Werkstatt hergestellt.

3.2.6. Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) wurde nach Mullis durchgeführt (Mullis und Faloona, 1987). Das Prinzip dieser Reaktion beruht auf der Verwendung zweier spezifischer Oligonukleotide (sense- bzw. antisense-Primer), die an komplementäre Bereiche denaturierter DNA binden können (annealing) und einer hitzestabilen DNA-Polymerase aus dem Bakterium Thermus aquaticus (Taq-Polymerase, Temperatur-

optimum 72°C). Da im Idealfall in jedem Zyklus die molare Menge der Matritzen-DNA verdoppelt wird, kommt es zum exponentiellen Wachstum der Zahl der DNA-Moleküle. Standardreaktionen fanden in einem Volumen von 20 µl statt. Die Reaktionen wurden in einem DNA Engine TETRAD 2 Peltier Thermal Cycler (MJ Research) durchgeführt.

3.2.7. DNA-Sequenzierung

Die DNA-Sequenzanalyse wurde von Fritz Benseler (Abteilung Molekulare Neurobiologie des Max-Planck-Institutes für experimentelle Medizin, Göttingen) durchgeführt. Das Verfahren beruht auf einer linearen PCR unter Einsatz fluorochromer Substrate.

3.2.8. Manipulation und Zucht von Mäusen

3.2.8.1. Mikroinjektion von DNA in befruchtete Oozyten

Zur Injektion wurde das klonierte DNA-Konstrukt linearisiert, durch restriktionsenzymatischen Verdau von Vektorsequenzen befreit, aufgereinigt und in 5 mM Tris (pH 7,4), 0,1 mM EDTA auf eine Konzentration von 30 ng DNA/µl eingestellt. Die Mikroinjektionen wurden von Simone Schmidt und Stefanie Thiel (MPI für experimentelle Medizin, Tierhaus) durchgeführt. Dabei wurde ein Pronukleusinjektionsverfahren nach Standardprotokollen verwendet (Gordon, 1983).

3.2.8.2. Schwanzbiopsien

Schwanzbiopsien wurden üblicherweise im Alter zwischen 3 und 4 Wochen während des Absetzens von der Mutter durchgeführt. Daraus gewonnene genomische DNA wurde zur routinemäßigen Genotypisierung transgener Mäuse mittels PCR verwendet. Es wurde ein etwa 0,5 cm langes Schwanzstück mit einer Schere entfernt. Die Schwanzbiopsie wurde bis zum Verdau bei -20°C gelagert.

3.2.8.3. Mausverwaltung

Die Verwaltung der Mäuse erfolgt mit der Datenbank PyRAT (*Python based Relational Animal Tracking*) der Firma Scionics Computer Innovation GmbH (Dresden, Deutschland). In dieser Datenbank werden alle relevanten Daten der verwendeten Mäuse gespeichert. Hierzu gehören z.B. Mausnummer (= Ohrmarkierung), Geburtsdatum, Geschlecht, Stammbaum, Genotypen und Zuchtverhalten.

3.2.9. Histologische und immunchemische Methoden

3.2.9.1. Ganzkörperfixierung von Mäusen durch Perfusion

Die Maus wird mit Diethylether betäubt. Im Anschluss erfolgt eine Hautinzision über dem Brustbein. Dann wird in den Bauchraum eingedrungen und die Bauchmuskulatur

und das Bauchfell werden von medial nach lateral durchtrennt. Als nächstes erfolgt eine Inzision des Zwerchfells unterhalb des Rippenbogens, dabei kommt es zum Lungenkollaps. Die Rippen werden angehoben und der Herzbeutel vorsichtig vom Brustkorb abgelöst. Die Rippen werden bis zum Schlüsselbein abgelöst und der Brustkorb wird aufgeklappt. Als nächstes wird eine Venenkanüle (Butterfly) in den linken Ventrikel geschoben und mit Hank's Balanced Salt solution (HBSS) perfundiert. Gleichzeitig muss eine Inzision der rechten oberen Hohlvene erfolgen, damit das Blut abfließen kann. Eine Entfärbung der Leber zeigt den Erfolg des Blut-gegen-Puffer-Austausches. Das HBSS wird gegen 4 % PFA in PB ausgetauscht und weiter perfundiert. Nach ca. 10 min kann die Perfusion abgebrochen werden und das Gehirn herauspräpariert werden. Dieses wird über Nacht in 4 % PFA in PB gelagert. Am nächsten Tag wird das PFA gegen PBS mit Azid (0,01 % (w/v)) ausgetauscht und das fixierte Gehirn kann für die Experimente weiterbehandelt werden.

3.2.9.2. Herstellung von Vibratomschnitten

Fixierte Gehirne wurden in eiskaltem PBS (pH 7,4) an einem Leica VT1000S Vibratom (Leica, Nussloch) geschnitten. Die Schichtdicke der Schnitte variierte je nach Alter der perfundierten Maus zwischen 30 und 60 µm. Die einzelnen Schnitte wurden entweder in PBS mit Azid (0,01 % (w/v)) bei 4°C aufbewahrt oder mit Immu-Mount (Shandon, Pittsburgh, USA) eingedeckt und ebenfalls bei 4°C gelagert.

3.2.9.3. Immunhistochemische Analyse mit fluoreszent-gekoppelten Zweitantikörpern

Für die Färbungen wurden Vibratomschnitte (30-60 µm) verwendet. Es wurden verschiedene Protokolle für die unterschiedlichen Antikörper eingesetzt.

Standardprotokoll:

30 min Raumtemperatur (RT): permeabilisieren der Schnitte in 0,4 % Triton in PBS; 30 min RT: blockieren der Schnitte in 4 % Pferdeserum (PS), 0,2 % Triton in PBS; über Nacht bei 4°C: 1. Antikörper in 1 % PS, 0,05 % Triton in PBS; 2x 10 min waschen in PBS; 2 h bei RT: 2. Antikörper in 1,5 % PS in PBS; 5 min DAPI (Endkonzentration: 5 µg / ml) in PBS, 2x 10 min waschen in PBS; aufziehen in H_2O und eindecken in Immu-Mount (Shandon, Pittsburgh, USA), Auswertung am Mikroskop.

Variation des Standardprotokolls:

Permeabiliserung und Blockierung in 10 % PS, 0,3 % Triton in PBS für 1 h bei RT; 1. Antikörper in der gleichen Lösung bei 4° über Nacht, 2. Antikörper in 2 % PS in PBS, 2 h RT; 5 min DAPI (Endkonzentration: 5 µg / ml) in PBS; Waschschritte je 2x 10 min in PBS zwischen den Antikörperinkubationen und nach DAPI (aufziehen und eindecken siehe Standard-Protokoll)

3.2.9.4. Immunhistochemische Analyse der GFAP-Expression

Protokoll:

30 min Raumtemperatur (RT), permeabilisieren der Schnitte in 0,4 % Triton in PBS; 30 min RT, blockieren der Schnitte in 4 % Pferdeserum (PS), 0,2 % Triton in PBS; über Nacht bei 4°C: 1. Antikörper in 1 % PS, 0,05 % Triton in PBS; 2x 10 min waschen in PBS; 10 min bei RT: Brücken-Antikörper DAKO LSAB2; 2x 5 min waschen in PBS; auftragen des Horsereadish-Peroxidase-Streptavidin-Komplexes: DAKO LSAB2; Inkubationszeit 10 min bei RT; Spülen der Schnitte in PBS, 2x 5 min; enzymatische Reaktion: DAB von DAKO (1 ml DAKO Substrat Puffer + ein Tropfen DAB): Inkubationszeit zwischen 5 s und 1 min; waschen der Schnitte in PBS (2x 5 min); aufziehen in H_2O und eindecken in Immu-Mount (Shandon, Pittsburgh, USA), Auswertung am Mikroskop.

3.2.9.5. Immunhistochemische Analyse der EYFP-Expression

Protokoll:

30 min Raumtemperatur (RT), permeabilisieren der Schnitte in 0,4 % Triton in PBS; 30 min RT, blockieren der Schnitte in 4 % PS, 0,2 % Triton in PBS; über Nacht bei 4°C: 1. Antikörper in 1 % PS, 0,05 % Triton in PBS; 2x 10 min waschen in PBS; Sekundärantikörper in 0,5 % BSA in PBS (biotinylierter anti-Ziegen-Antikörper; IgG), 30 min RT; 2x 5 min waschen in PBS; auftragen des Vector Elite ABC Kits (2,5 ml PBS + ein Tropfen A, mischen, + ein Tropfen B, mischen, 30 min vor Gebrauch ansetzen); Inkubationszeit 30 min bei RT; Spülen der Schnitte in PBS, 2x 5 min; enzymatische Reaktion: DAB von DAKO (1 ml DAKO Substratpuffer + ein Tropfen DAB): Inkubationszeit zwischen 5 s und 1 min; waschen der Schnitte in PBS (2x 5min); aufziehen in H_2O und eindecken in Immu-Mount (Shandon, Pittsburgh, USA), Auswertung am Mikroskop.

3.2.10. Proteinbiochemische Analysen

3.2.10.1. Proteinextraktion aus dem Cytosol eukaryontischer Zellen

Diese Proben wurden aufbereitet, um in der proteinbiochemischen Gelelektrophorese (Western Blot) als Positiv-Kontrollen eingesetzt zu werden.

Eukaryontische Zelllinien wurden mit Fusionsproteinen elektroporiert und 3-5 x 10^6 Zellen pro 6 cm-Petrischale ausplattiert. Nach ca. 36 h wurde das Medium abgesaugt und 1x mit PBS gewaschen. Danach wurden die Zellen mit 400 µl Lyse-Puffer für 5 min auf Eis inkubiert (Aufschluss der Zellmembran). Anschließend wurden die Zellen mit einem Zellschaber von der Petrischale gelöst und in ein Eppendorfgefäß überführt. Das Lysat wurde bei 4°C und 2000 min^{-1} in einer Tischzentrifuge für 10 min zentrifugiert. Dadurch wurden die Zellkerne und größere Membranstücke von der cytoplasmatischen

Fraktion getrennt. Der Überstand wurde in ein neues Eppendorfgefäß überführt, in flüssigen Stickstoff schockgefroren und anschließend bei -80°C gelagert oder direkt weiter verarbeitet.

3.2.10.2. Gehirnpräparation

Die Mäuse wurden mit Ether betäubt, das Gehirn zügig auf Eis entnommen und in eiskalter PBS-Lösung gewaschen und in 4 Teile (2x Grosshirn und 2x Kleinhirn) geschnitten. Diese wurden einzeln in Eppendorf-Gefäßen in flüssigem Stickstoff tief gefroren und bis zur Präparation bei -80°C gelagert. Proteinextrakte wurden sowohl aus dem Gehirn von transgenen wie auch Wildtyp-(WT)-Mäusen hergestellt.

Präparation der Hirnlysate:

Die präparierten Gehirnteile wurden auf Eis aufgetaut und mit Hilfe eines Ultraturrax in 10 mM Tris/HCl, pH 8 mit einer Proteaseinhibitormischung (Complete tablets, Roche Diagnostis, Penzberg), homogenisiert. Die erhaltenen Extrakte wurden dreimal für jeweils 10 s sonifiziert, um genomische DNA zu scheren. Alle Präparationsschritte erfolgten auf Eis. Das erhaltene Proteinhomogenat wurde aliquotiert und bei -20°C gelagert. Von einem Aliquot wurde der Proteingehalt der Probe bestimmt.

3.2.10.3. Bestimmung des Proteingehaltes

Der Proteingehalt der Gehirnhomogenate wurde nach der Methode von Lowry (LOWRY et al., 1951) bestimmt. Dazu wurden 1-5 µl Proteinhomogenat mit 50 µl 500 mM NaOH und der entsprechenden Menge H_2O in 200 µl verdünnt und zu 1 ml alkalischem Kupferreagenz (frisch hergestellt aus: 100 ml 2 % Na_2CO_3 in 0,1 M NaOH; 1 ml 2 % Na/K-Tartrat in H_2O; 1 ml 1 % $CuSO_4$ in H_2O) gegeben. Nach einer Inkubationszeit von 15 min wurden 100 µl Folin-Ciocalteus Phenolreagenz (Merck, 1:2 vorverdünnt in H_2O) zugegeben und sofort kräftig gemischt. Nach einer Inkubationszeit von mind. 45 min bei Raumtemperatur wurde die OD_{595} in einem Mikrotiter-plattenlesegerät (Dynex Technologies., Chantilly, Virginia, USA) gemessen und die Konzentration des Proteingehaltes mit Hilfe einer Eichgerade (BSA als Standard) bestimmt.

3.2.10.4. Probenvorbereitung

Die Probenvorbereitung erfolgte entsprechend dem Western Blot-System nach Laemmli, allerdings wurde LDS-Probenpuffer (10 % (w/v) Glycerol; 1,4 mM Tris-Base; 1 mM Tris-HCl; 0,735 mM Lithiumdodecylsulfat; 4 µM EDTA; 18,75 ‰ (w/v) Serva Blue G250 Lösung; 6 ‰ (w/v) Phenolrot Lösung, pH 8,5), dem jeweils 1 µl β-Mercapto-ethanol zugesetzt wurde, verwendet und die Proben für 10 min bei 70°C inkubiert.

3.2.10.5. Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Proteine können nach ihrer molaren Masse mit der Methode der SDS-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) aufgetrennt werden.

Als Gelsystem wurde das NuPage Bis-Tris-System (Invitrogen, Karlsruhe) genutzt. Es wurden 4-12 %ige Gradientengele mit 10, 12 oder 15 Taschen eingesetzt. Das Gel wurde mit einer Spannung von 200 V für 2 h im MES-Laufpuffer gefahren (110 mA). Als Protein-Größenmarker wurde der SeeBluePlus2 prestained Standard Marker (Invitrogen) verwendet. Anschließend wurden die Gele für eine Western-Blot-Analyse weiterverarbeitet und anschliessend mit Coomassie gefärbt.

3.2.10.6. Coomassiefärbung von Polyacrylamid-Gelen

Um Proteine in einem Gel zu visualisieren, wurde eine Coomassiefärbung durchgeführt. Eine Coomassiefärbung von LDS-Polyacrylamidgelen erfolgte 30 min in Coomassiefärbelösung unter Schütteln. Anschließend wurden die Gele durch mehrmaliges Waschen in Entfärbelösung (2-7 h, 10 %ige Essigsäure) wieder entfärbt, bis der Hintergrund klar erschien.

3.2.10.7. Western-Blot-Analyse mit Hilfe des ECL-Systems

Western-Blot-Analysen wurden im „Feucht-Verfahren“ in einer Blot-Kammer (Invitrogen) durchgeführt. Nach der Gelelektrophorese (siehe 4.2.10.5) wurde auf das Gel eine in Transfer-Puffer equilibrierte Nitrozellulosemembran gelegt und glatt gestrichen. Als Unterlage zur Kathode hin dienten 1x Whatman-Papier und 2x Western-Blot-Analyse-Schwämme (Invitrogen), welche alle mit Transfer-Puffer durchtränkt wurden. Zur Anode lagen 1x Whatman-Papier und 2x oder 3x Western-Blot-Analyse-Schwämme. Der Transfer wurde bei 30 V und 170 mA für 1 h durchgeführt. Durch eine nachträgliche Coomassie-Färbung des Gels konnte die Blot-Effizienz bestimmt werden. Nach der Western-Blot-Analyse wurde die Membran 2 h bei RT mit Blockierungspuffer behandelt und über Nacht bei 4°C mit den primären Antikörpern, die alle in Blockierungspuffer verdünnt wurden (1:1000 bis 1:5000), inkubiert. Nach 4x waschen mit PBS-T (2x 15 min und 2x 5 min) wurde die Membran mit einem HRP-gekoppelten Sekundär-Antikörper (Verdünnung i.d.R. 1:5000 in Blockierungspuffer) für 1 h bei RT inkubiert. Es folgten die gleichen Waschschritte wie nach der Inkubation mit den Primär-Antikörpern. Für die Detektion wurde das ECL-System von Amersham-Pharmacia verwendet. Die Entwicklung fand gemäß den Angaben des Herstellers statt.

3.2.11. Mikroskopie

3.2.11.1. Epifluoreszenzmikroskope und Objektive

Es wurden für die Detektion der EYFP/GFAP-Färbungen (DAB- bzw. fluoreszent-gekoppelt) ein aufrechtes Mikroskop (Axiophot) der Firma Zeiss verwendet. Es wurde mit folgenden Plan-Neofluarobjektiven gearbeitet: 1,25x/0,035NA; 5x/0,15NA; 10x/0,3NA; 20x/0,5NA und 40x/0,75NA. Als Fluoreszenzlampe wurde eine XBO 75W HBO 100 W verwendet. Die verwendete Kamera war eine Kappa Dx20 H-FW (Kappa, optoelecronics GmbH, Göttingen / Klein Lengden-Gleichen).

3.2.11.2. Konfokale Mikroskopie

Bei der konfokalen Laser-Scanning Mikroskopie (*Confocal Laser Scanning Microscopy* = CLSM) werden Laser im sichtbaren Bereich (400-700 nm) Bereich verwendet. Über CLSM können Objekte untersucht werden, die mehrere µm dick sein können. Streulicht, das außerhalb der Fokusebene liegt, wird über Lochblenden (*pinholes*) eliminiert. Die Datenaufzeichnung erfolgt horizontal (xy), vertikal (xz) und in zeitlicher (xt) Richtung.

Es wurde für die CLSM ein inverses Axiovert 200 M der Firma Zeiss mit Meta-Detektor-System verwendet (LSM 510 Meta, Zeiss, Jena, Deuschland). Genutzte Objektive waren das Plan-Neofluar 10x/0,3NA, Plan-Neofluar 20x/0,5NA, das Plan-Neofluar 40x/1,3NA sowie das Plan-Neofluar 63x/1,25NA Als Anregungsquellen wurden Argon/Krypton (458 nm, 488 nm, 514 nm)-, und Helium/Neon (543 nm und 633 nm)-Laser verwendet.

3.2.12. Tierversuchsdurchführungen

Alle Mäuse wurden in der Tierhaltung des Max-Planck-Institutes für experimentelle Medizin entsprechend den europäischen und deutschen Richtlinien für Versuchstiere gehalten und gezüchtet. Tierversuche sowie die Herstellung genetisch-modifizierter Organismen erfolgten nach Genehmigung durch die zuständige Landesbehörde.

3.2.13. Kortikale Stichläsionen

Die Mäuse wurden mit Avertin (275 mg/kg Körpergewicht ±10 %) betäubt. Nachdem geprüft wurde, dass die Narkose vollständig war, wurde das Fell über dem Kopf medial-sagittal eingeschnitten. Die Schädeldecke wurde mit einem Bohrer (High Speed Micro Drill mit Micro Drill Stahl Bohrer (2.3 mm Schaftdurchmesser), Fine Science Tools GmbH, Hiedelberg, Deutschland) über der rechten Hemisphäre verdünnt und anschließend mit einem Skalpell eine 1,5 mm tiefe Schnittverletzung im Kortex über dem Hippocampus gesetzt. Anschließend wurde das Fell mit 2-3 Stichen vernäht und

die Mäuse bekamen ein Schmerzmittel (Buprenorphinhydroclorid 0,05 mg/kg Körpergewicht). Dieses Schmerzmittel wurde alle 24 h für drei Tage gegeben.

Die Mäuse wurden zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Operation analysiert und dafür perfundiert.

3.2.14. Vireninjektionen

Die Mäuse wurden mit Avertin (275 mg/kg Körpergewicht) betäubt. Nachdem geprüft wurde, dass die Narkose vollständig war, wurde das Fell über dem Kopf medial-sagittal eingeschnitten. Anschließend wurden die Mäuse in einen Stereotakt eingespannt, um die Injektion punktgenau durchführen zu können. Mit Hilfe eines kleinen Bohrers (Speed Micro Drill mit Micro Drill Stahl Bohrer (0.7 mm Schaftdurchmesser), Fine Science Tools GmbH, Heidelberg, Deutschland) wurde ein Loch in die Schädeldecke (über dem Hippocampus) gebohrt. Es wurden je 0,5 µl der verschiedenen Viren-Cre-Konstrukte in eine Glaspipette (Borosilicatglas, Hilgenberg, Malsfeld) gezogen und diese 250, 500 und 1000 µm tief in den Kortex der Maus geführt. Auf allen drei Höhen wurde vorsichtig 0,3 µl des Virus (Titer: 10^{12} genom-enthaltende Partikel / ml) per Luftdruck in den Kortex überführt. Bei der letzten Tiefe (1000 µm) wurde die Pipette für 5 min ruhig gehalten. Nachdem die Pipette enfernt wurde, wurde das Fell über der Schädeldecke mit 2-3 Stichen vernäht. Die Mäuse wurden frühestens 3 Wochen nach der Operation immunhistochemisch analysiert.

3.2.15. Mittlere cerebrale Arterienocclusion

Die Mäuse wurden anästhesiert durch Inhalation von 1 bis 1.5 % Isofluran (30% O_2, Rest N_2O). Die rektale Temperatur wurde bei 36,5-37°C gehalten und über ein rückgekoppeltes Heizsystem kontrolliert. Um den cerebralen Blutfluss zu messen, wurde ein Laser-Doppler-Flow (Messung der Fließgeschwindigkeit, LDF) während aller Experimente durchgeführt, wobei eine 0.5 mm Faseroptik (Perimed) auf die Schädeldecke über der Kernregion der mittleren cerebralen Arterie geklebt wurde (2 mm posterior, 6 mm lateral des Bregma). Die fokale Ischämie wurde induziert, indem ein transienter Verschluss (Occlusion) der mittleren cerebralen Arterie (MCAO) für 30, 45 oder 60 min gelegt wurde. Hierbei wurde die intraluminale Filament-Technik genutzt (Crome et al., 2007).

Nach einer mittleren Halsinzision wurden die linke und die externe Halsschlagader isoliert und ligiert. Nachdem ein mikrovaskularer Clip (Aesculap, Deutschland) an die interne Halschlagader gelegt wurde, wurde ein 8-0 Silikonharz-beschichtetes Nylonfilament (Ethilon, Durchmesser 180-200 µm, Ethicon, Deutschland) über einen kleinen Schnitt in den distalen Teil der Halsschlagader eingeführt. Nach der Entfernung des Clips wurde 9 mm distal der Verzweigung der Halsschlagader die mittlere cerebrale Arterienocclusion gesetzt.

Nach 30, 45 oder 60 min wurde das Filament entfernt und so eine Reperfusion des verletzten Gewebes ermöglicht. LDF-Messungen wurden für weitere 15 min nach Entfernung des Verschlusses gemessen, um die Reperfusionsrate des cerebralen Blutflusses (>90 % des initialen cerebralen Blutflusses) zu überprüfen (Crome et al., 2007).

Die transiente Ischämie wurde für 30, 45 bzw. 60 min in den Mäusen gesetzt. Die Tiere wurden dann zwei bzw. sieben Tage nach der OP perfundiert. Die Analyse der Mäuse erfolgte durch konfokale Mikroskopie.

4. ERGEBNISSE

4.1. Analyse von Läsionen im ZNS doppelt-transgener fluoreszenter Mäusen

4.1.1. Verwendung transgener Mausmodelle mit fluoreszenter Proteinexpression unter zelltypspezifischen glialen Promotoren

Die Aktivierung von Gliazellen nach akuten wie auch nach chronischen Hirntraumata ist ein wichtiger Reaktionsmechanismus des zentralen Nervengewebes auf eine Verletzung. Dabei kommt es zu einer differenzierten Regulation diverser Proteine, wie einer erhöhten Expression des astrocytären Intermediärfilaments GFAP (*glial fibrillary acidic protein*) oder des Proteolipidproteins (PLP) im Myelin der Oligodendrocyten. Dies kann auf immunhistochemischer Ebene deutlich gezeigt werden (siehe auch Abb. 1 in der Einleitung).

Die Aktivierung von Astrocyten kann durch die Verwendung transgener Mausmodelle mit grün-fluoreszenten Astrocyten (TgN(hGFAP-EGFP)$_{GFEA/C}$; Nolte et al., 2001) gezeigt werden. Verwendet man dieser Mäuse, um akute kortikale Stichverletzungen durchzuführen, ist die astrocytäre Aktivierung an einer erhöhten Anzahl grün fluoreszenter Zellen erkennbar, vergleicht man die Verletzungsseite mit dem kontralateralen Teil des Gehirns. Oligodendrogliosen lassen sich durch Verwendung transgener Mäuse mit rot-fluoreszenten Oligodendrocyten (TgN(mPLP-DsRed)$_{PRDA/B}$; Hirrlinger, Scheller et al., 2005) in denen akute Hirnverletzungen gesetzt wurden, nachweisen. Eine typische Aktivierung dieser glialen Zelltypen ist in der Abb. 5 gezeigt. Deutlich zu erkennen ist, dass sowohl der GFAP- als auch der PLP-Promotor positiv reguliert werden, was in einer erhöhten Zahl transgener EGFP-positiver bzw. DsRed1-positiver Zellen im Bereich der Läsion erkennbar ist. Auf der kontralateralen Seite ist keine Aktivierung der beiden genannten Promotoren erkennbar (siehe Abb. 1, a-c). Die astrogliale Aktivierung zeigt sich auch der erhöhten GFAP-Immunreaktion. Durch Verwendung einer Maus in denen sowohl EGFP in Astrocyten als auch DsRed1 in Oligodendrocyten exprimiert wird, können die glialen Reaktionen auf akute Hirnverletzungen zeitgleich beobachtet werden.

4.1.2. Kortikale Stichläsionen in GFAP-EGFP/PLP-DsRed-transgenen Mäusen

Um die Aktivierung glialer Zellen nach akuten Hirnverletzungen zu untersuchen wurden Stichverletzungen in doppelt-transgenen Mäusen durchgeführt, die sowohl DsRed1 unter Kontrolle des murinen PLP-Promotors als auch EGFP unter Kontrolle des humanen GFAP-Promotors exprimieren (TgN(GFAP-EGFP)$_{GFEC}$xTgN(PLP-

DsRed)$_{PRDB}$ = GCPB). Die Aktivierung der beiden Promotoren kann zeitgleich beobachtet werden.

Nach einer akuten Läsion konnte in den doppelt-transgenen Tieren sowohl eine Astrogliose als auch eine Oligodendrogliose identifiziert werden (siehe Abb. 5). In direkter Nähe zur Verletzung wurden sowohl der GFAP- als auch der PLP-Promotor positiv reguliert, was in der erhöhten Zahl der Transgen-exprimierenden Zellen besonders im Kortex in direktem Umfeld der Verletzung reflektiert war. Zudem war auch erkennbar, dass nicht nur in unmittelbarer Nähe der Läsion eine Aktivierung stattfand, sondern dass sich die Gliose über das Corpus Callosum und das Striatum ausbreitete, aber auf die ipsilaterale Seite beschränkt blieb. Auf der kontralateralen Seite war keine Aktivierung erkennbar. Der ausgewählte Schnitt in der Abb. 5, der einen Überblick über das frontale Hirn zeigt, liegt im rostralem Bereich der Läsion außerhalb des Stichkanals. Die Vergrößerung zeigt einen Schnitt aus dem gleichen Hirn kaudal, hier ist der Stichkanal erkennbar.

In der Region um die Läsion wurden Zellen identifiziert, die gleichzeitig sowohl EGFP als auch DsRed1 exprimierten und daher in der Addition der Fluorophore „gelb“ erscheinen. Diese Zellen werden als AO-Zellen bezeichnet, da sie sowohl den astroglialen GFAP- als auch den oligodendroglialen PLP Promotor zeitgleich angeschaltet haben. Diese Zellen erschienen frühestens drei Tage nach der Operation (OP) und waren nach 15 Tagen nicht mehr detektierbar (Alter der operierten Mäuse: 4-8 Wochen).

AO-Zellen waren in allen Schnitten mit einer Läsion zu finden und die Anzahl dieser Zellen nahm mit dem Schweregrad der Verletzung zu. Kleinere Schnittverletzungen zeigten eine geringere Anzahl der doppelt-transgenen Zellen im Vergleich zu Mäusen, in denen die Schnittverletzung größer war. In direkter Umgebung der Verletzung (< 100 µm) waren die meisten dieser AO-Zellen zu finden, in größerer Entfernung zur Läsion (100-500 µm) nahm ihre Zahl ab. In Bereichen in denen es keine zu beobachtenden Gliosen gab (>500 µm), konnten zu keinem Zeitpunkt AO-Zellen identifiziert werden. Zudem beschränkten sich die AO-Zellen nicht nur auf Kortex und Corpus Callosum, sondern sie waren auch in anderen betroffenenen Hirnregionen mit Verletzung vorhanden (Daten nicht gezeigt).

Die Analyse der AO-Zellen wurde auf Tiere beschränkt, deren Alter zwischen vier und acht Wochen zum Zeitpunkt der Operation lag. Es wurden Weibchen und Männchen zu gleicher Zahl verwendet und es konnten keine Unterschiede in Anzahl, Morphologie und Auftreten der AO-Zellen zwischen den beiden Geschlechtern identifiziert werden.

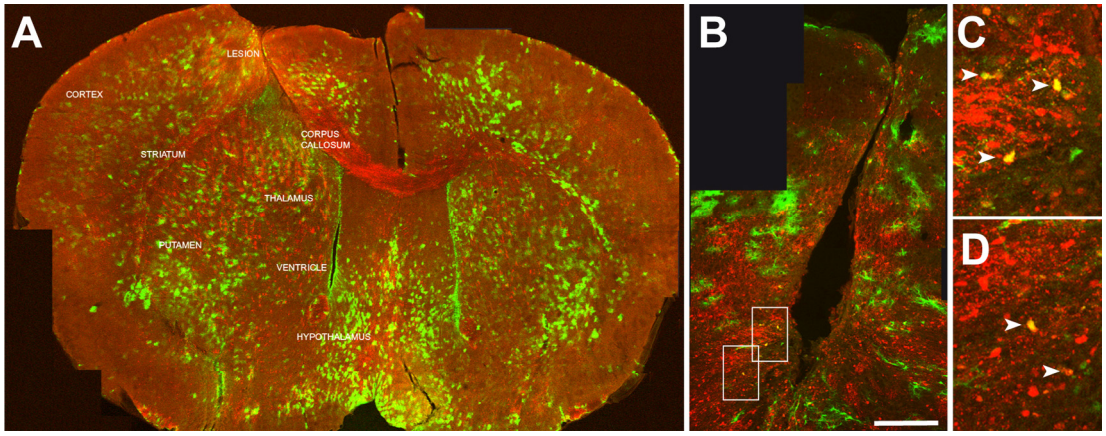


Abb. 5 Analyse der glialen Reaktion bei akuter kortikaler Hirnverletzung in doppelt-transgenen GFAP-EGFP/PLP-DsRed-Mäusen

In A ist ein frontaler Hirnschnitt dargestellt, auf der ipsilateralen Seite (links) ist die Läsion (rostral, außerhalb des Stichkanals) erkennbar. Es sind sowohl eine Astro- als auch eine Oligodendrogliose in Kortex, Corpus Callosum sowie dem Striatum identifizierbar, kontralateral gibt es keine Aktivierung. In B ist die Läsion in dem gleichen Tier weiter kaudal im Gehirn innerhalb des Stichkanals dargestellt. Die grünen Astrocyten sowie die roten Oligodendrocyten sind aktiviert. Bei einer größeren Auflösung (C/D) sind Zellen identifizierbar, die zeitgleich EGFP wie auch DsRed1 exprimieren und in dieser Arbeit als AO-Zellen bezeichnet werden.

4.1.3. Morphologie, transgene Expression und immunhistochemische Identität der aktivierten Gliazellen

Die identifizierten Zellen zeigten meist eine uni- oder bipolare Morphologie. Häufig erschienen sie rund ohne deutliche erkennbare Ausläufer. In einigen Fällen konnten auch wenige Fortsätze identifiziert werden, die dann häufig Proteinaggregate bestehend aus DsRed1 enthielten (Hirrlinger, Scheller et al., 2005). In Abbildung sind einige Beispiele von AO-Zellen dargestellt, die die am häufigsten vorkommenden morphologischen Variationen zeigen.

Zwischen dem siebten und dem achten Tag nach der Operation konnten die meisten AO-Zellen beobachtet werden. Zu diesem Zeitpunkt war die Identifizierung der Zellen problemlos möglich. Die Zahl der doppelt-transgenen Zellen lag zwischen drei und acht Zellen pro Schnitt und Läsion (Schnittdicke 50 µm, Daten nicht gezeigt). Die Zahl nahm dann mit der Zeit ab und nach 15 Tagen war es nicht mehr möglich AO-Zellen zu identifizieren. Des Weiteren war auffällig, dass die Stärke der Expression der fluoreszenten Proteine von Zelle zu Zelle variierte.

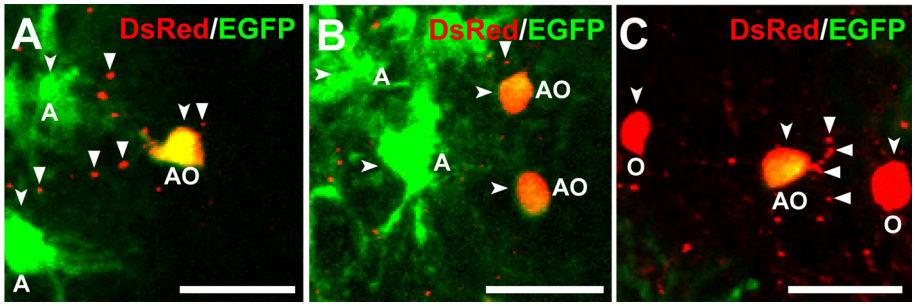


Abb.6 Variabilität in der Morphologie aktivierter Gliazellen

Kortikale AO-Zellen sind durch die zeitgleiche Expression des DsRed1 und EGFP („AO"-Erscheinung) deutlich von den grünen Astrocyten und roten Oligodendrocyten unterscheidbar. In A und C sind AO-Zellen dargestellt, in denen man mindestens zwei Fortsätze identifizieren kann. Auffällig die DsRed-Aggregatbildung in den Fortsätzen. In B sind zwei AO-Zellen deren einfache Morphologie sich deutlich von den benachbarten protoplasmatischen Astrocyten unterscheidet.

In der Abbildung 6 ist in relativen Fluoreszenzeinheiten (*relative fluorescent units* = RFU) dargestellt, welche verschiedenen Variationen in der Quantität der Expression der beiden fluoreszenten Proteine es in den AO-Zellen gab. Die AO-Zellen erscheinen in verschiedenen Gelbabstufungen durch die Addition der beiden Farbkanäle, da sowohl DsRed1 als auch EGFP in verschiedenen Konzentrationen exprimiert wurden (Zellen 2/3/4 und 5 in der Abb. 7). Deutlich erkennbar an den höheren RFU-Werten ist, dass DsRed1 deutlich heller verglichen mit EGFP war. Die starke Variabilität zwischen den AO-Zellen wird in der Tabelle 5 dargestellt. Hier gezeigt werden Zellen, die mehr DsRed1 (Zelle 2/3 und 4) oder EGFP (Zelle 5) exprimierten. Dies ist quantitativ auch in der Abb. 7D dargestellt. Als Vergleich wurden ein Oligodendrocyt (Zelle 1) und ein protoplasmatischer Astrocyt (Zelle 6) quantitativ mit der Expression der jeweiligen fluoreszenten Proteine mit dargestellt, die beide nur die jeweiligen fluoreszenten Proteine enthielten. Der Hintergrund wurde definiert mit einem Wert von 5-10 RFU/Pixel (als Grundlage des Hintergrundes in den analysierten Astro- bzw. Oligodendrocyten). Als Schwellwert für die Expression von DsRed1 oder EGFP in AO-Zellen wurde ein Wert von 20 RFU/Pixel angenommen. Dies entspricht dem doppelten Hintergrundwert.

Die DsRed1-Fluoreszenz variierte in den einzelnen AO-Zellen um bis zu das fünfache, während die EGFP-Fluoreszenz um das dreifache variieren konnte. Zudem hatten die RFU/Pixel des DsRed1 deutlich höhere Werte als die des EGFP. Dies zeigte sich sowohl in den Auswertungen der AO-Zellen, als auch in den Werten der Oligodendrocyten vs. der Astrocyten.

Tabelle 5 Vergleich der Expression von EGFP und DsRed1 in aktivierten Gliazellen

Zelle Nr.	RFU/Pixel DsRed1	RFU/Pixel EGFP	RFU/Pixel DsRed1/EGFP	Zelltyp
1	225 ± 9	6 ± 1	37,5	Oligodendrocyt
2	178 ± 10	22 ± 8	8	AO-Zelle
3	79 ± 7	22 ± 3	3,6	AO-Zelle
4	86 ± 8	40 ± 4	2,2	AO-Zelle
5	29 ± 7	57 ± 5	0,5	AO-Zelle
6	10 ± 2	130 ± 7	0,07	Astrocyt

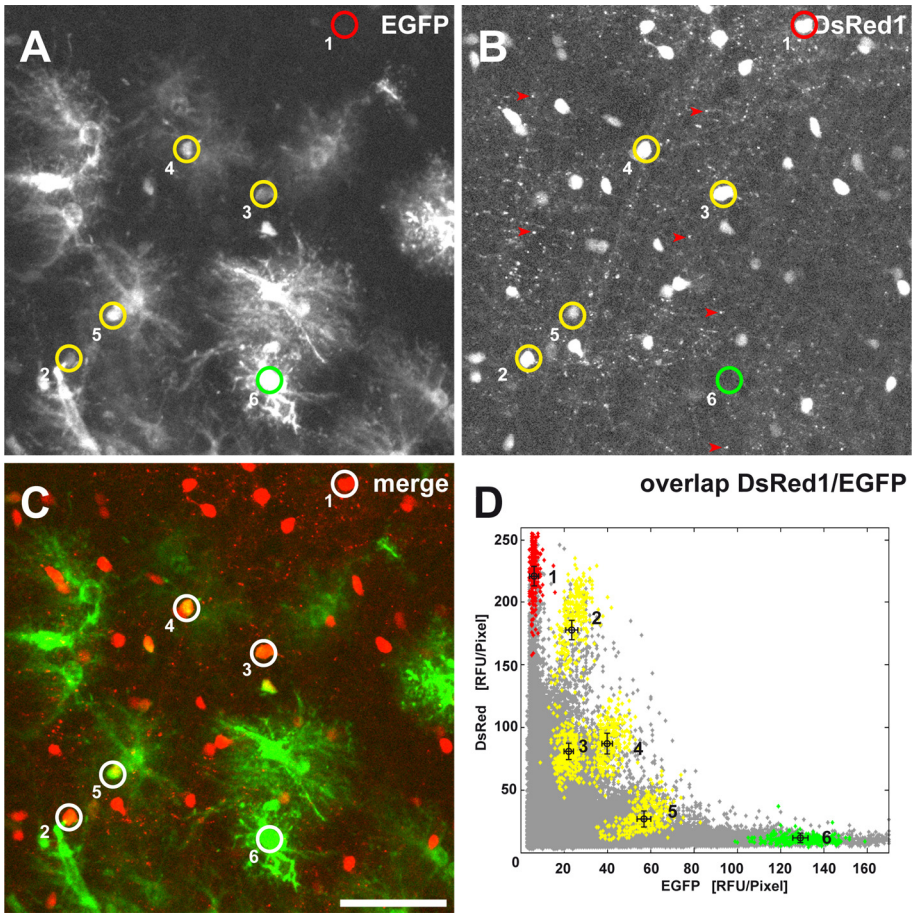


Abb. 7 Ausmaß der Expression von DsRed1 und EGFP in aktivierten Gliazellen

Der Expressionsgrad der beiden fluoreszenten Proteine EGFP und DsRed1 in den AO-Zellen schwankt stark. A zeigt die EGFP-Expression, B die Expression des DsRed1. C: Überlagerung von A und B. Es wurden sechs verschiedene Regionen markiert, die unterschiedlichen Mengen der beiden fluoreszenten Proteine exprimieren. In D ist die Kolokalisation der Expression der beiden fluoreszenten Proteine in den sechs ausgewählten Regionen in RFU/Pixel dargestellt. Die graue Fläche stellt die RFU/Pixel des gesamten Bildausschnitts dar. Auf der Ordinate werden die RFU/Pixel des DsRed1, auf der Abszisse die des EGFPs gezeigt. Die Zelle 1 exprimiert nur

DsRed1 was sowohl im Schnitt als auch in der grafischen Darstellung der RFU/Pixel erkennbar ist. Die Zelle 6 exprimiert im Gegensatz dazu nur EGFP, liegt daher auf der EGFP-Seite der Fluoreszenzmessung. Die Zellen 2-5 exprimieren unterschiedliche Konzentrationen DsRed1 und EGFP. Dies ist sowohl im Schnitt erkennbar (2/3/4:DsRed1>EGFP; und 5:DsRed1<EGFP), lässt sich aber mit Hilfe der unterschiedlichen RFU/Pixel auch quantitativ im Diagramm darstellen (D). Erkennbar auch die Proteinaggregate des DsRed1, markiert durch die roten Pfeilspitzen (B), die es erschweren bzw. teilweise sogar unmöglich machen, den feinen oligodendroglialen Fortsätzen zu folgen. Der Balken entspricht 50 µm und gilt für A-C. Die Auswertung wurde mit Hilfe einer maximalen Intensitätsprojektion (MIP) durchgeführt.

Die gegebene Morphologie und die unterschiedlichen Expression der fluoreszenten transgenen Proteine der AO-Zellen, gaben Hinweise auf die Eigenschaften der AO-Zellen. Durch die Expression des EGFP und DsRed1 deuteten sich gliale Eigenschaften an, definiert als GFAP- bzw. PLP-Promotoraktivität. Zu diesem Zeitpunkt konnte nur festgestellt werden, dass (1) die Zellen EGFP und DsRed1 zum gleichen Zeitpunkt exprimierten, (2) dass in ihren Fortsätzen Proteinaggragate aus DsRed1 enthalten waren und dass (3) ihre Morphologie (sofern durch die Aggregate erkennbar) eher uni- oder bipolar war.

Die glialen Eigenschaften der AO-Zellen wurden immunhistochemisch analysiert durch den Nachweis von Markerproteinen, die astro- bzw. oligodendrogliale Eigenschaften definieren. Des Weiteren wurden diverse Proteine gewählt, die für die Proliferation, die Reifung bzw. Entwicklung von Vorläuferzellen charakteristisch sind. Neuronale Marker wurden verwendet, um einen potentiell neuronalen Hintergrund der Zellen zu identifizieren. Hierzu wurden Mäuse acht Tage nach Setzen der Läsion im Kortex perfundiert und die Schnitte immunhistochemisch untersucht. Die verwendeten Marker sind in der Tabelle 6 aufgelistet.

Tabelle 6 Verwendete Markerproteine mit ihrer zelltypspezifischen Expression

Name	Funktion	Exprimierender Zelltyp	Quelle
GFAP	Intermediärfilament	Astrocyt	(Eng et al., 2000)
S100beta	Calciumbindendes Protein	Astrocyt	(Vives et al., 2003)
PLP	Protein des Myelins	Oligodendrocyt	(Fuss et al., 2000)
Olig2	Transkriptionsfaktor	OPCs	(Dimou et al., 2008)
SOX10	Transkriptionsfaktor	OPCs	(Li et al., 2007)
NG2	Proteoglycan	OPCs, NG2-Glia	(Diers-Fenger et al., 2001)
NeuN	DNA-bindendes Protein	reife Neurone	(Hirrlinger, Scheller et al., 2005)
Tuj1	β III Tubulin	reife Neurone	(Luskin, 1993)

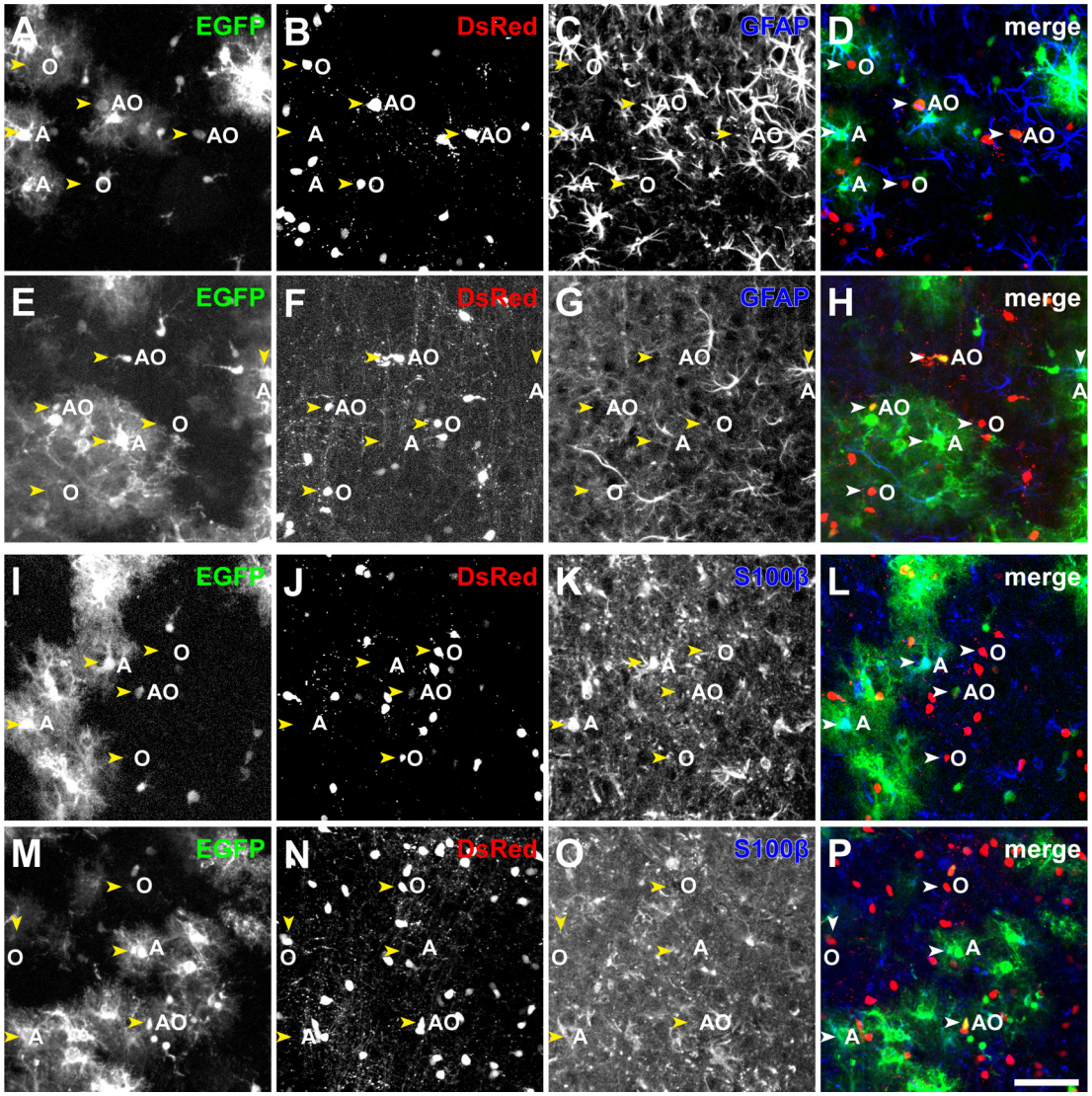


Abb. 8 Fehlen von astroglialen Markern in AO-Zellen

In A-H wird die Expression des GFAP in der Läsion 7 Tage nach der Verletzung gezeigt. In I-P die Expression des S100β. Beide astroglialen Marker können in den AO-Zellen nicht detektiert werden, wohl aber in EGFP-positiven protoplasmatischen Astrocyten. Der Balken entspricht 50 µm und gilt für alle Bildausschnitte. Pfeilspitzen markieren den beschriebenen Zelltyp. A: Astrocyt; AO: AO-Zelle; O: Oligodendrocyt.

Die AO-Zellen waren zum gezeigten Zeitpunkt negativ für die astroglialen Marker GFAP und S100β, im Gegensatz zu benachbarten protoplasmatischen Astrocyten (Abb. 8). Auf der kontralateralen Seite zur Läsion konnte keine Astrogliose bzw. Oligodendrogliose detektiert werden, die kortikalen Astrocyten waren aber ebenfalls positiv für GFAP- bzw. S100β (Daten nicht gezeigt). Oligodendrocyten werden durch PLP-Immunreaktivität entlang ihrer Fortsätze nachgewiesen. AO-Zellen zeigten

ebenfalls Fortsätze, die PLP-immunreaktiv waren. Fluoreszente Proteinaggregate des DsRed1 waren auf den PLP-positiven Fortsätzen zu finden (Abb. 9). Neuronale Marker konnten in den AO-Zellen zu keinem Zeitpunkt identifiziert werden (Abb. 10). Alle untersuchten AO-Zellen waren sowohl NeuN- (Abb. 10) als auch Tuj1-negativ (Daten nicht gezeigt). Die NeuN-positiven Zellen in der Abbildung 10 entsprechen benachbarten Pyramidenneuronen.

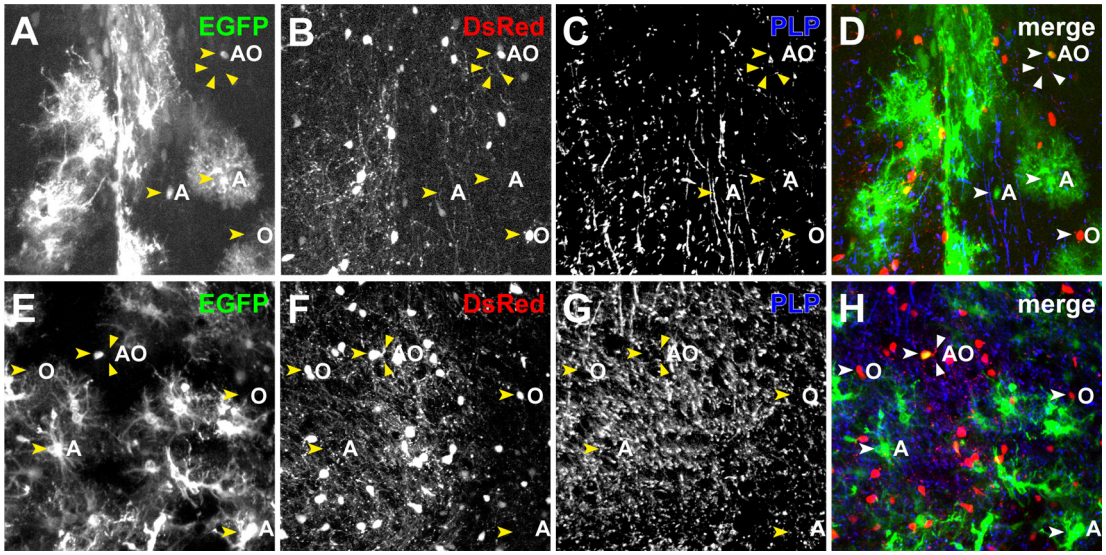


Abb. 9 Nachweis von oligodendroglialen Markern in AO-Zellen

Sieben Tage nach der Läsion kann der oligodendrogliale Marker PLP in den Fortsätzen der AO-Zellen sowie in benachbarten Oligodendrocyten gezeigt werden (Dreiecke). In den AO-Zell-Fortsätzen sind fluoreszente DsRed1-Proteinaggregate erkennbar. Der Balken entspricht 50 µm und gilt für alle Bildausschnitte. Die Pfeilspitzen markieren den beschriebenen Zelltyp. A: Astrocyt; AO: AO-Zelle; O: Oligodendrocyt.

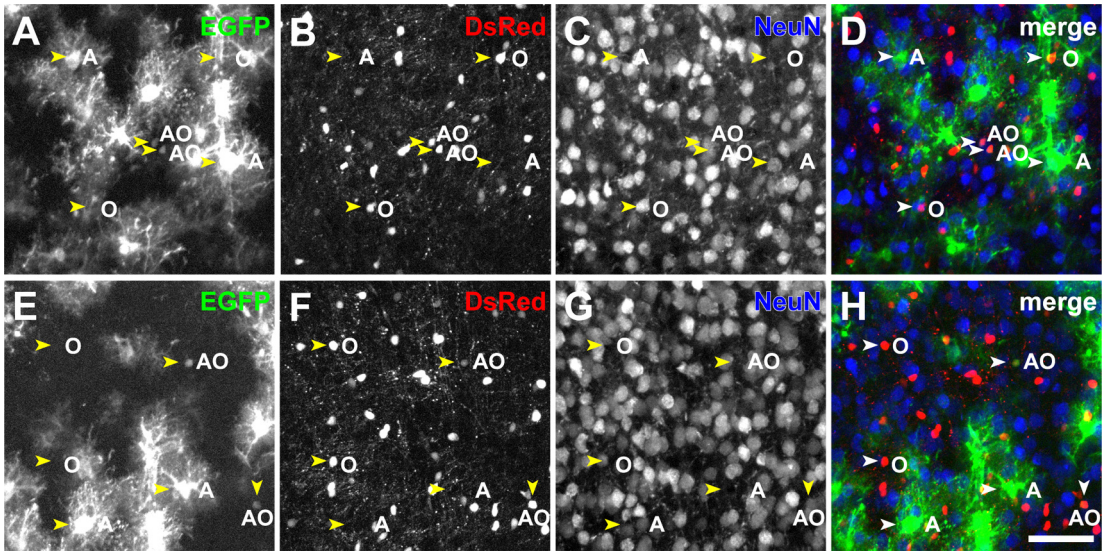


Abb. 10 Fehlen neuronaler Marker in AO-Zellen

In A-H wird die Expression des neuronalen Proteins NeuN in der Läsion 7 Tage nach der Operation gezeigt. Alle untersuchten AO-Zellen waren negativ für NeuN. Benachbarte NeuN-positive Zellen entsprechen Pyramidenneuronen der unterschiedlichen kortikalen Schichten. Der Balken entspricht 50 µm und gilt für alle Bildausschnitte. Die Pfeilspitzen markieren den beschriebenen Zelltyp. A: Astrocyt; AO: AO-Zelle; O: Oligodendrocyt.

Um das Ausmaß der Proliferation und den Differenzierungsgrad zu bestimmen, wurde die Expression proliferationsspezifischer Marker oligodendroglialer Vorläuferzellen untersucht. Hierzu zählen Olig2, Sox10 und NG2, wobei der letztere neben Oligodendrocytenvorläuferzellen auch die Population reifer NG2-Zellen markiert (Nishiyama et al., 2005). Bei den Markern Olig2 und Sox10 wurde eine Diversität der AO-Zellen festgestellt. Während ein Teil der AO-Zellen sowohl Sox10- als auch Olig2-positiv war, exprimierte eine andere Population der Zellen diese Marker nicht (AO^-). Komplexe Gliazellen (A*), die sich durch eine geringere Fluoreszenzintensität des EGFP, die Expression von Glutamat-Rezeptoren und komplexe Ionenkanalstrommuster auszeichnen (siehe dazu Matthias et al., 2003), zeigten sowohl auf der ipsilateralen als auch der kontralateralen Seite Immunreaktivität für beide Marker.

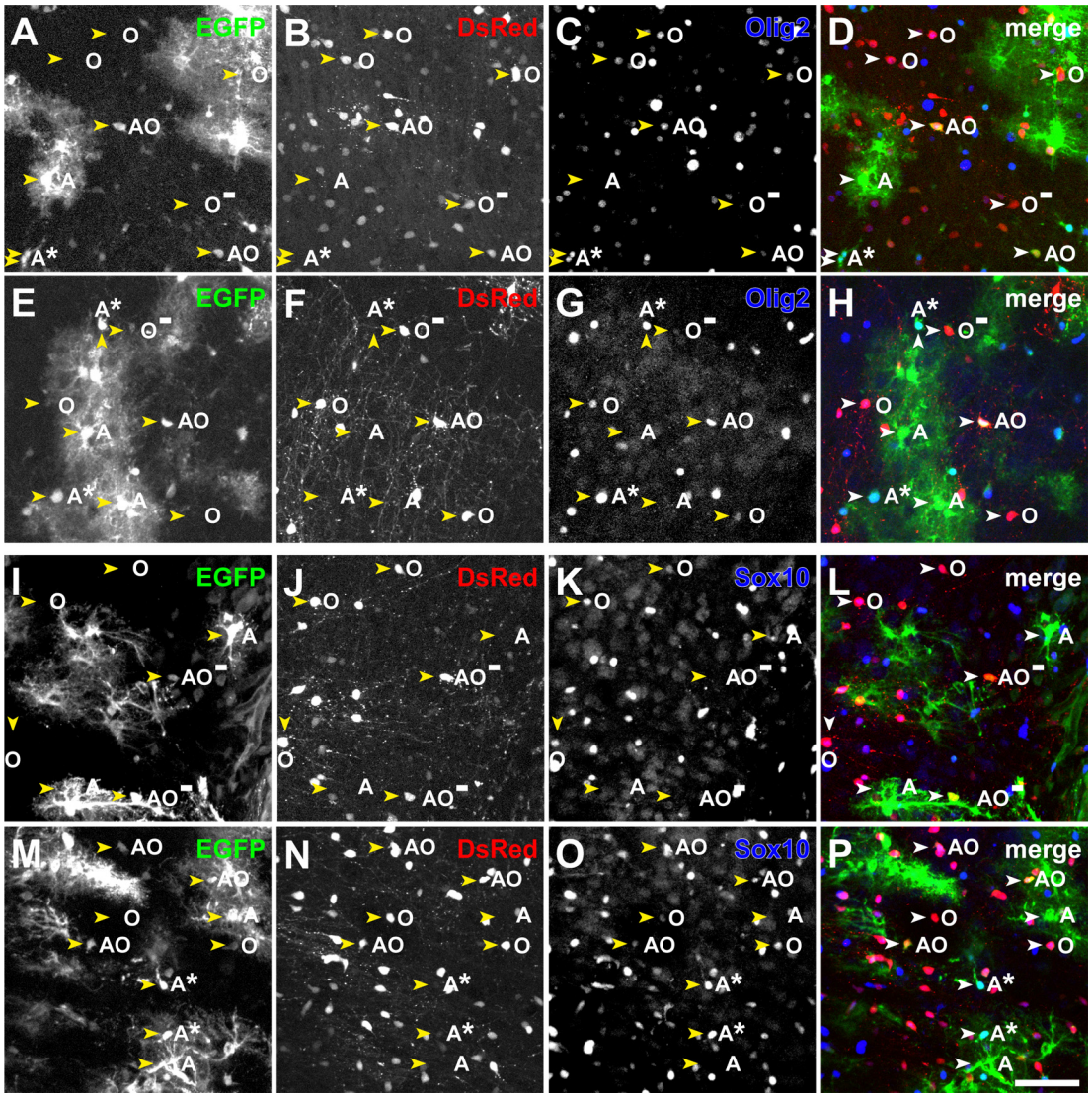


Abb. 11 Expression oligodendroglialer Vorläufermarker in den AO-Zellen

A-H zeigt die Detektion von Olig2 in der Läsion sieben Tage nach der Verletzung, I-P die Detektion des Sox10. Beide Marker werden in oligodendroglialen Vorläuferzellen sowie NG2-positiven Zellen exprimiert. In den AO-Zellen werden beide Marker exprimiert (AO) und ein Teil der doppelttransgenen Zellen ist negativ (AO^-). Alle protoplasmatischen Astrocyten (A) sind negativ für diese Marker, während komplexe Gliazellen (A^*) positiv für beide Marker sind. Der Balken entspricht 50 µm und gilt für alle Bildausschnitte. Die Pfeilspitzen markieren den beschriebenen Zelltyp. A: Astrocyt; A^*: komplexe Zelle, positiv für Marker; AO: AO-Zelle positiv für Marker, AO^-: AO-Zelle negativ für Marker; O: Oligodendrocyt; O^-: Oligodendrocyt negativ für Marker.

Das Chondroitinproteoglycan NG2 wird als Marker für oligodendrogliale Vorläuferzellen verwendet. In den letzten Jahren gab es eine Vielzahl Publikationen (Nishiyama et al., 2005), die zeigten, dass NG2 auch als ein Marker für eine 4. Population reifer Gliazellen (NG2-Glia, Polydendrocyten, Synantocyten) eingesetzt wird (siehe auch

Einleitung Abschnitt 2.4.1). Die immunhistochemische Analyse der AO-Zellen zeigte, dass auf ihnen keine Immunreaktivität für NG2 vorkommt. In keiner der untersuchten Regionen (Kortex, Corpus Callosum, Striatum und Hippocampus) konnte eine doppelt-transgene Zelle identifiziert werden, die positiv für NG2 war. Deutlich erkennbar war aber, dass die komplexen Gliazellen (A*) NG2-Immunoreaktivität besitzen (Matthias et al., 2003). Dies gilt für die ipsi- wie auch die kontralaterale Seite der Läsion (kontralaterale Daten nicht gezeigt).

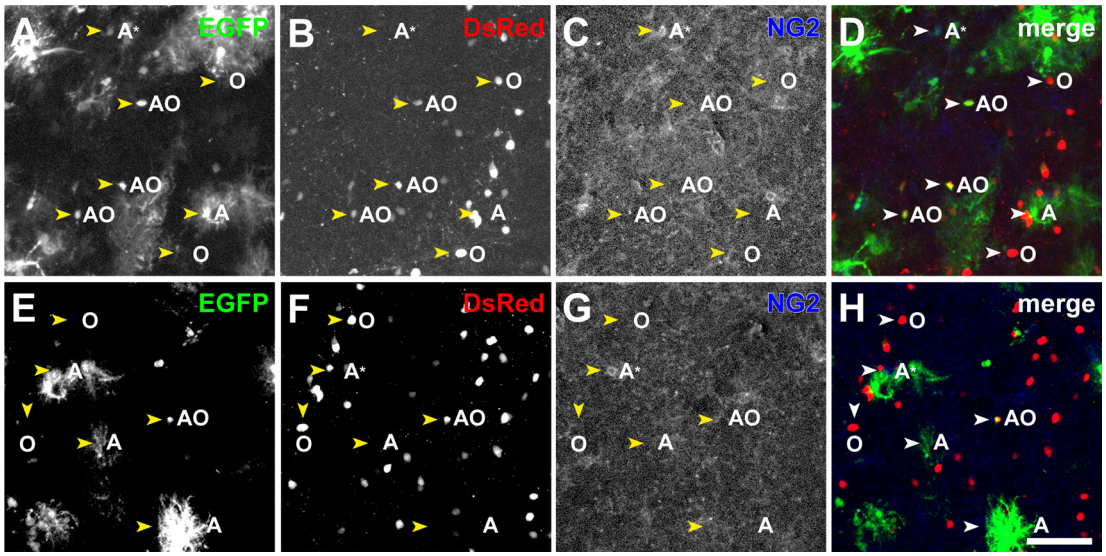


Abb. 12 Fehlen von NG2 in AO-Zellen

A-H zeigt die Expression von NG2 im Kortex in direkter Umgebung zur Verletzung. Die AO-Zellen sind negativ für diesen Marker oligodendroglialer Vorläuferzellen und reifer NG2-Zellen. Komplexen Gliazellen hingegen zeigen NG2-Immunreaktivität (A*). Der Balken entspricht 50 µm und gilt für alle Bildausschnitte. Der gezackte Pfeilkopf markiert den beschriebenen Zelltyp. A: Astrocyt; A*: komplexer Astrocyt, positiv für NG2; AO: AO-Zelle; O: Oligodendrocyt.

4.1.4. Ischämische Verletzungen in den doppelt-transgenen fluoreszenten Mäusen

Nach der kortikalen Stichverletzung wurden Mäuse auch einer mittleren cerebralen arteriellen Occlusion (MCAO – *middle cerebral artery occlusion*) unterzogen. Dies ist ein Modell für eine ischämische Verletzung. Durch eine variable Dauer der Sauerstoff-unterversorgung, kann der Schweregrad der ischämischen Verletzung und die Zerstörung der Blut-Hirn-Schranke beeinflusst werden. Zu vergleichenden Analysen wurden hier 30, 45 und 60 min MCAO gewählt. Dabei wird bei einer Sauerstoffunter-versorgung über 30 min die Blut-Hirnschranke deutlich weniger verletzt, als bei 60 min

Blockierung der mittleren cerebralen Arterie. Dieser Zeitraum der Sauerstoffunterversorgung zerstört die Blut-Hirn-Schranke in großem Umfang (Belayev et al., 1996).

Nach der MCAO wurden die Mäuse beobachtet und nach zwei bzw. sieben Tagen analysiert. In der Abb. 13 ist eine frontale Übersicht über das Großhirn einer doppelt-transgenen fluoreszenten Maus gezeigt, bei der für 60 min die Sauerstoffversorgung des Gehirns unterbrochen wurde. Die Analyse der Maus erfolgte sieben Tage später. Die betroffenen Regionen waren durch eine erhöhte Autofluoreszenz in Kortex, Corpus Callosum und Striatum gekennzeichnet (A), weiter kaudal (B) war auch der Hippocampus betroffen. In direkter Nähe zum abgestorbenen Gewebe sind die aktivierten Gliazellen erkennbar. Eine erhöhte Zahl fluoreszenter Astrocyten und Oligodendrocyten ist identifizierbar. Die Zellen umschliessen das tote Gewebe.

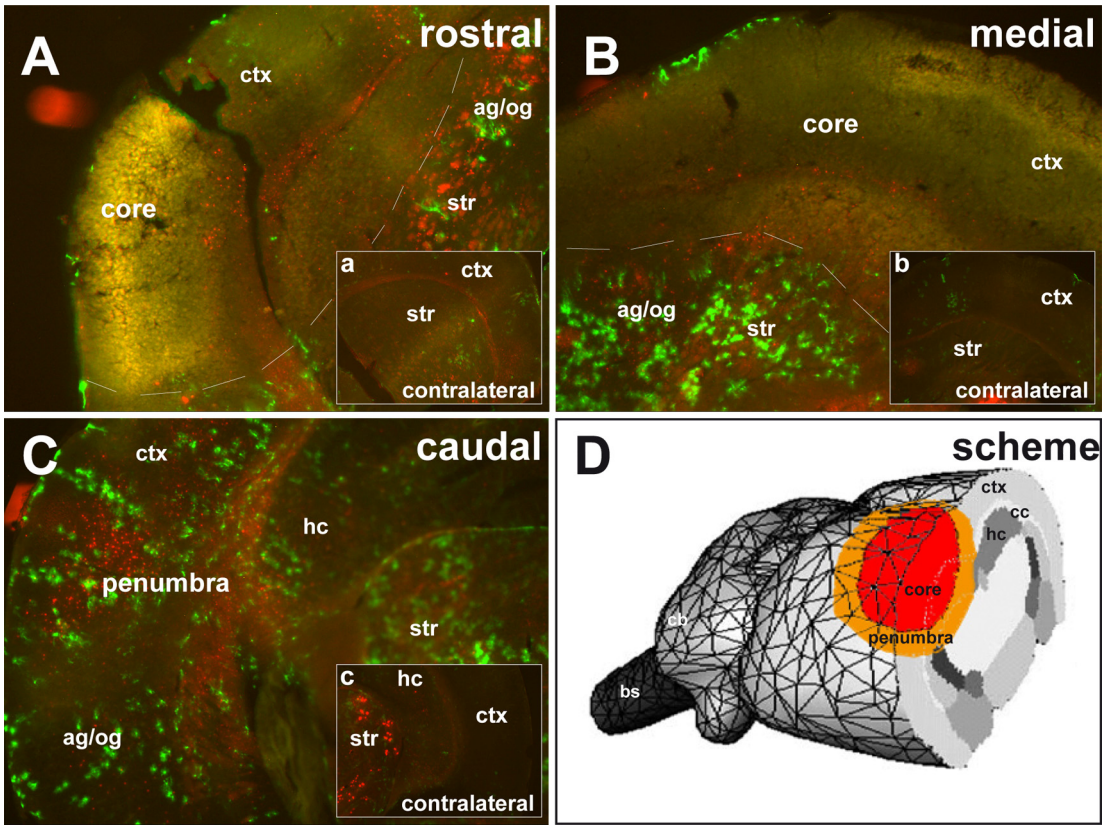


Abb. 13 Mittlere cerebrale Arterienocclusion – Ausmaß und Lokalisation

Hier ist ein Hirnschnitt einer doppelt-transgenen fluoreszenten Maus gezeigt (GCPB), die für 60 min eine MCAO erhalten hat. Die Analyse erfolgte sieben Tage nach dem Eingriff. Die betroffene Region schließt Kortex, Corpus Callosum und Striatum ein. Das tote Gewebe zeigt eine erhöhte Autofluoreszenz und ist umgeben von aktivierten Gliazellen (Astro- und Oligodendrocyten). Auf der kontralateralen Seite sind weder die gliale Aktivierung noch abgestorbenes Gewebe (identifizierbar an der Autofluoreszenz)

erkennbar. Die kontralaterale Seite ist jeweils in den kleinen Abbildungen (a-c) dargestellt. D zeigt eine schematische Übersicht über die verschiedenen betroffenen Regionen nach einer MCAO. (modifiziert nach Ma et al., 2008) ctx: Kortex, str: Striatum; hc: Hippocampus, ag: Astrogliose; og: Oligodendrogliose

Eine Sauerstoffunterversorgung von 60 min induzierte in allen untersuchten Tieren sieben Tage nach der Operation in den betroffenenen Hirnregionen die Bildung von AO-Zellen. Sowohl im Kortex, als auch im Corpus Callosum und Striatum ließen sich AO-Zellen identifizieren, deren Morphologie der von AO-Zellen nach Setzen einer kortikalen Stichläsion entsprach. Eine zeitliche Reduktion (45 min) des Gefäß-verschlusses während der MCAO resultierte in einer geringeren Gewebsschädigung. Es wurden deutlich weniger AO-Zellen im Läsionsgebiet nachgewiesen. Eine MCAO über nur 30 min führte in keinem der untersuchten Fälle zur Detektion von AO-Zellen. Eine genauere Übersicht über die Auswirkungen der Sauerstoffunterversorgung über 30, 45 bzw. 60 min ist in der Abb. 14 dagestellt. Weder in Kortex (Abb. 14 A-C), Corpus Callosum noch in Striatum und Hippocampus konnten AO-Zellen identifiziert werden. Nach 45 min MCAO ließen sich nur wenige AO-Zellen identifizieren (1-3 Zellen / frontaler Schnitt). In allen untersuchten Bereichen (Kortex (Abb. 14 G-H), Corpus Callosum (Abb. 14 J-L), Striatum und Hippocampus) konnten nach einer 60 minütigen Sauerstoffunterversorgung doppelt-transgene DsRed1- und EGFP-positive Zellen identifiziert werden (10-20 Zellen / frontaler Schnitt).

In Tieren, die bereits zwei Tage nach Setzen der ischämischen Schädigung für 60 min, analysiert wurden, konnten in keinem Fall AO-Zellen gefunden werden.

Eine längere MCAO-Behandlung als 60 min wurde nicht durchgeführt, da die Mäuse erst nach einem Zeitraum von einer Woche untersucht werden sollten. Bei einer längeren Sauerstoffunterversorgung besteht die Gefahr, dass die Mäuse im Laufe des Beobachtungszeitraumes sterben.

Diese Ergebnisse zeigen, dass eine MCAO mit einer Dauer von mindestens 45 min in in den untersuchten Großhirnregionen Kortex, Corpus Callosum, Striatum und Hippocampus das Auftauchen von AO-Zellen induziert. Bei einer längeren Schädigung (60 min MCAO) treten die AO-Zellen gehäufter auf. Eine Dauer der ischämischen Schädigung über 30 min ist zu gering um die Entwicklung von AO-Zellen zu induzieren.

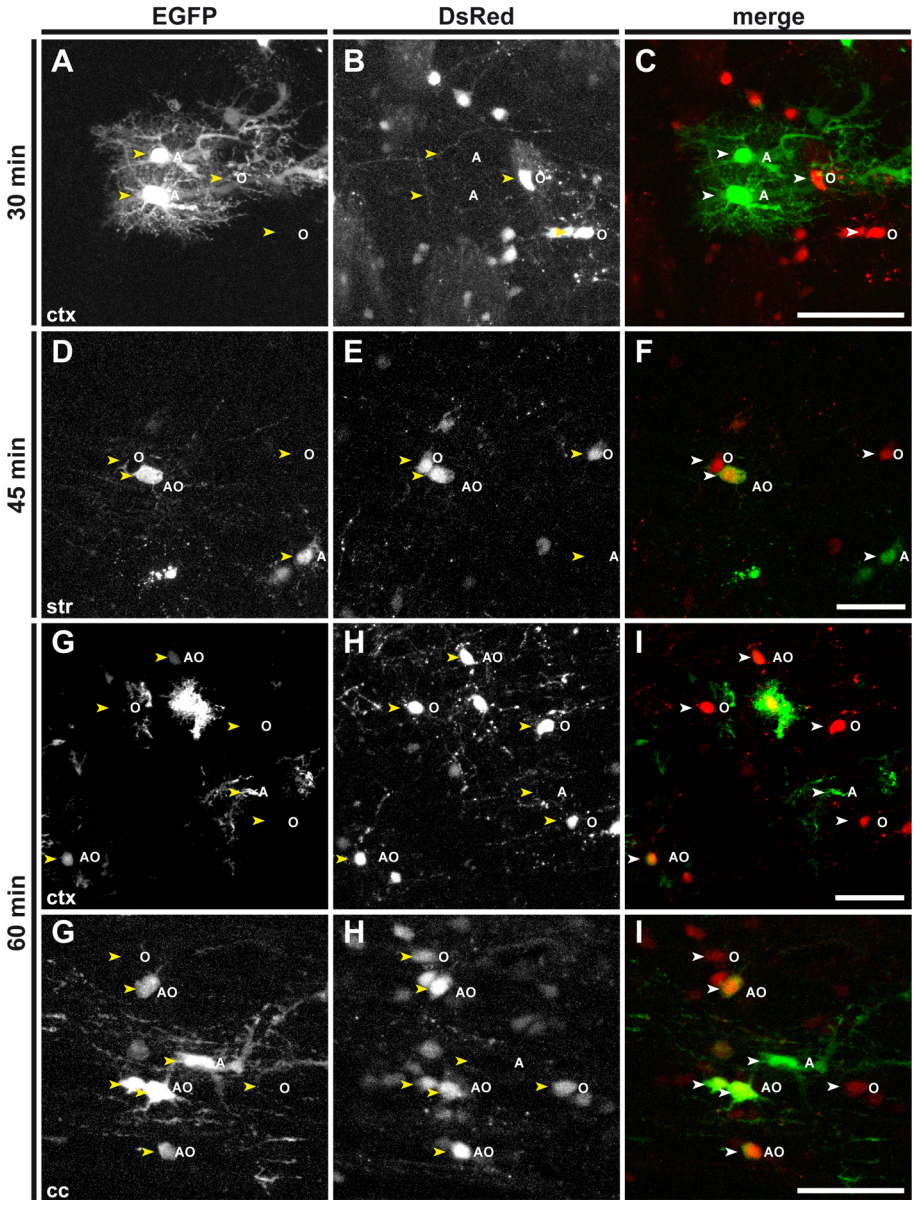


Abb. 14 Induktion einer MCAO in doppelt-transgenen fluoreszenten Mäusen

Induzierte man in den Mäusen eine MCAO mit einer Sauerstoffunterversorgung über 30 min konnten in den untersuchten Hirnregionen (Kortex, Corpus Callosum, Striatum) keine AO-Zellen identifiziert werden (Kortex, A-C). Wurde die Sauerstoffunterversorgung auf 45 min verlängert, konnten vereinzelt AO-Zellen identifiziert werden (Striatum, E-G). Nach einem Verschluss der Arterie für 60 min konnte eine größere Anzahl AO-Zellen in Kortex, Corpus Callosum sowie Striatum gefunden werden (10-20 Zellen/Schnitt; Corpus Callosum (H-I), Kortex (J-I)).

4.2. Analyse der posttraumatischen Differenzierung aktivierter Gliazellen

Sowohl bei akuten Stichverletzungen als auch bei der MCAO konnten AO-Zellen nur in einem Zeitfenster von 3-15 Tagen nach der Verletzung detektiert werden. Nach 16 und mehr Tagen waren AO-Zellen nicht mehr im Gewebe auffindbar. Für diesen Befund kommen zwei Erklärungsmöglichkeiten in Frage: Differenzierung in einen Nicht-AO-Zelltyp oder programmierter Zelltod. Zur Beantwortung dieser Frage konnten die doppelt-transgenen GFAP-EGFP/PLP-DsRed-Tiere nicht verwendet werden. Sowohl EGFP als auch DsRed1 haben eine zu kurze Halbwertszeit (EGFP, ~24 h, DsRed ~4 Tage; (Verkhusha et al., 2003)), um die Zellen auf Dauer zu markieren und ihre Entwicklung zu verfolgen. Sobald mindestens einer der beiden Promotoren die Aktivität reduziert, verlieren die AO-Zellen ihre Identifikationseigenschaft: die simultane Expression der Transgene DsRed1 und EGFP und können nicht mehr von den umliegenden anderen Zellen unterschieden werden.

Zur Lösung dieses Problems musste ein Modell gefunden werden, dass es ermöglichte, längerfristig Zellen zu markieren, so dass diese nach variablen Zeitpunkten identifiziert werden können. Ein Enzym, das es ermöglicht dauerhaft Zellen zu markieren, ist die Cre-DNA-Rekombinase. Im Jahr 2003 publizierten zwei Gruppen unabhängig voneinander, dass es *in vitro* möglich ist die Cre-Rekombinase in zwei Fragmente zu teilen, so dass diese nach späterer Zusammenführung (Komplementierung) ein funktionelles Enzym ergibt (Casanova et al., 2003; Jullien et al., 2003). Werden N- und C-terminale Cre-Fragmente über einen Linker mit der konstitutiven Coiled-Coil-Domäne des GCN4-Transkriptionsfaktors fusioniert, konnte *in vitro* eine effektive spontane Cre-Komplementierung beobachtet werden (Beate Kellert, Diplomarbeit Max-Planck-Institut für experimentelle Medizin/Universität Göttingen, 2006).

Um die posttraumatische Differenzierung der AO-Zellen zu klären, wurden daher transgene Mäuse hergestellt, die unter der Kontrolle der beiden genutzten glialen Promotoren (GFAP und PLP) je ein Fragment der Cre-Rekombinase exprimieren. Die Cre-Komplementierung in diesen Mäusen, sollte eine Koinzidenzdetektion der beiden glialen Promotoren *in vivo* ermöglichen. Durch die Markierung der Zellen mit Hilfe eines Reporters ist es dann möglich, die weitere Entwicklung der Zellen zu verfolgen, da sowohl die AO-Zellen als auch ihre Nachkommenschaft permanent markiert werden können.

4.3. Herstellung und Charakterisierung eines neuen transgenen Mausmodells mit Komplementierung der Cre-DNA-Rekombinase

4.3.1. Beschreibung der verwendeten Konstrukte

Es wurden Mikroinjektionen verschiedener DNA-Konstrukte mit GFAP- bzw. PLP-Promotor und N- bzw C-terminalen Fragmenten der Cre-Rekombinase in den Mausstamm C57/Bl6 im Tierhaus des Max-Planck-Institutes für experimentelle Medizin durchgeführt. Eine genaue Übersicht über die verwendeten Konstrukte ist in der Abb. 4 dargestellt. (weitere Beispiele für Mäuse mit Expression transgener Proteine unter der Kontrolle dieser Promotoren in (Hirrlinger, Scheller et al., 2005). Nach Genotypisierung wurden transgene Tiere mit WT-Mäusen verpaart. Die proteinchemische Analyse der Expression der Cre-Fragmente erfolgte mit Hilfe der Western Blot-Analyse und ist im Anhang in Abschnitt 8.2 genauer dargestellt. Es konnten drei Mauslinien mit Expression des NCre-Fragments und zwei Linien mit Expression des CCre-Fragments unter Kontrolle des murinen PLP-Promotors identifiziert werden. Unter der Kontrolle des humanen GFAP-Promotors war die Identifizierung von vier Linien mit Expression des NCre-Fragments und einer Linie mit Expression des CCre-Fragments möglich.

Tabelle 7 Benennung der neuen transgenen Mauslinien mit Cre-Komplementierung

Promotor	Fragment	Linie	Bezeichnung
PLP	CCre	K	PLP-CCre(K)
PLP	CCre	Rt	PLP-CCre(R)
PLP	NCre	A	PLP-NCre(A)
PLP	NCre	C	PLP-NCre(C)
PLP	NCre	D	PLP-NCre(D)
GFAP	CCre	F	GFAP-CCre(F)
GFAP	NCre	T	GFAP-NCre(T)
GFAP	NCre	V	GFAP-NCre(V)
GFAP	NCre	W	GFAP-NCre(W)

Doppelt-transgene Linien, die die Cre-Fragmente unter dem gleichen Promotor kontrollieren werden bezeichnet als: PLP-CCre(K)/NCre(A), was einer Verpaarung der Linien PLP-CCre(K) x PLP-NCre(A) entspricht. Doppelt-transgene Linien, die die Cre-Fragmente unter der Kontrolle unterschiedlicher Promotoren exprimieren, werden als GFAP-NCre(T)/PLP-CCre(K), was einer Verpaarung der Linien GFAP-NCre(T) x PLP-CCre(K) entspricht, bezeichnet.

4.3.2. Immunhistochemische Analyse der PLP-Promotor kontrollierten Cre-Komplementierung

Bevor die Differenzierung der aktivierten Gliazellen (AO-Zellen) durch Cre-Komplementierung in den neuen transgenen Mausmodellen untersucht werden konnte, wurden zunächst PLP-NCre/CCre-doppelt transgene Tiere auf erfolgreiche Cre-Komplementierung hin überprüft.

Der PLP-Promotor zeigt eine sehr geringe Variabilität in transgenen Expressionsmustern (Fuss et al., 2000; Mallon et al., 2002; Hirrlinger, Scheller et al., 2005). Es ist daher zu erwarten, dass in einem hohen Prozentsatz von Oligodendrocyten N- und C-terminales Cre-Fragmente gleichzeitig exprimiert werden. Bei erfolgreicher Komplementierung der beiden Cre-Fragemente sollte dies an einer hohen und ausgedehnten EYFP-Reporter-Expression erkennbar sein.

Durch eine Western Blot-Analyse konnten drei Tiere mit einer Expression des NCre-Fragments (Linien: PLP-NCre(A, C, und D) und zwei Tiere mit einer Expression des CCre-Fragments (Linien: PLP-CCre(K/R) identifiziert werden (genauere Auswertung siehe Anhang I Abschnitt 8.2).

Zur Analyse der PLP-Cre-Komplementierung wurden die Kombinationen der Linien PLP-NCre(A) und PLP-CCre(K) sowie PLP-NCre(D) und PLP-CCre(R) verwendet. Die Tiere wurden untereinander und zusammen mit dem Reporter TgH(ROSA26-loxP-stop-loxP-EYFP)$_{ROSY}$ verpaart, der vereinfacht von hier an als ROSY bezeichnet wird (Srinivas et al., 2001). Dieser Reporter trägt vor dem EYFP ein Stopcodon, das durch zwei *loxP*-Sequenzen flankiert ist. Die Expression des Reporters steht unter der Kontrolle des ROSA26 Promotors (Knock-In). Ist in Zellen die Cre-Rekombinase aktiv, wird das gefloxte Stop-Codon ausgeschnitten und EYFP exprimiert. Die EYFP-Expression nach Rekombination in jungen und adulten Mäusen unter der Kontrolle des ROSA26-Promotors ist für eine Fluoreszenzmessung des EYFP zu schwach und muss daher unter Nutzung eines polyklonalen GFP-Antikörpers, der auch die EYFP-Variante erkennt, verstärkt werden. Daher wurden die Tiere, die sowohl CCre- als auch NCre unter dem PLP-Promotor sowie den ROSY-Reporter exprimierten immunhistochemisch analysiert, Verwendet hierfür wurden neben dem polyklonalen GFP-Antikörper auch zelltypspezifischen Marker wie GFAP und S100β für Astrocyten, CC1 und PLP für Oligodendrocyten, NeuN für neuronale Zellen und NG2 für reife NG2-Zellen bzw. oligodendrogliale Vorläuferzellen.

In den mehrfach-transgenen Tieren fand eine nachweisbare DNA-Rekombination in allen Bereichen des Gehirns in Oligodendrocyten aber auch Astrocyten und Neuronen statt. In der Abb. 15A-I ist exemplarisch die Expression in der Linie PLP-NCre(A) und PLP-CCre(K) für drei verschiedene Hirnregionen (Kortex (ctx), Corpus Callosum (cc) und Hippocampus (CA3) mit drei neuralen Markern (S100β, CC1 und NeuN) gezeigt.

Zum Vergleich ist die Linie PLP-NCre(D) und PLP-CCre(R) in der Abb. 15J-R aufgeführt. Hier werden exemplarisch die Regionen Hippocampus (CA1/HC), Kortex (ctx) und Corpus Callosum (cc) mit den neuralen Markern GFAP, PLP und NeuN gezeigt. In beiden zu vergleichenden Linien ist erkennbar, dass neben Oligodendrocyten auch Astrocyten und Neurone rekombiniert sind.

Um zu analysieren, ob die Expression in Astrocyten sowie Neuronen der endogenen Aktivität des PLP-Promotors in Kombination mit der Cre-Komplementierung entspricht wurde die Expression der neuen transgenen Mäuse mit Komplementierung der Cre-Rekombinase mit der Expression einer PLP-Cre-Maus verglichen (TgN(mPLP-Cre) = PLP-Cre(F)) (Delaunay et al., 2008). Hier wird das komplette Enzym unter der Kontrolle desselben PLP-Promotors exprimiert. In dieser Maus sind ebenfalls in allen untersuchen Hirnregionen (exemplarisch gezeigt in der weißen Substanz des Cerebellums, dem Corpus Callosum und dem Hippocampus (CA1) mit den zelltyp-spezifischen Markern S100β, CC1 und NeuN, siehe Abb. 16) Neurone und Astrocyten neben Oligodendrocyten rekombiniert.

Um das Ausmaß der Rekombination in verschiedenen Hirnregionen in den PLP-Cre-Komplementierungsmäusen mit einer einfachen PLP-Cre-Maus zu vergleichen, ist im Anhang sind in der Abb. 32 Kortex (ctx), Striatum (str), Cerebellum (cb), die weiße Substanz des Cerebellums (cb wm), Corpus Callosum (cc) und Hippocampus (CA1) gegenübergestellt (einfache EYFP-Immunhistochemie). Dabei ist erkennbar, dass die Rekombination in allen Mäusen sehr vergleichbar ist. Meist ist sie in der PLP-Cre-Maus im Vergleich zu den PLP-Cre-Komplementierungstieren etwas höher. Auch die Zelltypen der rekombinierten Zellen (Oligodendrocyten, Astrocyten (auch Bergmann Glia), Neurone und NG2-Glia) sind identisch. In den beiden Linien PLP-NCre(A)/CCre(K) und PLP-NCre(D)/CCre(R) ist keine voneinander distinkte Expression erkennbar.

Es konnten in den untersuchten PLP-Cre-Linien zu keinem Zeitpunkt rekombinierte Zellen identifiziert werden, wenn nur eine der beiden Cre-Fragmente unter dem PLP-Promotor exprimiert wurde (Daten nicht gezeigt).

Diese Ergebnisse zeigen, dass sich *in vivo* C- und N-terminale Fragmente der Cre-Rekombinase komplementieren und eine funktionale Cre-Enzymaktivität entwickeln. Unter der Kontrolle des murinen PLP-Promotors wurde Rekombination in den vorhergesagten Zelltypen nachgewiesen. Die Expression in nicht oligodendroglialen Zellen wie Astrocyten und Neuronen ist auf die frühe transiente Expression des PLP-Gens in Vorläuferzellen während der embryonalen Entwicklung zurückzuführen. Zudem sind keine Aktivitätsunterschiede zur intakten Cre-Rekombinase erkennbar.

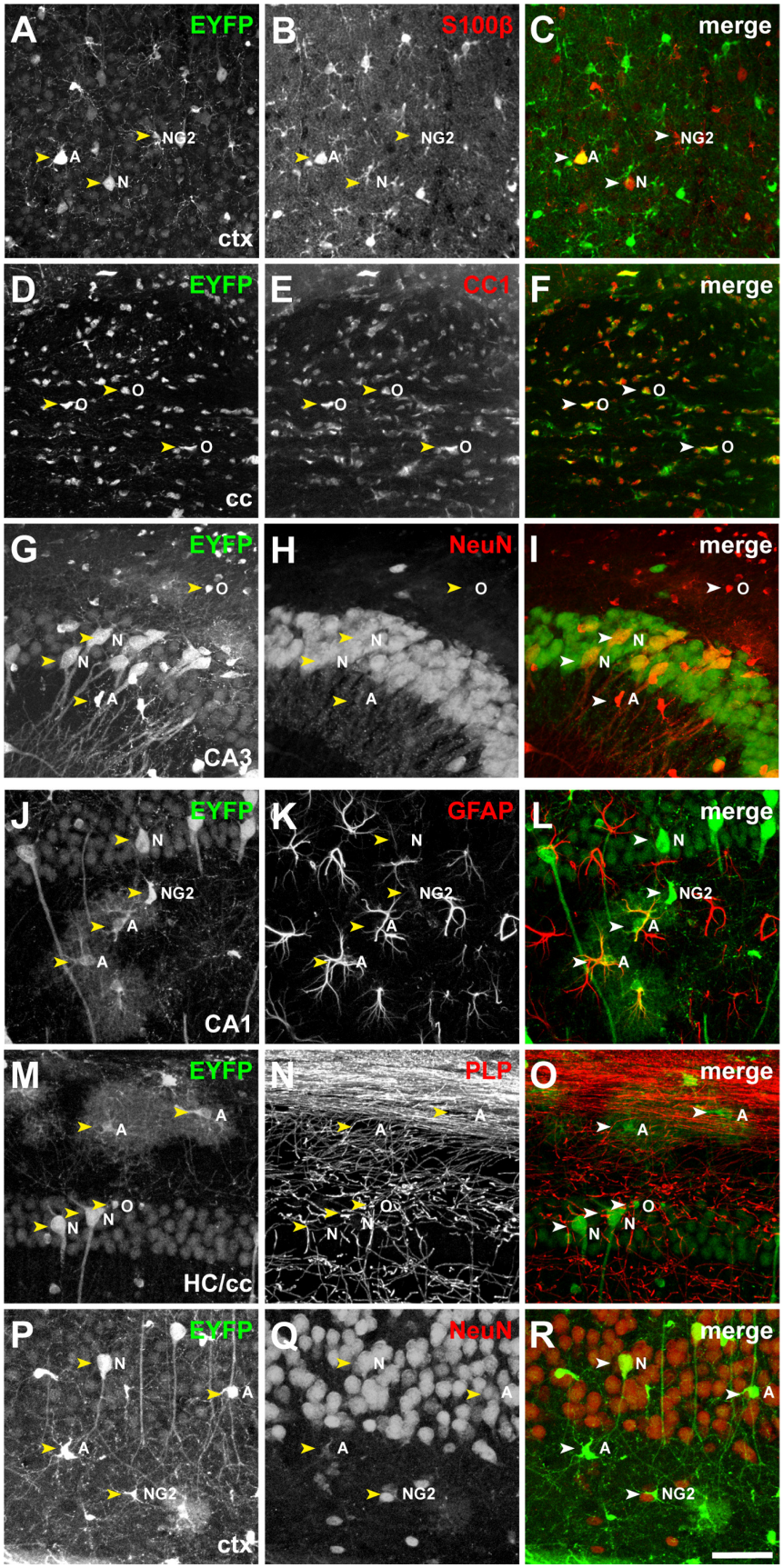

A
EYFP
NG2
A
N
ctx
B
S100β
NG2
A
N
C
merge
NG2
A
N
D
EYFP
O
O
O
cc
E
CC1
O
O
O
F
merge
O
O
O
G
EYFP
O
N
N
A
CA3
H
NeuN
O
N
N
A
I
merge
O
N
N
A
J
EYFP
N
NG2
A
A
CA1
K
GFAP
N
NG2
A
A
L
merge
N
NG2
A
A
M
EYFP
A
A
O
N
N
HC/cc
N
PLP
A
A
O
N
N
O
merge
A
A
O
N
N
P
EYFP
N
A
A
NG2
ctx
Q
NeuN
N
A
A
NG2
R
merge
N
A
A
NG2

Abb. 15 Funktionelle *in vivo* Komplementierung und DNA-Rekombination in PLP-C/N-Cre-Mäusen

Hier ist die Rekombination nach Komplementierung durch die Reporterexpression in zwei Linien (PLP-NCre(A)/CCre(K) (A-I) und PLP-NCre(D)/CCre(R) (J-R)) in verschiedenen Hirnregionen gezeigt. A-C Kortex: rekombinierte Astrocyten (S100β positiv), NG2-Glia und Neurone. D-F Corpus Callosum: rekombinierte Oligodendrocyten (CC1-positiv). G-I Hippocampus: Neurone (NeuN), Astrocyten, Oligodendrocyten. J-L Hippocampus (CA1): rekombinierte Astrocyten (GFAP-positiv), Pyramidenneuronen. M-O Hippocampus/Corpus Callosum: rekombinierte Oligodendrocyten (PLP), Neurone und Astrocyten. M/P rekombinierte Neurone (NeuN), Astrocyten und NG2-Zellen. Der Balken entspricht 50 µm und gilt für alle Bildausschnitte. A: Astrocyt; N: Neuron; NG2: NG2-Glia; O:Oligodendrocyt; ctx: Kortex; cc:Corpus Callosum; CA1/3: CA1 bzw. CA3-Region des Hippocampus; HC/cc: Übergang Hippocampus/Corpus Callosum.

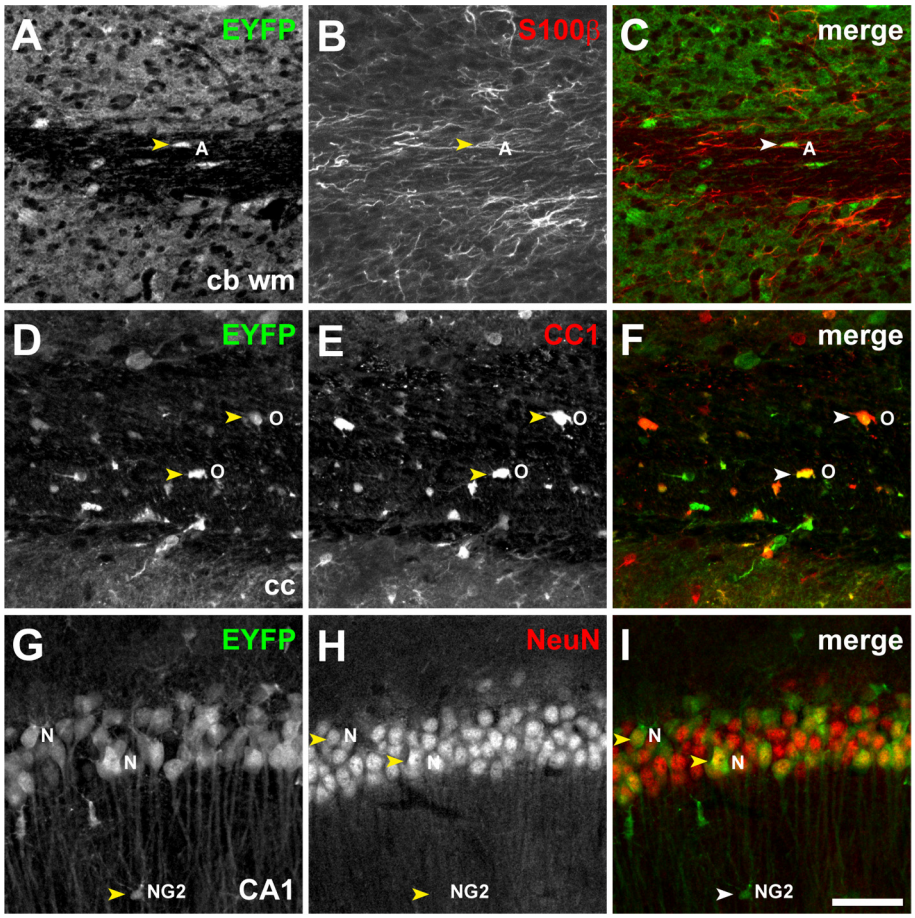


Abb. 16 DNA-Rekombination in einer PLP-Cre-Maus

Die Rekombination in Zellen bei Expression der intakten Cre-Rekombinase unter Kontrolle des PLP-Promotors in verschiedenen Hirnregionen ist hier dargestellt. A-C weiße Substanz des Cerebellums: rekombinierte Astrocyten (S100β). D-F Corpus Callosum: rekombinierte Oligodendrocyten (CC1). G-I Hippocampus: rekombinierte Neurone (NeuN), NG2-Zellen. Der Balken entspricht 50 µm und gilt für alle Bildausschnitte. A: Astrocyt; N: Neuron; O: Oligodendrocyt; cb wm: weiße Substanz des Cerebellums, cc: Corpus Callosum; CA1: CA1-Region des Hippocampus.

4.3.3. GFAP-Promotor kontrollierte Cre-Komplementierung

Ähnlich wie bei den PLP-CCre/NCre-Tieren wurden exprimierende GFAP-CCre/NCre-transgene Tiere auf funktionelle Rekombination untersucht.

Zur immunhistochemischen Analyse wurden die Linien GFAP-NCre(T/V und W) (per Western Blot bzw. IHC identifiziert) mit der Linie GFAP-CCre(F) (identifiziert mit Hilfe der IHC) verpaart. Weitere Angaben zur Identifizierung der einzelnen Linien sind im Anhang in Abschnitt 8.2 beschrieben.

Doppelt-transgene Tiere mit dem ROSY-Reporter wurden immunhistochemisch untersucht. In der Linie mit der Kombination GFAP-CCre(F)/NCre(V) konnten EYFP-positive Zellen identifiziert werden. In der Abb. 17 ist die Rekombination exemplarisch in vier verschiedenen Regionen in Doppelfärbungen mit neuralen Markerproteinen gezeigt. Deutlich ist erkennbar, dass bei diesen Tieren mit GFAP-Cre-Komplementierung Rekombination in Astrocyten (17 A-C, S100β-positive Bergmann Glia), Oligodendrocyten (17 D-F, CC1-positive Zellen), Neuronen (17 G-I, NeuN-Immunität) und NG2-Zellen (17 J-K, NG2-Immunreaktivität) erfolgte. Es konnten zusammenfassend im Bereich des Bulbus Olfactorius, im Kortex, im Thalamus, dem Hypothalamus, dem Corpus Callosum, dem Hippocampus und dem Cerebellum rekombinierte Astrocyten, Oligodendrocyten, NG2-Glia und Neurone identifiziert werden (Abb. 33 siehe Anhang I).

Ähnlich wie unter Kontrolle des PLP-Promotors konnte auch bei Expression der Cre-Fragmente unter dem GFAP-Promotor in Linien mit nur einem Fragment in keiner der Hirnregionen Rekombination detektiert werden.

Der humane GFAP-Promotor ist in der embryonalen radialen Glia aktiv. Da diese Zellen multipotente Zellen sind, wurde eine funktionelle Cre-Komplementierung in GFAP-CCre/NCre-Mäusen neben Astrocyten auch in Neuronen, Oligodendrocyten und NG2-Glia nachgewiesen.

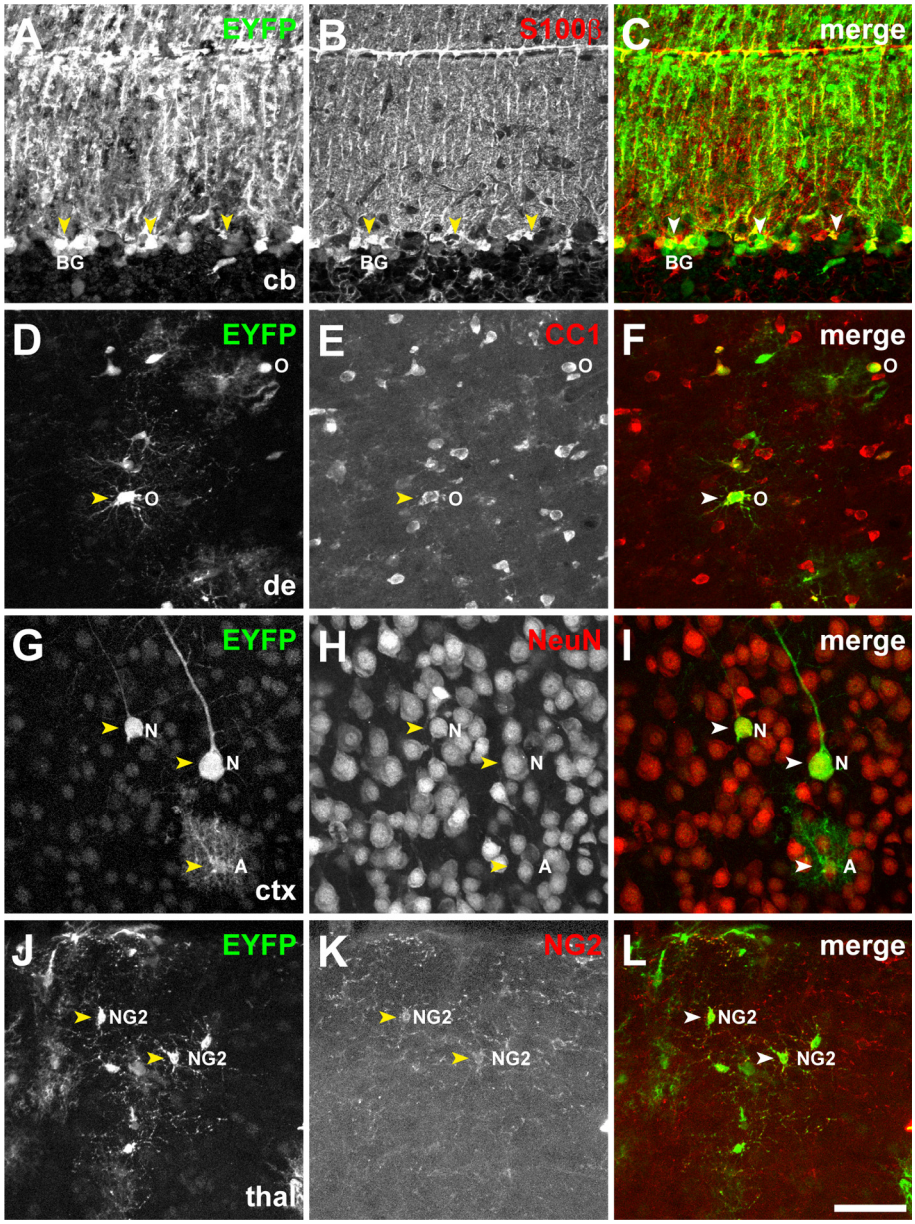


Abb. 17 ***In vivo*** **GFAP-Cre-Komplementierung (GFAP-CCre(F)/NCre(V))**

Funktionelle Rekombination in einer Maus mit Cre-Komplementierung unter dem GFAP-Promotor kann in verschiedenen Hirnregionen detektiert werden. A-C: Cerebellum: Bergmann Glia (S100β), D-F Mittelhirn: Oligodendrocyten (CC1), G-I Kortex: Neurone (NeuN), Astrocyten (Morphologie). J-K Thalamus: NG2-Zellen (NG2). Der Balken entspricht 50 µm und gilt für alle Bildausschnitte. cb: Cerebellum; de: Mittelhirn; ctx: Kortex; thal: Thalamus; A: Astrocyt; BG: Bergmann Glia; N: Neuron; NG2: NG2-Glia O: Oligodendrocyt.

4.4. *In vivo* Koinzidenzdetektion durch Cre-Komplementierung

4.4.1. Analyse der Rekombination in doppelt-transgenen Tieren mit Expression der Cre-Fragmente unter verschiedenen Promotoren

Um ein experimentelles Modell zur Differenzierung von aktivierten Gliazellen (AO-Zellen) zu erhalten, wurden Mauslinien, die jeweils das C- oder N-terminale Fragment der Cre-Rekombinase unter den glialen Promotoren GFAP und PLP exprimierten, untereinander verpaart. Die koinzidente Aktivität der beiden glialen Promotoren wurde in transgenen Tieren im Alter von vier Wochen immunhistochemisch untersucht.

Die zur Herstellung dieser transgenen Mäuse gewählten Konstrukte gehen in ihrem Aufbau auf die beiden Plasmide pGFAP-EGFP und pPLP-DsRed zurück, die als Ggrundlage für die transgenen fluoreszenten Mäuse (GFAP-EGFP/PLP-DsRed1) dienten. Zunächst wurde das Ausmaß einer intrinsischen entwicklungsbedingten Ko-Aktivität der beiden glialen Promotoren in doppelt-transgenen Mäusen evaluiert.

Bereits während der Entwicklung konnte die gleichzeitige Aktivierung von GFAP- und PLP-Promotor nachgewiesen werden. Alle untersuchten Linien mit möglicher Komplementierung der Cre-Fragmente zeigten Rekombination in verschiedenen Hirnregionen mit einer starken Variabilität der Rekombinationshäufigkeit in den verschiedenen GFAP-PLP-doppelt-transgenen Linien. Von einer doppelt-transgenen Linie mit wenigen EYFP-Reporter exprimierenden Zellen (GFAP-NCre(W)/PLP-CCre(K)) bis zu einer doppelt-transgenen Linie mit sehr vielen rekombinierten Zellen (GFAP-NCre(V)/PLP-CCre(K)) gab es auch Kombinationen mit mittlerer Rekombinationshäufigkeit. Ein Vergleich der relativen Häufigkeit rekombinierter Zelltypen in den unterschiedlichen Linien, zeigte auch hier eine starke Abweichung in den einzelnen Linien. Neben glialen Zellen (Astrocyten, Oligodendrocyten und NG2-Glia) sind teilweise auch Neurone rekombiniert.

Zellen mit Rekombination wurden in Bezug auf ihren Zelltyp untersucht, in dem immunhistochemische Doppelfärbungen mit diversen neuralen Markerproteinen durchgeführt wurden. Weiterhin wurde das Ausmaß der Rekombination unter entwicklungsspezifischen Aspekten analysiert. Hierfür wurden immunhistochemische Färbungen zu verschiedenen Alterstufen der Entwicklung durchgeführt. Verschiedene Hirnareale wurden ausgewertet. Die Tabelle 8 gibt eine Übersicht über die rekombierten Zellen mit Rekombination in verschiedenen ausgewählten Hirnregionen.

In den Abbildungen 18-22 wird die Rekombination der Linien GFAP-CCre(F)/PLP-NCre(D), GFAP-NCre(T)/PLP-CCre(K), GFAP-NCre(T)/PLP-CCre(R), GFAP-NCre(V)/PLP-CCre(K) und GFAP-NCre(W)/PLP-CCre(K) in vier Hirnregionen mit vier neuralen Markern gezeigt. Die Zahl der EYFP-Reporter exprimierenden Zellen in diesen fünf

Kombinationen variierte stark (Tabelle 7). In vier untersuchten Linien (Ausnahme: GFAP-NCre(V)/PLP-CCre(K)) waren fast nur astrogliale Zellen rekombiniert (~90-95 % aller rekombinierten Zellen), bei allen fünf oben genannten Linien konnten auch rekombinierte NG2-Zellen identifiziert werden (4-9 %). In der Linie GFAP-NCre(W)/-PLP-CCre(K) wurden in der weißen Substanz des Cerebellums zusätzlich vereinzelt Oligodendrocyten (<1 %) rekombiniert (siehe Abb. 21) und in der Linie GFAP-CCre(F)/-PLP-NCre(D) (ohne Abb.) einige wenige Neurone (<1 %) im Bereich des Thalamus/-Mittelhirns. In der Linie GFAP-NCre(V)/PLP-CCre(K) konnten in Kortex und Hippocampus rekombinierte Pyramidenneurone detektiert werden (siehe Abb. 22). In keiner der analysierten Linien waren rekombinierte Mikrogliazellen zu finden.

Tabelle 8 Rekombination nach *in vivo* Koinzidentetektion in den neuen transgenen Mauslinien mit Cre-Komplementierung

Mauslinie	Astroglia		NG2-Glia		Oligodendroglia		Neurone	
	Ctx:	+	ctx:	-	ctx:	-	ctx:	-
GFAP-CCre(F)/	3. Vent:	+	3. Vent:	+	3. Vent:	-	3. Vent:	-
PLP-NCre(D)	HC:	+	HC:	+	HC:	-	HC:	-
	thal/hypothal:	++	thal/hypothal:	++	thal/hypothal:	-	thal/hypothal:	+
	cb:	++	cb:	+	cb:	-	cb:	-
	ctx:	+	ctx:	-	ctx:	-	ctx:	-
GFAP-NCre(T)/	3. Vent:	++	3. Vent:	+	3. Vent:	-	3. Vent:	-
PLP-CCre(K)	HC:	++	HC:	+	HC:	-	HC:	-
	thal/hypothal:	++	thal/hypothal:	++	thal/hypothal:	-	thal/hypothal:	-
	cb:	++	cb:	+	cb:	-	cb:	-
	ctx:	+	ctx:	-	ctx:	-	ctx:	-
GFAP-NCre(T)/	3. Vent:	++	3. Vent:	++	3. Vent:	-	3. Vent:	-
PLP-CCreR)	HC:	+	HC:	+	HC:	-	HC:	-
	thal/hypothal:	+++	thal/hypothal:	++	thal/hypothal:	-	thal/hypothal:	-
	cb:	++	cb:	+	cb:	-	cb:	-
	ctx:	++	ctx:	+	ctx:	-	ctx:	++
GFAP-NCre(V)/	3. Vent:	+	3. Vent:	+	3. Vent:	-	3. Vent:	-
PLP-CCre(K)	HC:	+++	HC:	+	HC:	-	HC:	++
	thal/hypothal:	+++	thal/hypothal:	+++	thal/hypothal:	-	thal/hypothal:	-
	cb:	+++	cb:	+	cb:	-	cb:	-
	ctx:	+	ctx:	-	ctx:	-	ctx:	-
GFAP-NCre(T)/	3. Vent:	+	3. Vent:	-	3. Vent:	-	3. Vent:	-
PLP-CCre(W)	HC:	+	HC:	-	HC:	-	HC:	-
	thal/hypothal:	+	thal/hypothal:	+	thal/hypothal:	-	thal/hypothal:	-
	cb:	+	cb:	-	cb:	+	cb:	-

Vewendete Abkürzungen der Tabelle: ctx: Kortex; 3. Vent.: 3. dorsaler Ventrikel; HC: Hippocampus; thal: Thalamus; hypothal: Hypothalamus, cb: Cerebellum, -: keine Rekombination, +: geringe Rekombination; ++: mittlere Rekombination; +++: sehr starke Rekombination

Verglich man die Hirnregionen, fand sich in allen fünf Kombinationen die stärkste Rekombinationshäufigkeit in ähnlichen Arealen: dem Thalamus, dem Hypothalamus, der Region um den dritten Ventrikel und dem Cerebellum. In letzterem wiesen Bergmann Glia in allen Linien und teilweise auch Astrocyten der weißen Substanz Rekombination auf (siehe Abb. 18-22). Zudem waren rekombinierte Astrocyten im Striatum, dem Bulbus Olfactorius, dem Hippocampus, im Mittelhirn sowie dem Hirnstamm identifizierbar. Eine Ausnahme bildete auch hier die Linie GFAP-NCre(V)/-PLP-CCre(K). Die Tiere zeigten eine starke Rekombination in Kortex und Hippocampus und nur in dieser Linie konnten rekombinierte Zellen im Corpus Callosum identifiziert werden. In den vier weiteren Kombinationen konnte keine Rekombination im Corpus Callosum gezeigt werden (Daten nicht gezeigt).

Die umfangreichste Rekombination in Bezug auf Zellzahl und Zelltypen wurde in der doppelt-transgenen Linie GFAP-NCre(V)/PLP-CCre(K) festgestellt. Hier waren neben vielen Astrocyten und NG2-Glia auch eine große Anzahl von Oligodendrocyten und Neuronen markiert. Projektionsneurone mit Rekombination ließen sich im Bulbus Olfactorius, im Kortex und im Gyrus Dentatus identifizieren. In allen untersuchten Hirnarealen wurden Astrocyten mit Rekombination gefunden. Die Rekombination von Oligodendrocyten konnte in der weißen Substanz gezeigt werden. Zudem gab es auch Rekombination in NG2-Zellen. Die Rekombination ist in der Abb. 37 für verschiedene Hirnareale gezeigt. Die Linie GFAP-NCre(V)/PLP-CCre(K) unterscheidet sich auch in den rekombinierten Hirnregionen, von den anderen doppelt-transgenen Linien. Nur in dieser Kombination konnte z.B. die Rekombination im Corpus Callosum gezeigt werden.

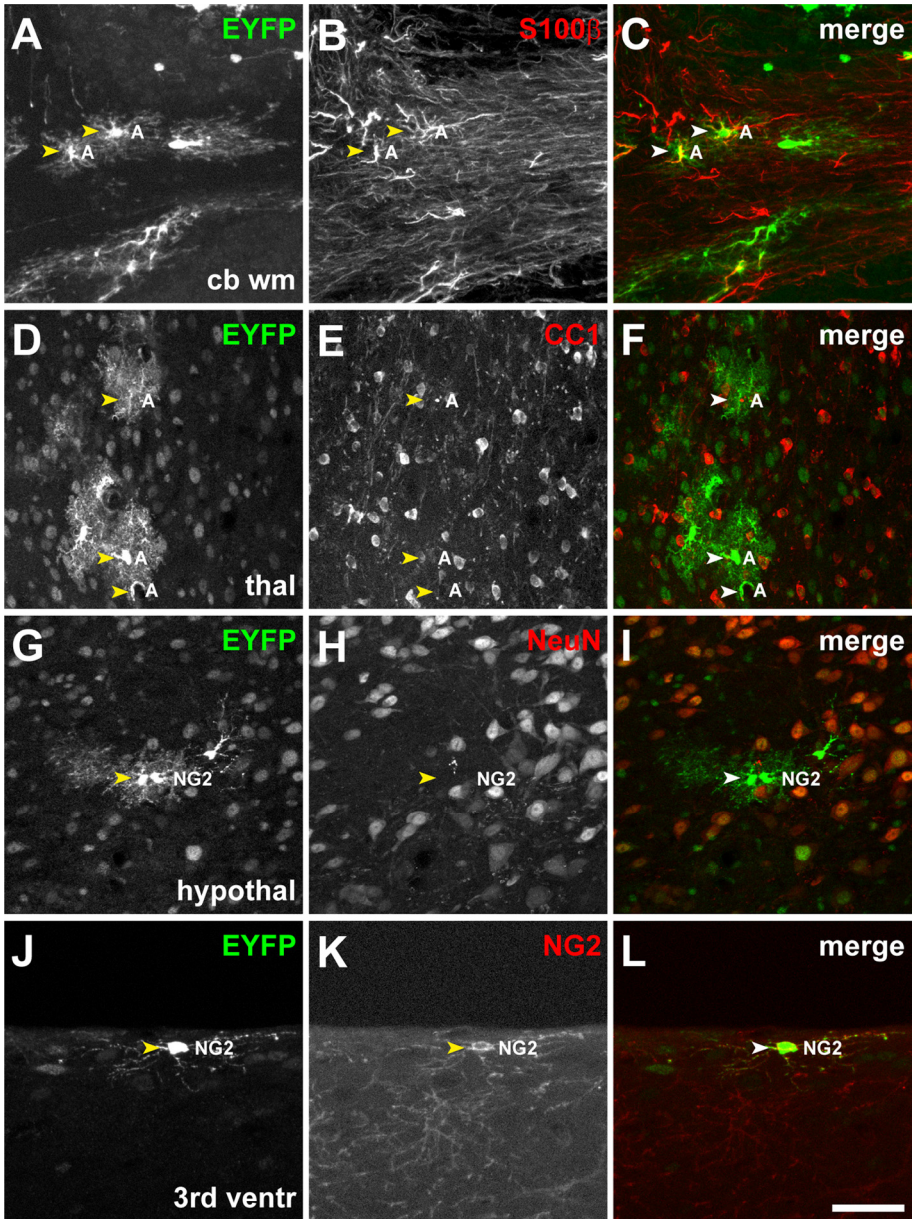


Abb. 18 ***In vivo*** **Koinzidenzdetektion der Aktivität von GFAP- und PLP-Promotor (GFAP-CCre(F)/PLP-NCre(D))**

In dieser Abbildung sind rekombinierte Zellen mit einem GFP-Antikörper gefärbt und mit neuralen Markern identifiziert. Es konnten Astrocyten (weiße Substanz des Cerebellums, S100β-positiv, A-C, Thalamus: D-F, morphologische Analyse) identifiziert werden. Es gab keine Rekombination in CC1-positiven Oligodendrocyten (Thalamus D-F) und NeuN-positiven Neuronen (Hypothalamus, G-I). Aber es konnten rekombinierte NG2-Zellen (exemplarisch gezeigt für den 3. dorsalen Ventrikel, J-L und morphologische Identifizierung Hypothalamus G-I) bestimmt werden. Der Balken entspricht 50 µm und gilt für alle Bildausschnitte. cb wm: weiße Substanz des Cerebellums; thal: Thalamus; hypothal: Hypothalamus; 3rd ventr: 3. dorsaler Ventrikel; A: Astrocyt; NG2: NG2-Glia.

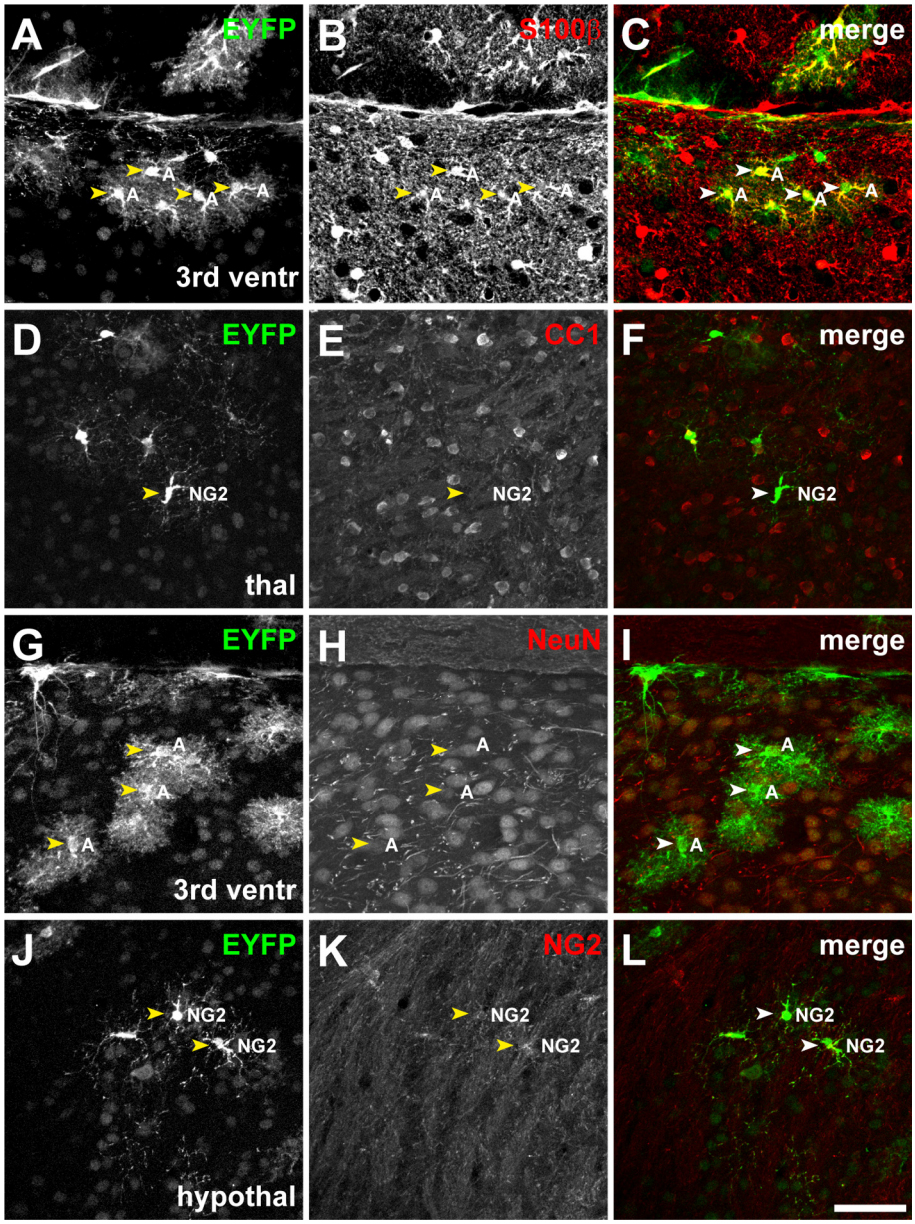


Abb. 19 ***In vivo*** **Koinzidenzdetektion der Aktivität von GFAP- und PLP-Promotor (GFAP-NCre(T)/PLP-CCre(K))**

Die Abbildung zeigt die immunhisochemische Anaylse von Zellen mit Rekombination in Hinsicht auf die Expressin neuraler Marker. Es konnten S100β-positive Astrocyten in vielen untersuchten Hirnregionen (exemplarisch für den dritten dorsalen Ventrikel in A-C) identifiziert werden. Es konnten keine CC1-positiven Oligodendrocyten (Corpus Callosum, D-F) und NeuN-positiven Neurone (Thalamus; G-I) identifiziert werden. Aber es konnten rekombinierte NG2-Zellen (J-L) bestimmt werden. Bei den rekombinierten Zellen in der Abb. G kann aufgrund der Morphologie auf Astrocyten geschlossen werden, in der Abb. D auf NG2-positive Glia. Der Balken entspricht 50 µm und gilt für alle Bildausschnitte. 3rd ventr: 3. dorsaler Ventrikel; cc: Corpus Callosum; thal: Thalamus; hypothal: Hypothalamus; A: Astrocyt; NG2: NG2-Glia.

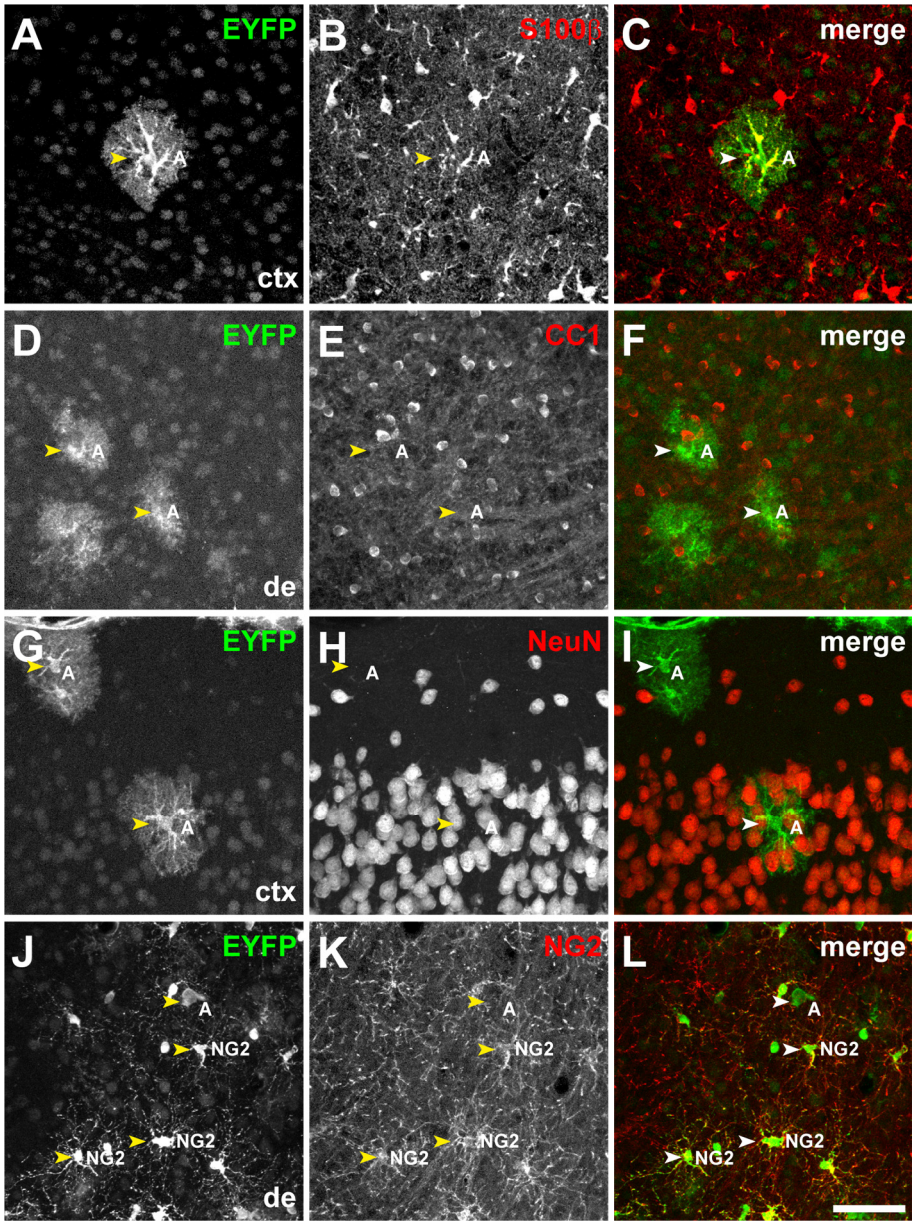


Abb. 20 ***In vivo*** **Koinzidenzdetektion der Aktivität von GFAP- und PLP-Promotor (GFAP-NCre(T)/PLP-CCre(R))**

Zellen mit Rekombination wurden mit Hilfe neuraler Marker immunhistochemisch analysiert. Es können S100β-positive Astrocyten im Kortex (A-C) identifiziert werden. Morphologisch liessen sich auch in anderen Hirnregionen wie dem Mittelhirn (D-F) und dem Corpus Callosum (J-L) weitere rekombinierte Astrocyten identifizieren. Es konnte keine Rekombination in CC1-positiven Oligodendrocyten (Mittelhirn, D-F) und NeuN-positiven Neuronen (Kortex, G-I) festgestellt werden. Aber es konnten rekombinierte NG2-Zellen (Mittelhirn, J-L) identifiziert werden. Der Balken entspricht 50 µm und gilt für alle Bildausschnitte. ctx: Kortex; de: Mittelhirn; thal: Thalamus; hypothal: Hypothalamus; 3rd ventr: 3. dorsaler Ventrikel; A: Astrocyt; NG2: NG2-Glia.

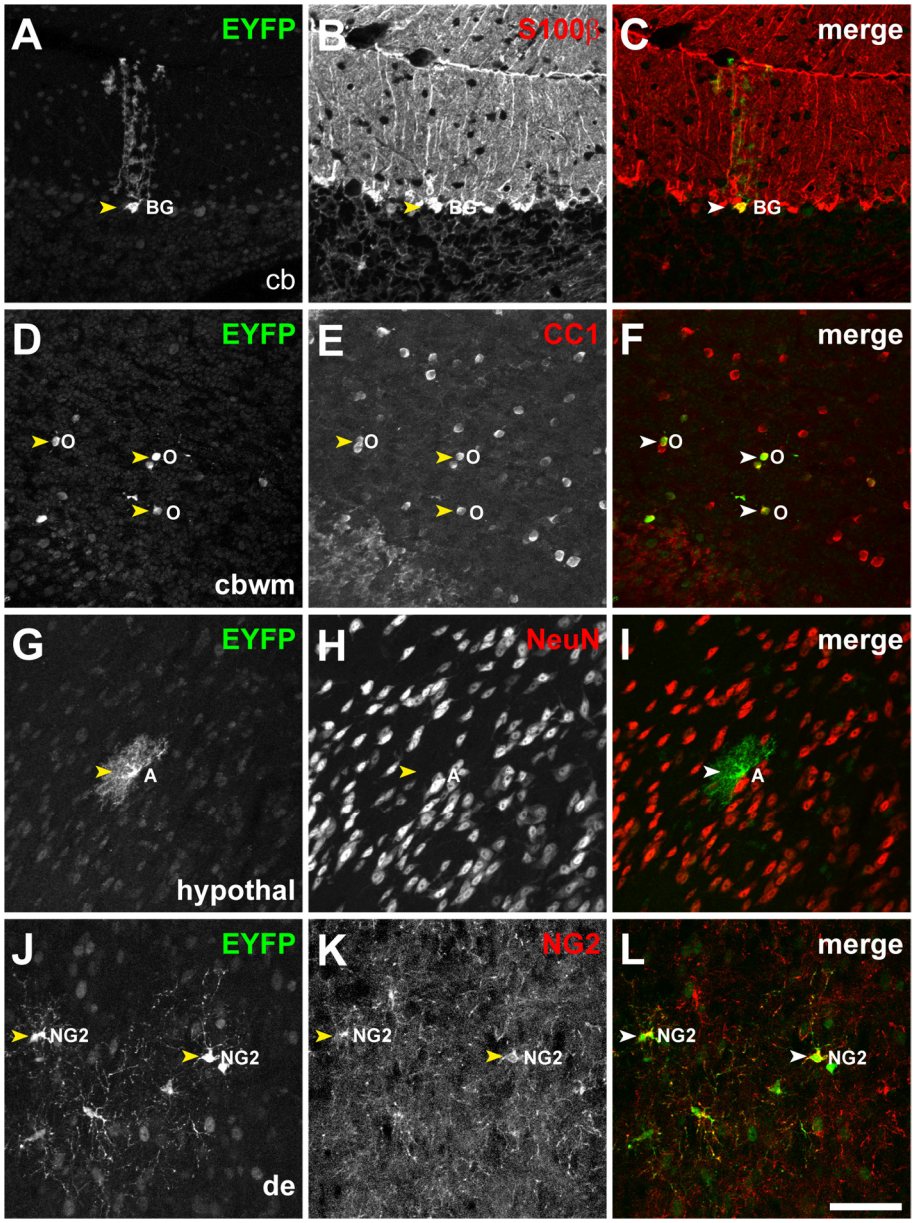


Abb. 21 ***In vivo*** **Koinzidenzdetektion der Aktivität von GFAP- und PLP-Promotor (GFAP-NCre(W)/PLP-CCre(K))**

In der Linie GFAP-NCre(W)/PLP-CCre(K) sind rekombinierte Zellen mit neuralen Markern charakterisiert. Es konnten Astrocyten (S100β-positive Bergmann Glia des Cerebellums, A-C) identifiziert werden. In der weißen Substanz des Cerebellums rekombinierten CC1-positive Oligodendrocyten (D-F). Es konnten in keiner der untersuchten Regionen NeuN-positive Neurone (Kortex, G-I) gefunden werden. Aber auch hier konnten rekombinierte NG2-Zellen (Thalamus, J-L) identifiziert werden. Die rekombinierte Zelle in G kann aufgrund ihrer Morphologie den Astroglia zugeordnet werden. Der Balken entspricht 50 µm und gilt für alle Bildausschnitte. cb:Cerebellum; cb wm:weiße Substanz des Cerebellums; hypothal: Hypothalamus; de: Mittelhirn A: Astrocyt; BG: Bergmann Glia; NG2: NG2-Glia; O: Oligodendrocyt.

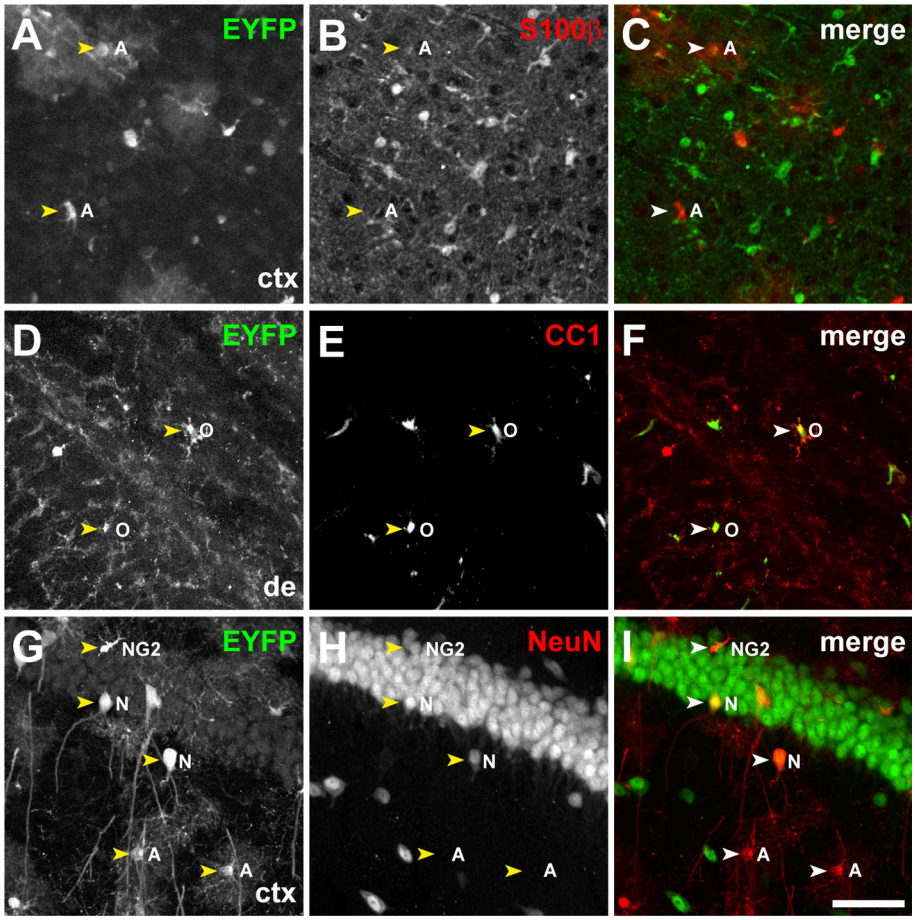


Abb. 22 ***In vivo*** **Koinzidenzdetektion der Aktivität von GFAP- und PLP-Promotor (GFAP-NCre(V)/PLP-CCre(K))**

In der Linie GFAP-NCre(V)/PLP-CCre(K) sind rekombinierte Astrocyten (S100β-positiv, A-C) im Kortex (ctx) markiert.Es ist möglich im Mittelhirn (de) CC1-positive Oligodendrocyten (D-F) zu identifizieren. Es konnten im Kortex NeuN-positive Neurone (ctx, G-I), Astrocyten und NG2-Glia detektiert werden. Der Balken entspricht 50 µm und gilt für alle Bildausschnitte. ctx: Kortex; de: Mittelhirn; A: Astrocyt; N: Neuron; NG2: NG2-Glia O: Oligodendrocyt.

Diese Daten zeigen, dass nicht alle Linien geeignet sind um die Differenzierung der AO-Zellen zu verfolgen. Die Linie GFAP-NCre(V)/CCre(K) hat im Kortex durch die entwicklungsbedingte Rekombination sehr viele EYFP-Reporter positive Zellen, so dass die Identifizierung der aktivierten AO-Zellen schwierig ist. Das zusätzliche Auftreten von Zellen mit Rekombination (aus aktivierten AO-Zellen) ist schwer nachzuweisen.

4.4.2. Analyse der Rekombination im Verlauf der Embryonalentwicklung

Um den Zeitpunkt der Rekombination in den Zellen der GFAP/PLP-Cre-Komplementierung zu definieren, wurden Embryonen der Linie GFAP-NCre(T)/PLP-CCre(K) präpariert, fixiert und gefärbt. Dabei wurden folgende Altersstufen miteinander verglichen: E12.5, E15.5, E18.5, P2 und das adulte Stadium (8 Wochen). Vor E18.5 konnten Zellen mit detektierbarer Rekombination anhand der Markerexpression in den untersuchten Hirnregionen nicht identifiziert werden (Daten nicht gezeigt). Ab E18.5 konnten rekombinierte Zellen in verschiedenen Hirnbereichen nachgewiesen werden. In der Abb. 23 sind Mittelhirn, 3. dorsaler Ventrikel, Hypothalamus und Cerebellum bei E18.5, P2 und in adultem Gewebe gezeigt. Die Zahl der rekombinierten Zellen nahm mit dem Alter zu. Dies gilt besonders für die Bergmann Glia im Cerebellum. Zum Teil ist in den Abbildungen zu sehen, dass Zellen mit enorm langen Fortsätzen rekombiniert sind, gezeigt in 23 B und G.

Besonders gut zeigt sich an der cerebellären Entwicklung, dass die Zahl der EYFP-Reporter positiven Zellen mit dem Alter zunimmt (Abb.: 23 J-L). Die Rekombination setzt früh in der Entwicklung ein und alle Tochter-Zellen der rekombinierten Zelle, geben ihre veränderte DNA an ihre Nachkommenschaft weiter. Diese Zellen liegen dann auch im adulten Tier vor.

Ein Marker, der für oligodendrogliale Vorläuferzellen verwendet wird und im adulten Stadium reife NG2-Glia markiert, ist das Proteoglycan NG2 (Diers-Fenger et al., 2001). Da in allen untersuchten Linien eine Rekombination in reifen NG2-Zellen (Nishiyama et al., 2005) nachgewiesen werden konnte, wurde analysiert, ab welchem Alter rekombinierte Zellen NG2-Immunreaktivität zeigen. Hierfür wurden Tiere der Linie GFAP-NCre(T)/PLP-CCre(K) im Alter von zwei Tagen untersucht. Zu diesem Zeitpunkt lassen sich in verschiedenen Hirnregionen rekombinierte Zellen identifizieren. In der Abb. 24A ist gezeigt, dass es in diesem Alter viele NG2-positive Zellen z.B. im Kortex gibt. In der Abb. 24B ist eine rekombinierte NG2-Gliazelle des Cerebellums dargestellt. In den Abb. 24C-H sind rekombinierte Zellen im Cerebellum (cb, C-E) und Hypothalamus (hypothal, F-H) gezeigt. Deutlich ist auch hier die hohe Zahl NG2-positiver Zellen erkennbar. Im Hypothalamus sind einige Blutgefäße markiert, da Pericyten ebenfalls NG2 exprimieren (Stallcup, 2002). Es konnten in den untersuchten Hirnregionen bei P2 keine NG2-positiven rekombinierten Zellen identifiziert werden. Im adulten Tier wurden rekombinierten NG2-Glia häufig in direktem Kontakt zu Astrocyten gefunden.

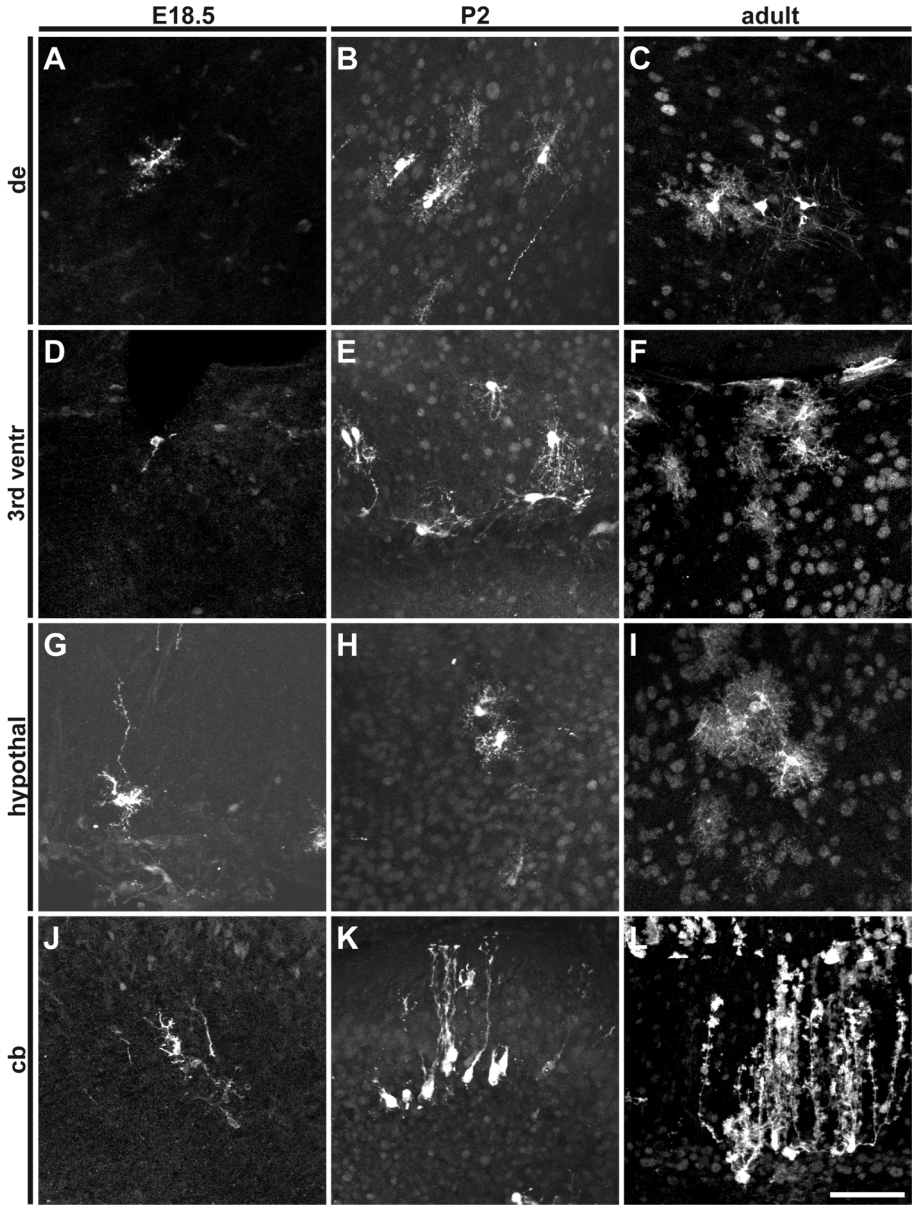


Abb. 23 Entwicklungsabhängige DNA-Rekombination der GFAP/PLP-Cre-Komplementierung

Der Verlauf der Rekombination während der Entwicklung des ZNS in der Linie GFAP-NCre(T)/PLP-CCre(K) wird für vier Hirnregionen gezeigt. A-C: Mittelhirn (de), D-F: dritter dorsaler Ventrikel (3rd ventr), G-I: Hypothalamus (hypothal), J-L: Cerebellum (cb). Diese Regionen wurden ausgewählt, da die Rekombination im adulten Tier hoch ist. Gezeigt werden drei verschiedenen Altersstufen, beginnend mit E18.5 (A, D, G und J), folgend mit P2 (B, E, H und K) und abschließend verglichen mit dem adulten Tier (C, F, I und L). Der Balken entspricht 50 µm und gilt für alle Bildausschnitte. de: Mittelhirn; 3rd ventr: 3. dorsaler Ventrikel; hypothal: Hypothalamus; cb: Cerebellum.

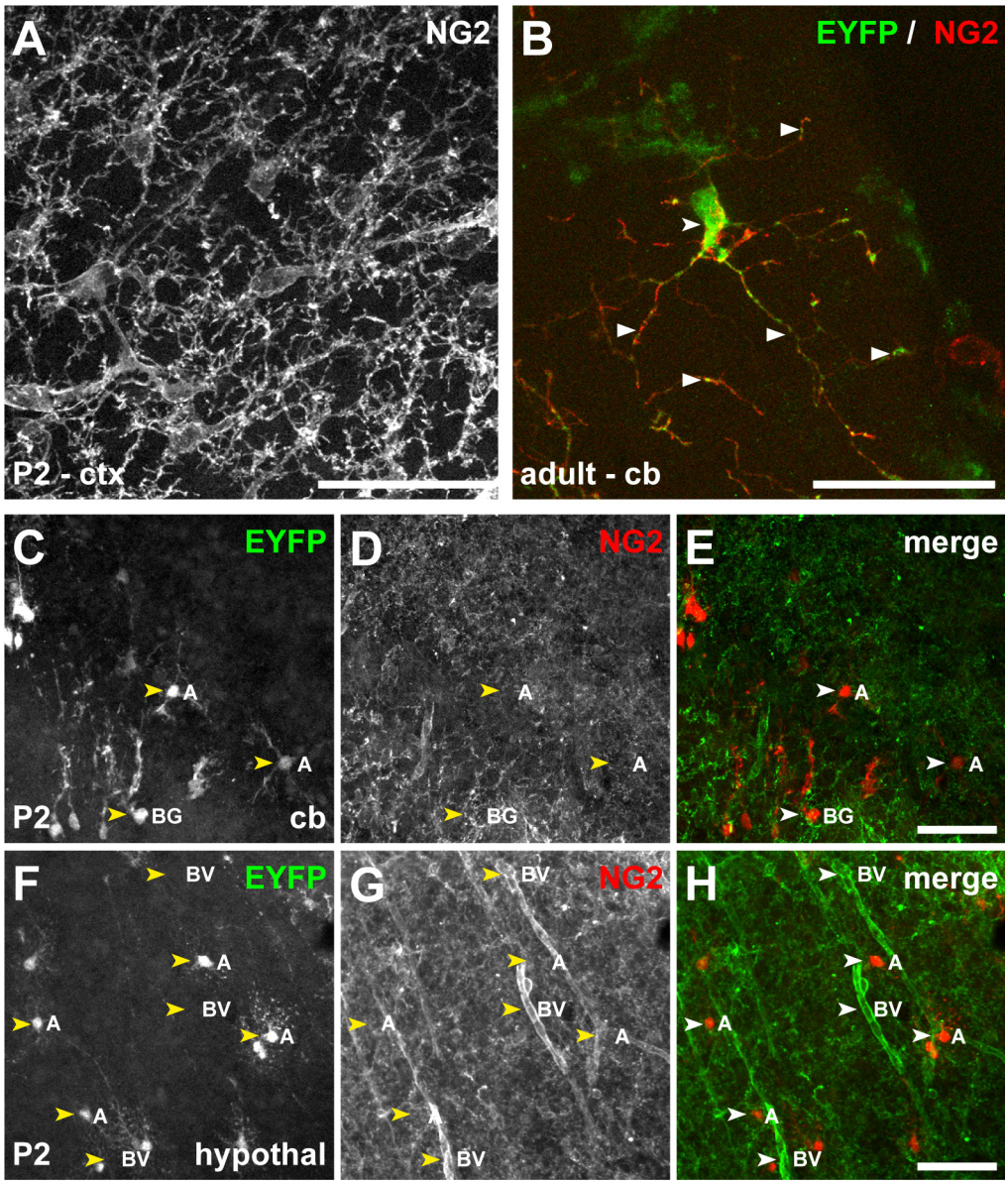


Abb. 24 NG2-Immunreaktivität nach GFAP-PLP-Komplementierung in verschiedenen Alterstufen

Hier ist die Rekomibnation während verschiedener Altersstufen in der Linie GFAP-NCre(T)/PLP-CCre(K) gezeigt. A: Immunreaktivität von NG2-positiven Zellen im Kortex bei P2. Man achte auf die hohe Zahl NG2-positiver Zellen. B: rekombinierte NG2-Gliazelle des Cerebellums in einem adultem Tier. Anhand der vielen feinen Fortsätze konnten NG2-Zellen leicht morphologisch identifiziert werden. D-I: rekombinierte Zellen (Astroglia) im Cerebellum und im Hypothalamus bei P2. Es konnten keine NG2-positiven Zellen mit Marker-Expression identifiziert werden. Im Hypothalamus waren Blutgefäße auf Grund der Immunreaktivität der Pericyten detektierbar. Die Balken entsprechen 50 µm. ctx: Kortex; cb: Cerebellum; hypothal: Hypothalamus; A: Astrocyt; BG: Bergmann Glia; NG2: NG2-Glia.

4.5. *In vivo* Koinzidenzdetektion nach akuten Hirnverletzungen

Eine AO-Zelle ist über die zeitgleiche Expression von DsRed1 und EGFP nach einer traumatischen Hirnverletzung definiert und detektierbar. Die erfolgreiche Cre-Komplementierung in PLP-C/N-Cre-, GFAP-C/N-Cre- sowie in GFAP-CCre/PLP-NCre- und GFAP-NCre/PLP-CCre-doppelt transgenen Mäusen während der Entwicklung zeigt das hohe Potential dieser Tiere zur Analyse der Differenzierung Trauma-aktivierter Gliazellen.

Daher wurden doppelt-transgene Mäuse mit Cre-Komplementierung (sowohl GFAP-NCre/PLP-CCre als auch GFAP-CCre/PLP-NCre) verwendet, um ihnen die gleichen kortikalen Stichverletzungen zu setzen, wie in den doppelt-transgenen fluoreszenten Mäusen. Die Identifizierung der AO-Zellen nach einem Zeitfenster von 15 Tage nach der Verletzung sollte mit den neuen transgenen Mausmodellen ermöglicht sein. Durch die Komplementierung der Cre-Rekombinase sollte der Reporter aktiviert werden und die AO-Zellen auch nach mehr als 15 Tagen auffindbar markieren.

Sieben Tage sowie vier bzw. acht Wochen nach der Operation wurden Mäuse der Linie GFAP-NCre(T)/PLP-CCre(K) perfundiert, der Kortex frontal in Höhe der Läsion geschnitten und eine EYFP-Färbung durchgeführt. Zu allen Zeitpunkten konnten ipsilateral in der Nähe der Verletzung rekombinierte Zellen identifiziert werden, die kontralaterale Seite zeigte keine rekombinierten Zellen. Diese Linie wurde ausgewählt, da es wenige EYFP-Reporter positive Zellen im Kortex nach der Entwicklung gab, die Linie aber von der Rekombinationshäufigkeit her mittlere Rekombination zeigte.

In der Abb. 25 wird die Rekombination der Zellen sieben Tage nach der Verletzung in der Linie GFAP-NCre(T)/PLP-CCre(K) gezeigt (A-C). Diese Zellen entsprechen den AO-Zellen in den doppelt-transgenen fluoreszenten Mäusen. Zu diesem Zeitpunkt gibt es in den doppelt-transgenen fluoreszenten Mäusen die höchste Zahl von AO-Zellen. Des Weiteren wurden auch Läsionen vier Wochen bzw. acht Wochen nach der Verletzung untersucht. Zu diesen Zeitpunkten waren die fluoreszenten AO-Zellen nicht mehr detektierbar. Sieben Tage nach der kortikalen Stichverletzung konnten maximal ein bis zwei rekombinierte Zellen / frontaler Schnitt in direkter Nähe zum Stichkanal identifiziert werden. Vier bzw. acht Wochen nach der Operation ist die Zahl der rekombinierten Zellen am Verletzungsherd höher und entspricht ungefähr 6-10 Zellen/ frontaler Schnitt. Alle rekombinierten Zellen in unmittelbarer Umgebung der Läsion (< 500 µm) zeigten GFAP-Immunreaktivität, entsprechen damit astroglialen Zellen. Auch ihre Morphologie entspracht der von reifen protoplasmatischen Astrocyten mit dicken, verzweigten Fortsätzen, die um das Soma angeordnet sind (Abb. 25).

Neben der Kombinationen GFAP-NCre(T)/PLP-CCre(K) wurde auch die Kombination GFAP-NCre(T)/PLP-CCre(R) untersucht. In beiden doppelt-transgenen Linien können rekombinierte Zellen auf der ipsilateralen Seite identifiziert werden. Auf der kontralateralen Seite konnte keine Rekombination in Zellen im identischen Bereich des Kortex

detektiert werden. Gleichwohl gab es auch Rekombination im Thalamus, Hypothalmus und in der Region des dritten Ventrikels (siehe auch Abb. 26 A + 27 A), die auf der embryonal zeitgleichen Aktivierung der beiden Promotoren beruht. In den Abbildungen 26 A-I und 27 A-I sind Übersichten der verletzten Hirnregionen gezeigt. Die Aktivierung der Astrocyten ist anhand der erhöhten GFAP-Immunreaktivität, die auf der kontralateralen Seite komplett fehlt, erkennbar (Abb. 26 I und 27 I). In den Abb. 26 J-O und 27 J-O sind rekombinierte Astrocyten im Bereich der Läsion gezeigt, ihre Morphologie entspricht protoplasmatischen Astrocyten (Abb. 26 D/J/M; Abb. 27 D/M) oder der reaktiver Astrocyten nach einer traumatischen Verletzung (Abb. 27 J).

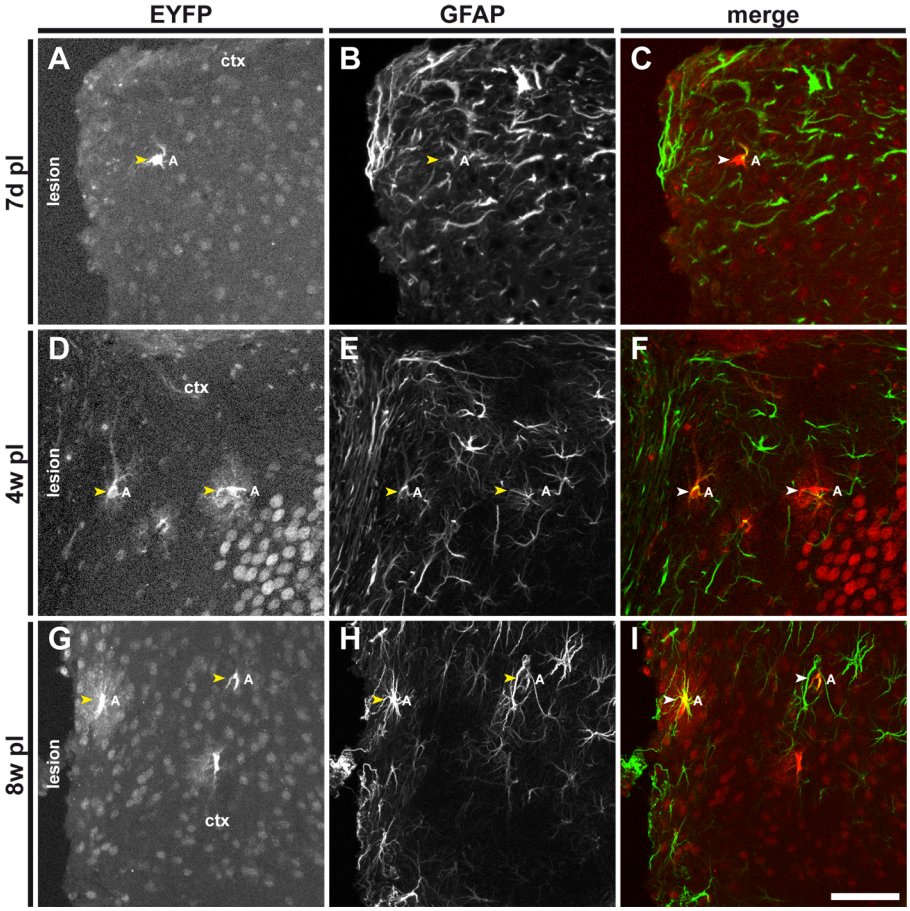


Abb. 25 Zeitabhängige Untersuchung der *in vivo* Koinzidenzdetektion nach einer Verletzung des ZNS

Nach Setzen einer akuten kortikalen Verletzung konnte Rekombination in Zellen gezeigt werden. Diese Zellen entsprachen den AO-Zellen der doppelt-transgenen fluoreszenten Mäuse. Sieben Tage nach Setzen der kortikalen Stichverletzung (A-C) konnten wie auch nach vier (D-F) bzw. acht Wochen (G-I) rekombinierte Zellen identifiziert werden. Vier bzw. acht Wochen nach der Verletzung hat sich die Zahl der rekombinierten Zellen erhöht. Die Zellen zeigen GFAP-Immunreaktivität sowie eine typische astrogliale Morphologie (weitverzweigte Fortsätze der protoplasmatischen Astrocyten). Der Balken entspricht 50 µm und gilt für alle Bildausschnitte. ctx: Kortex; A: Astrocyt.

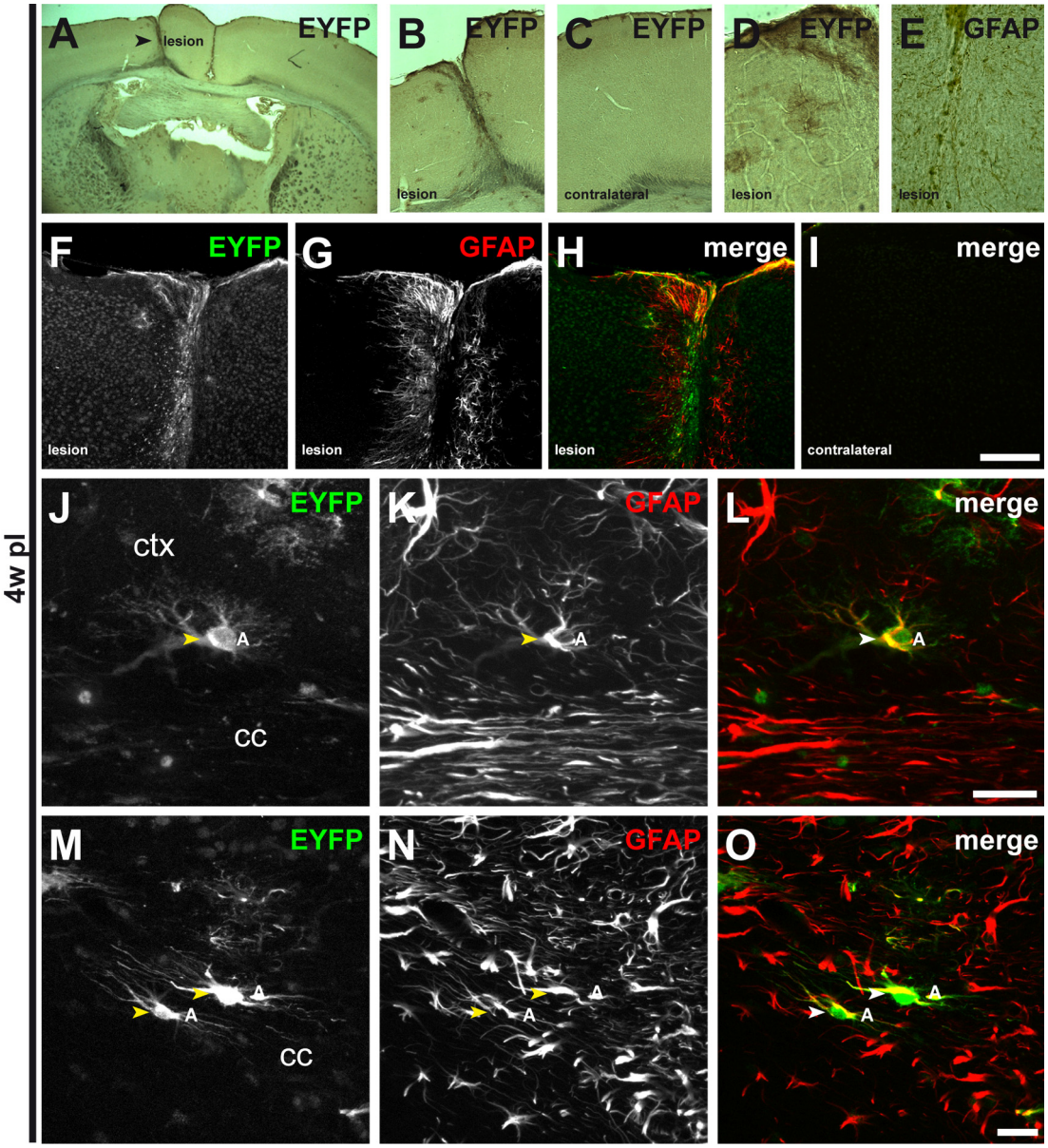


Abb. 26 ***In vivo*** **Koinzidenzdetektion nach akutem Hirntrauma im Kortex – (GFAP-NCre(T)/PLP-CCre(K))**

In dieser Abbildung wird die Rekombination in der Linie GFAP-NCre(T)/PLP-CCre(K) nach einem akuten Hirntrauma im Bereich des Kortex gezeigt. In A-E sind lichtmikroskopisch (DAB) entweder eine EYFP- (A, B, C und D) oder eine GFAP-Immunhistochemie (E) vier Wochen nach der kortikalen Stichverletzung dargestellt. In F-O sind Doppelfärbungen von EYFP und GFAP dargestellt. Die rekombinierten Zellen sind GFAP-positiv und ähneln morphologisch protoplasmatischen Astrocyten (z.B. erkennbar in D und J). Der Balken in I entspricht 200 µm und gilt für die Ausschnitte F-I. Der Balken in O entspricht 20 µm und gilt für die Bildausschnitte J-O. ctx: Kortex; cc: Corpus Callosum; A: Astrocyt.

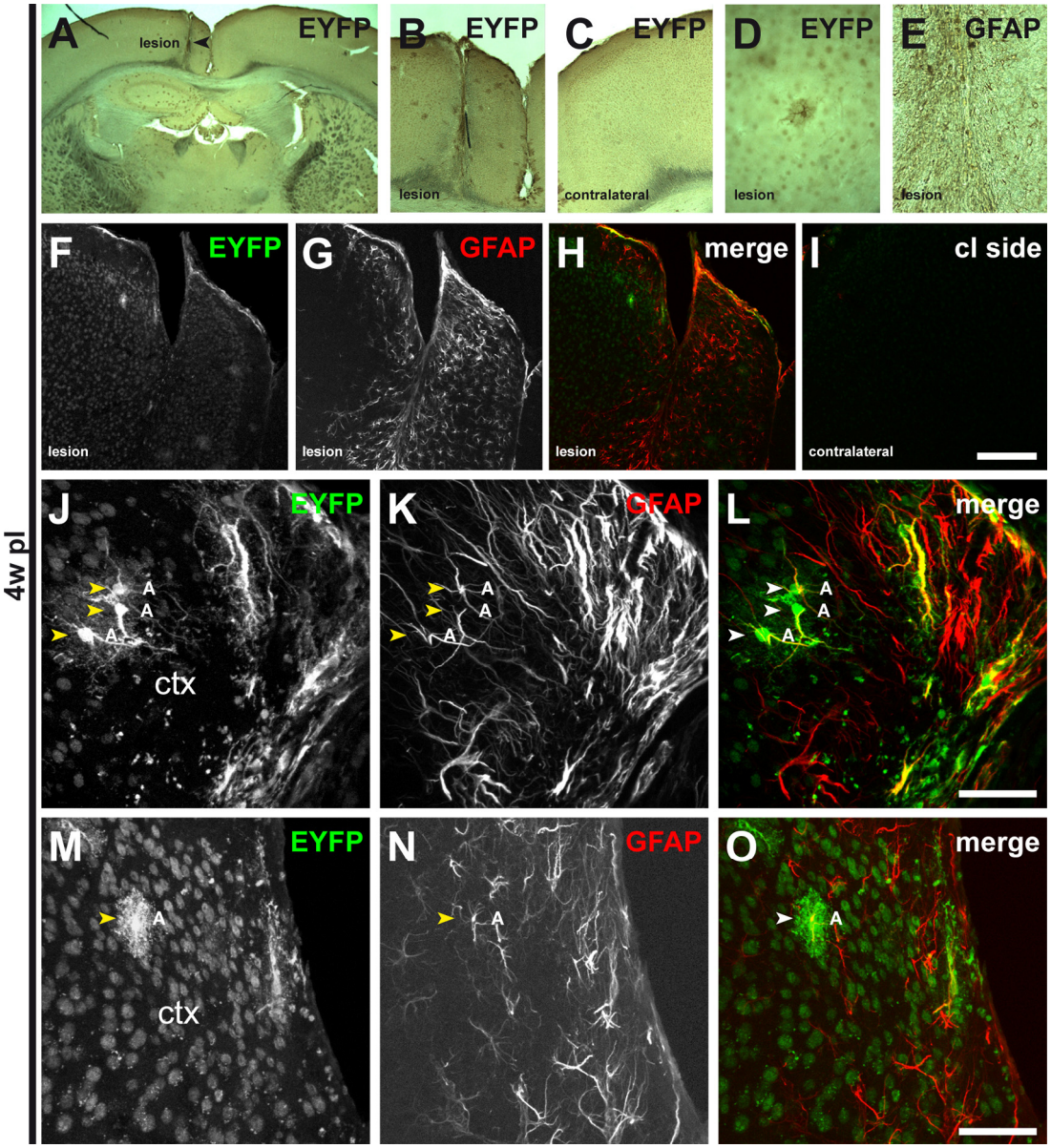


Abb. 27 ***In vivo*** **Koinzidenzdetektion nach akuter kortikaler Verletzung (GFAP-NCre(T)/PLP-CCre(R))**

Hier wird die Rekombination in der Kombination GFAP-NCre(T)/PLP-CCre(R) nach einer kortikalen Stichverletzung gezeigt. A-E zeigt Phasenkontrastbilder des Hirntraumas entweder in einer EYFP-(A-D) oder in einer GFAP-Färbung (E) vier Wochen nach Setzen der Läsion gezeigt. In F-O sind Doppelfärbungen von EYFP und GFAP dargestellt. GFAP-positive Astrocyten sind rekombiniert. Der Balken in I entspricht 200 µm und gilt für die Ausschnitte F-I. Der Balken in O entspricht 20 µm und gilt für die Bildausschnitte J-O. ctx: Kortex; A: Astrocyt.

Alle rekombinierten Zellen in Nähe der Verletzung differenzierten sich zu GFAP-positiven Astrocyten.

Neben den beiden vorgestellten Kombinationen der transgenen Mäuse mit Cre-Komplementierung wurden auch die anderen doppelt-transgenen Mäuse operiert und vier Wochen nach der Verletzung untersucht. In der Kombination GFAP-CCre(F)/PLP-NCre(D) mit geringer Rekombinationshäufigkeit (Abb. 28A-D) konnten keine Zellen im Bereich der Verletzung aktiviert werden. Das bedeutet, es konnten keine rekombinierten Zellen im Bereich der Läsion verglichen mit der kontralateralen Seite identifiziert werden. Allerdings wurde geringe Rekombination aufgrund der Entwicklungsaktivierung beider Promotoren in den Hirnregionen Thalamus, Hypothalamus, Striatum und um den dritten dorsalen Ventrikel gefunden (Daten nicht gezeigt). In der Kombination GFAP-NCre(W)/PLP-CCre(K) mit ebenfalls geringer Rekombinationshäufigkeit (Abb. 28I-L) konnten einige wenige Zellen auf der ipsilateralen Seite im direkten Vergleich zur kontralateralen Seite aktiviert werden. Es rekombinierten aber nur ungefähr 1-2 Zellen/ frontaler Schnitt und Läsion. Auch hier gab es die schon vorgestellte geringe Rekombination aufgrund der zeitgleichen Aktivierung beider Promotoren während der Entwicklung in Thalamus, Hypothalamus, Striatum und dem dritten dorsalen Ventrikel. In der Kombination GFAP-NCre(V)/PLP-CCre(K) mit der höchsten Rekombinationshäufigkeit konnte wie erwartet keine Aussage darüber getroffen werden, wieviele Zellen durch die Verletzung aktiviert wurden, da es sehr viele rekombinierte Zellen (Astrocyten, NG2-Glia und Pyramidenneurone) sowohl auf der kontra- als auch der ipsilateralen Seite aufgrund der embryonalen Rekombination gab. Daher kann diese Linie nicht ausgewertet werden. Die Unterscheidung zwischen embryonal rekombinierten Zellen und aktivierten AO-Zellen, die sich zu Astrocyten differenzieren, ist nicht möglich. Die GFAP-positiven Astrocyten auf der ipsilateralen Seite ergeben sich durch die Aktivierung des GFAP-Promotors nach traumatischen Verletzungen. Die GFAP-Expression ist im adulten Gewebe unterhalb der Detektionsgrenze (Buffo et al., 2008) und daher gibt es auf der kontralateralen Seite keine Überlagerung der kortikalen rekombinierten Astrocyten mit der GFAP-Immunhistochemie. Die Rekombination nach einem akuten Hirntrauma in den drei eben genannten Linien wird in der folgenden Abbildung zusammenfassend verdeutlicht.

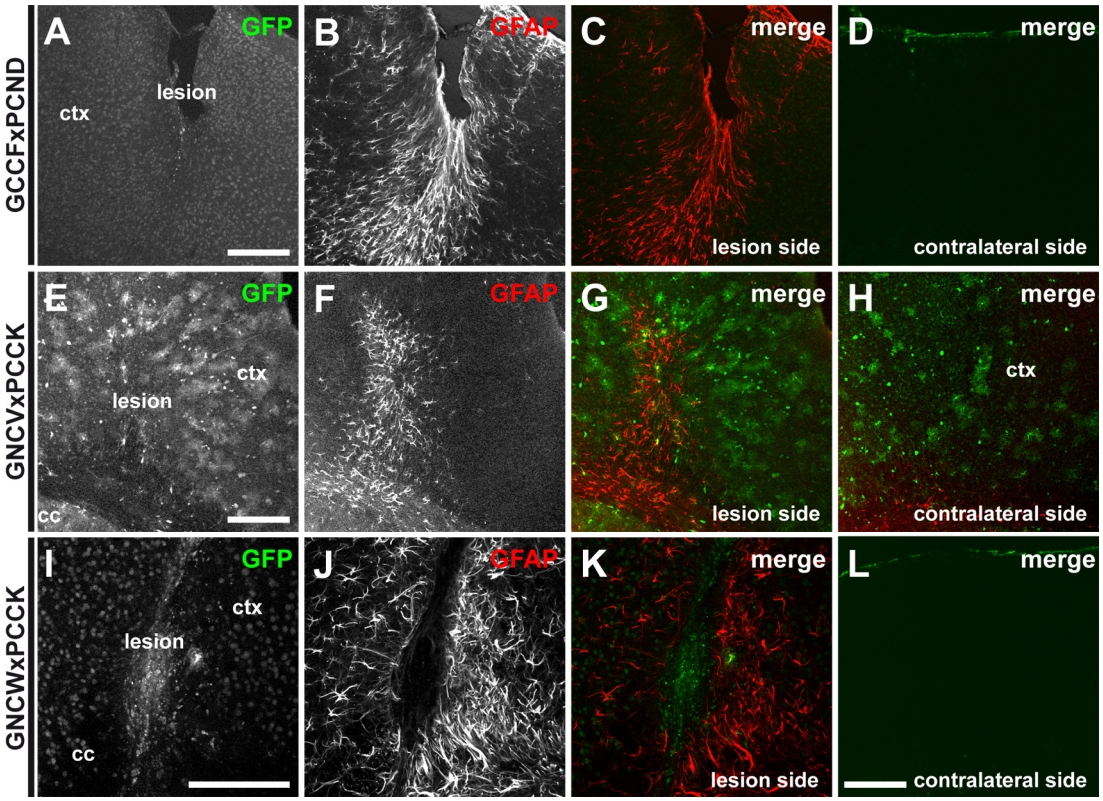


Abb. 28 ***In vivo*** **Koinzidendetektion in den Linien GFAP-CCre(F)/PLP-NCre(D) und GFAP-NCre(V/W)/PLP-CCre(K)**

In der Kombination GFAP-CCre(F)/PLP-NCre(D) (GCCFxPNCD) konnte keine Komplementierung nach akutem kortikalem Hirntrauma festgestellt werden (A-C). B zeigt die Astrogliose über eine GFAP-Färbung. Es konnten keine rekombinierten Zellen um den Verletzungsherd identifiziert werden. D ist eine Überlagerung von EYFP- und GFAP-Färbung auf der kontralateralen Seite. Erkennbar ist hier die schwächere GFAP-Färbung, da es keine astrocytäre Aktivierung gab. In der Kombination GFAP-NCre(V)/PLP-CCre(K) (GNCVxPCCK) (E-H) ist kaum ein Unterschied in der EYFP-Färbung zwischen ipsi- und kontralateral erkennbar. Hier war die Rekombination in der Entwicklung so hoch, das viele Astrocyten im Kortex aktiviert wurden und daher zusätzlich-rekombinierte Zellen schwierig identifizierbar waren. Die Aktivierung der Astrocyten nach der Verletzung ist deutlich in F gezeigt, in H (kontralateral) ist keine Aktivierung durch eine erhöhte GFAP-Expression zu erkennen. I-L stellt die kortikale Verletzung in der Kombination GFAP-NCre(W)/PLP-CCre(K) (GNCWxPCCK) dar. Hier ist die Identifizierung rekombinierter Zellen in der Läsion möglich, ihre Zahl aber gering. J zeigt die Astrogliose (GFAP-Färbung), L die kontralaterale Seite, in der keine Aktivierung der Astrocyten erkennbar ist.

4.6. Cre-Komplementierung im ZNS nach Injektion rekombinanter adeno-assoziierter Viren

In dieser Arbeit wurde die Cre-Komplementierung als ein mächtiges Verfahren zur stabilen Markierung von koinzidenten Genaktivitäten *in vivo* identifiziert. Die Ergebnisse versprechen die erfolgreiche Verwendung auch für andere neurobiologische Fragestellungen. Da die Herstellung transgener Mäuse ein zeit- und kostenintensiver Prozess ist, wurde das Potential der Cre-Komplementierung mit Hilfe rekombinanter adeno-assoziierter Viren (rAAV) untersucht. Die hierfür hergestellten rAAVs sollten *in vivo* die Rekombination in Gliazellen und Interneuronen initiieren. Die Identifikation interneuronaler Subpopulationen ist immer noch ein großes Problem in der Neurobiologie (Monyer und Markram, 2004; Markram et al., 2004). Die Anwendung von Viren ist jederzeit möglich. Ihre Ausbreitung begrenzt sich auf die Hirnregion, die injiziert und danach infiziert wird. Damit stellen Viren eine gute Möglichkeit dar, regionsspezifisch Zellen zu markieren bzw. genetisch zu manipulieren.

Als interneuronaler Promotor wurde zum einen der GAD67-Promotor ausgewählt. Dieser kontrolliert die Expression des GABA-synthetisierenden Enzyms Glutamatdecarboxylase (*glutamic acid decarboxylase*) (Houser, 2007). Als zweiter Promotor wurde der CCK-Promotor ausgewählt, der das Neurohormon Cholecystokinin steuert (Kawaguchi und Kondo, 2002). Für Kontrollzwecke wurden auch Viren mit GFAP-Promotor hergestellt und verwendet. Eine Übersicht über die verwendeten Konstrukte befindet sich in der Abbildung 4.

Um zu überprüfen, ob die Viren zu einer messbaren Rekombination in den gewünschten Zellen führen, wurden Viren verwendet, die zunächst gleichzeitig unter demselben Promotor die Expression der beiden Cre-Fragmente steuern. Hierfür wurden der astrogliale GFAP- bzw. der interneuronale GAD67-Promotor ausgewählt (siehe Abb. 29). Die Mäuse wurden drei Wochen nach der Injektion perfundiert und analysiert. Gezeigt sind Doppelfärbungen gegen EYFP und einen glialen (GFAP) oder interneuronalen (z.B. Parvalbumin) Marker. Wurden GFAP-C- und NCre-Viren in den Kortex von ROSY-Reporter-Mäusen ko-injiziert, konnten rekombinierte GFAP-positive Astrocyten identifiziert werden (siehe Abb. 29 A-F). Allerdings führte die Ko-Injektion der GFAP-C/N-Cre-Viren in einigen seltenen Fällen auch zur Rekombination in Pyramidenneuronen, was auf eine nicht eindeutige Wirtsspezifität der Viren hindeutet (Daten nicht gezeigt).

Die Ko-Injektion von GAD67-C/NCre-Viren in den Hippocampus einer ROSY-Reportermaus führte zu einer Rekombination in Interneuronen, die mit dem Marker Parvalbumin markiert werden können. Parvalbumin markiert ebenfalls Subtypen von Interneuronen und wird häufig zur Indentifizierung von interneuronalen Subtypen verwendet (Kawaguchi und Kondo, 2002). Neben rekombinierten Parvalbumin-

positiven Interneuronen gibt es auch rekombinierte Parvalbumin-negative Zellen. Ursache das Vorkommen vieler verschiedener Subpopulationen von Interneuronen, die überlappende Marker wie Parvalbumin oder auch GAD67 haben. Leider ist es nicht möglich, die Zellen mit dem Marker GAD67 zu identifizieren, da dieser Marker in der untersuchten Hinrregion postsynaptisch exprimiert wird und daher weit außerhalb der Zellsomabereiche, in denen üblicherweise der EYFP-Reporter nachgewiesen wird. Bei der Ko-Injektion der GAD67-C/NCre-Viren im Kortex wurden in einem Fall rekombinierte Pyramidenneurone identifiziert, was auf die nicht-eindeutige Spezifität der Viren hindeutet (Daten nicht gezeigt).

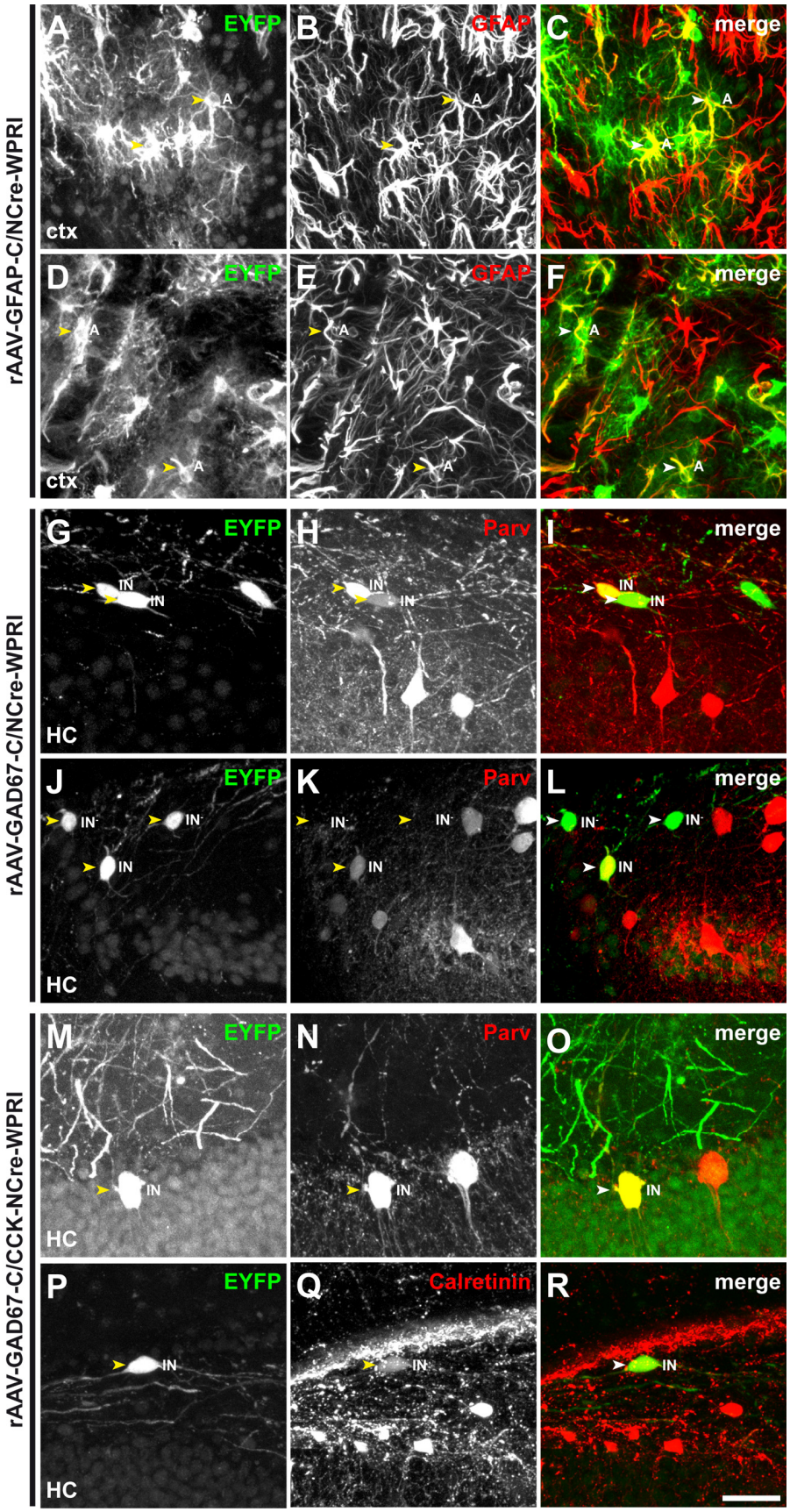
Wie erwartet konnte keine Rekombination detektiert werden, wenn nur der C- oder N-terminale Teil der Cre-Rekombinase allein in eine ROSY-Maus injiziert wurde, unahängig vom verwendeten Promotor (Daten nicht gezeigt).

Nach Komplementierung und Rekombination der Cre-Konstrukte unter Kontrolle desselben Promotors, wurde getestet, ob die viralen Vektoren auch zur Koinzidenzdetektion interneuronaler Promotoren verwendet werden können. Die Injektion von rekombinanten Adenoviren, bei denen die Expression des einen Cre-Fragments vom GAD67-Promotor und des anderen Fragments vom CCK-Promotor kontrolliert wurde, sollte zur Markierung einer Subpopulation von Interneuronen führen. Hierzu wurden GAD67-CCre- und CCK-NCre-Viren ko-injiziert. In diesem Fall wurden Interneurone infiziert, die mit Calretinin oder Parvalbumin gegengefärbt wurden. Wie zu erwarten rekombinierten nach Injektion der beiden Cre-Fragmente unter zwei verschiedenen Promotoren weniger Zellen, als wenn beide Fragmente durch den gleichen Promotor kontrolliert werden.

Diese Experimente zeigen, dass die Cre-Fragmente auch verwendet werden können, um die zelltypspezifische Expression unter Verwendung rekombinanter adeno-assoziierter Viren durchzuführen. Die Expression der Cre-Fragmente führt zur Rekombination in den erwarteten Zellen.

Abb. 29 Rekombination nach Ko-Injektion von Viren mit C-und NCre-terminalen Cre-Fragmenten unter der Kontrolle neuraler Promotoren

Injizierte man in den Kortex oder Hippocampus von ROSY-Reportermäusen gleichzeitig rekombinante adeno-assoziierte Viren mit Expression der C- und NCre-Fragmente unter Kontrolle neuraler Promotoren erhielt man zelltypspezifische Rekombination. A-F: Ko-Injektion von GFAP-C/NCre-Viren (GFAP-Immunfärbung). Erkennbar ist, dass alle rekombinierten EYFP-positiven Zellen GFAP-immunreaktiv waren. G-L: Ko-Injektionen der GAD67-C/N-Cre-Viren, Detektion mit Parvalbumin. M-R: Ko-Injektion von GAD67-C und CCK-NCre-Viren, Parvalbumin/Calretinin-Immunfärbungen. Der Balken gilt für alle Bildauschnitte und entspricht 200 µm für A-F und 50 µm für G-R. ctx: Kortex; HC: Hippocampus; A: Astrocyt, IN: Interneuron (positiv für verwendeten Marker); IN^-: Interneuron (negativ für verwendeten Marker).


rAAV-GFAP-C/NCre-WPRI
A
EYFP
A
A
ctx
B
GFAP
A
A
C
merge
A
A
D
EYFP
A
A
ctx
E
GFAP
A
A
F
merge
A
A
rAAV-GAD67-C/NCre-WPRI
G
EYFP
IN
IN
HC
H
Parv
IN
IN
I
merge
IN
IN
J
EYFP
IN
IN
IN
HC
K
Parv
IN
IN
IN
L
merge
IN
IN
IN
rAAV-GAD67-C/CCK-NCre-WPRI
M
EYFP
IN
HC
N
Parv
IN
O
merge
IN
P
EYFP
IN
HC
Q
Calretinin
IN
R
merge
IN

5. DISKUSSION

In der vorliegenden Arbeit wurden folgende Ergebnisse gefunden:

1. Akute Hirnverletzungen aktivieren Gliazellen, die gleichzeitig astro- wie oligodendrogliale Eigenschaften aufweisen.
2. Diese aktivierten Gliazellen (AO-Zellen) differenzieren während des Heilungsprozesses der Läsion zu reifen, protoplasmatischen Astrocyten.
3. Die AO-Zellen stammen aus der Oligodendrocyten-Lineage, in denen durch die Läsion astrogliale Gene angeschaltet werden können.
4. Die koinzidente Aktivität zweier Gene kann durch Komplementierung von N- und C-terminalen Fragmenten der Cre-Rekombinase *in vivo* in transgenen Mäusen als auch mit Hilfe viraler Vektoren stabil markiert werden.

5.1. Identifizierung aktivierter Gliazellen nach akutem Hirntrauma

Die Verwendung von transgenen Mausmodellen mit fluoreszenter Proteinexpression unter Kontrolle zelltypspezifischer Promotoren ist aus der modernen Neurobiologie nicht mehr wegzudenken. In dieser Arbeit wird gezeigt, dass unter Verwendung doppelt-transgener GFAP-EGFP/PLP-DsRed1-Mäuse und bei einer akuten Verletzung des ZNS durch kortikale Stichverletzungen bzw. einer ischämischen Schädigung (MCAO) die Identifizierung von aktivierten Gliazellen möglich ist. Diese Zellen zeigen astro- wie auch oligodendrogliale Eigenschaften (AO-Zellen). Ursache hierfür ist die gleichzeitige Aktivierung von GFAP- und PLP-Promotor. Die Identifizierung dieser Zellen ist auf ein posttraumatisches Zeitfenster von 3-15 Tagen reduziert. Unter Einbeziehung der Halbwertszeiten der beiden fluoreszenten Proteine (EGFP: 24 h, DsRed1: vier Tage; Verkhusha et al., 2003) ist die gemeinsame Aktivität der Promotoren auf eine noch kürzere Zeit als die gegebenen Tage einzuschätzen. Eine erste astrogliale Reaktion auf eine Verletzung ist eine Stunde nach der Verletzung zu beobachten (Mucke et al., 1991). Oligodendrocyten und OPCs reagieren sehr empfindlich auf ischämische Bedingungen, daher ist eine oligodendrogliale Reaktion ähnlich schnell zu erwarten (Matute et al., 2007).

Die AO-Zellen differenzieren sich aus der Klasse der oligodendroglialen Vorläuferzellen. Sieben Tage nach der Verletzung sind die Zellen positiv für Olig2 und Sox10, beides Marker für oligodendrogliale Vorläuferzellen. Von beiden ist bekannt, dass sie nach einer verletzungsinduzierten Aktivierung verstärkt exprimiert werden (Buffo et al., 2008). Zusammen mit der Beobachtung, dass die Zellen in ihren Fortsätzen DsRed1-Proteinaggregate haben, lässt sich schliessen, dass sie von oligodendroglialen Vorläufern abstammen. Da sich die fluoreszenten Proteinaggregate erst mit einer stark erhöhten Expression des Transgens über einen längeren Zeitraum (z.B. dem

zunehmendem Alter) einstellen (Hirrlinger, Scheller et al., 2005), ist es denkbar, dass der Promotor schon vor der Aktivierung durch die Verletzung angeschaltet war. Es ist bekannt, dass viele OPCs die mRNA des PLP exprimieren (Ye et al., 2003), der Promotor daher aktiv ist und es zur Expression des Transgens kommt. Werden diese speziellen Oligodendrocytenvorläuferzellen, in denen der PLP-Promotor aktiv und damit die mRNA nachzuweisen ist (Frei et al., 2000), nun zusätzlich durch die Verletzung aktiviert, um als Vorläuferzellen für die späteren AO-Zellen zu dienen, kommt es zur Bildung der vorhandenen fluoreszenten Proteinaggregate. Das Fehlen von Olig2 und Sox10 in einigen AO-Zellen deutet auf unterschiedliche Differenzierungsstadien hin. Einige AO-Zellen exprimieren die proliferationsspezifischen Proteine noch, andere nicht mehr.

Ähnlich wie Olig2 wird auch NG2 auf vielen Vorläuferzellen exprimiert, einschliesslich denen der Oligodendrocyten und Astrocyten während der Entwicklung (Cai et al., 2007; Zhu et al., 2008) sowie auf multipotenten Vorläufern im postnatalen Gehirn (Belachew et al., 2003; Aguirre und Gallo, 2004). Die hier gefundenen AO-Zellen zeigen keine Immunreaktivität für NG2. Der in dieser Arbeit verwendete monoklonale NG2-Antikörper (Diers-Fenger et al., 2001) markiert den extrazellulären Teil des NG2-Proteoglycans, der mit der extrazellulären Matrix in Verbindung steht. Es ist bekannt, dass die Ektodomäne des NG2-Moleküls sehr anfällig für Proteasen ist. In einer Läsion liegt eine erhöhte Konzentration an entzündungsfreigesetzten Proteasen (wie Matrix-Metalloproteinasen, MMPs; Lukes et al., 1999; Rosenberg, 2002) vor. Da benachbarte komplexe Astrocyten im Verletzungsherd aber NG2-positiv sind (Matthias et al., 2003), kann eine proteolytische Spaltung durch diese Proteasen ausgeschlossen werden. Diese Daten zeigen, dass die AO-Zellen trotz ihrer Immunreaktivität für die anderen Proliferationsmarker negativ für das Proteoglycan NG2 sind. Astrogliale und neuronale Marker konnten in den AO-Zellen zu keinem Zeitpunkt detektiert werden. Dies ist ein weiteres Indiz, dass die AO-Zellen von oligodendroglialen Zellen abstammen, zumal der oligodendrogliale Marker PLP in den Fortsätzen detektiert werden konnte.

Die Anzahl der AO-Zellen nimmt mit dem Schweregrad der Verletzung zu. Dies konnte unter Nutzung der MCAO und einer unterschiedlichen langen Dauer der Sauerstoffunterversorgung gezeigt werden. Eine ischämische Schädigung für 60 min führt zu einer großen Anzahl von AO-Zellen, während nach 45 min nur wenige, nach 30 min gar keine AO-Zellen gefunden werden. Kombiniert mit der Beobachtung, dass auch kortikale Stichverletzungen AO-Zellen aktivieren, kann gefolgert werden, dass die Verletzung der Blut-Hirn-Schranke zur Aktivierung der AO-Zellen führt. Nach einer Zerstörung der Blut-Hirn-Schranke durch eine ischämische Schädigung (nach 60 minütiger Unterversorgung mit Sauerstoff und Glucose deutlich stärker als nach 30 min, (Belayev et al., 1996)), dringen Monocyten (Leukocyten) von außerhalb des Gehirns (aus dem Blut) in das ZNS ein (Huang et al., 2006), wo ihre Anwesenheit von

Gliazellen detektiert wird (Ballabh et al., 2004). Die Einwanderung von Monocyten wird unter anderem durch Chemokine gelenkt (Man et al., 2007). Die anschliessende Aktivierung von Astro- wie auch Mikroglia führt unter anderem zur Sekretion von Cyto- und Chemokinen in das Hirnparenchym (Eddleston und Mucke, 1993; Garden und Moller, 2006; Man et al., 2007). Freigesetzte Cytokine sind z.B. der Tumor-Nekrose Faktor α (TNFα), Interleukin-1B (IL-1B) und Interferon-γ (IFN- γ) (Huang et al., 2006; Scholz et al., 2007). Zu den aus Gliazellen freigesetzten Chemokinen gehören CINC (*cytokine-induced neutrophil chemoattractant*) und MCP-1 (*monocyte chemoattractant protein-1*) (Huang et al., 2006). Des Weiteren haben auch Adhäsionsmoleküle wie Selektine, Integrine und Immunglobuline einen Einfluss auf die Ausbreitung der ischämischen Region (Huang et al., 2006). Zusammen mit weiteren freigesetzten Signalstoffen wie Glutamat, ATP, Aspartat und NO kommt es sowohl zu einer weiteren Herabsetzung der Durchlässigkeit der Blut-Hirn-Schranke (Ballabh et al., 2004) als auch zu nekrotischem und apoptotischem Zelltod (Huang et al., 2006).

Durch die beschriebenen Reaktionen könnten neben Gliazellen wie Astrocyten und Mikroglia auch die hier gefundenen AO-Zellen aktiviert werden und sich aus OPCs differenzieren. Diese Erklärung geht einher mit den Beobachtungen der kortikalen Stichverletzungen. Kleinere Verletzungen zerstören weniger Kapillaren im ZNS; daher wandern weniger Leukocyten aus dem Blut in das Hirnparenchym ein. Bei schwerwiegenderen Verletzungen werden mehr und vor allem größere Blutgefäße zerstört, die Einwanderung nach der Verletzung der Blut-Hirn-Schranke verstärkt sich, es kommt zu einer erhöhten Konzentration von Chemo- und Cytokinen in der verletzten Hirnregion. Mehr AO-Zellen werden aktiviert. Nicht zu klären ist hier, ob die Aktivierung primär durch die aus dem Blut einströmenden Leukocyten ausgelöst wird oder sekundär auf die Aktivierung der Gliazellen und die darauffolgende Sekretion von pro-inflammatorischen Signalstoffen erfolgt.

5.2. Aktivierte Glia differenzieren sich zu reifen Astrocyten

Durch Nutzung der neuen transgenen Mausmodelle mit Cre-Komplementierung kann eine transiente Ko-Aktiverung der beiden glialen Promotoren in ein permanentes Signal durch Expression des EYFP-Reporters umgewandelt werden. Wir konnten zeigen, dass sich AO-Zellen nach ihrer Aktivierung durch eine traumatische Hirnverletzung aus OPCs in reife Astrocyten differenzieren. Sowohl vier als auch acht Wochen nach der kortikalen Verletzung konnten rekombinierte GFAP-positive protoplasmatische Astrocyten auf der ipsilateralen Seite des Kortex nachgewiesen werden, kontralateral gab es keine nachweisbar erhöhte Rekombination.

Das Cre/loxP System besteht aus zwei Komponenten: der Cre-Rekombinase (*causes recombination*) und den loxP-Sequenzen (*locus of crossover x* aus dem Bakteriophagen P1). Das Enzym katalysiert die Rekombination der DNA zwischen zwei

(gefloxten) loxP-Erkennungssequenzen (Hamilton und Abremski, 1984; Sternberg und Hamilton, 1981) und benötigt für die Katalyse der Rekombination keine zusätzlichen Proteine oder Ko-Faktoren, so dass dieses Enzym auch außerhalb des Bakteriophagen, z.B. in der Maus aktiv ist (Abremski et al., 1983; Abremski und Hoess, 1984; Sternberg und Hamilton, 1981). Um eine konditionelle Expression eines gewünschten Gens, z.B. eines Reportergens zu erreichen, wird eine mit loxP-Sequenzen flankierte STOP-Kassette zwischen dem Promotor und dem Transgen platziert, so dass die Expression des Transgens erst nach Exzision der gefloxten STOP-Kassette erfolgen kann (Lakso et al., 1996; Srinivas et al., 2001). Der Vorteil dieses Reportersystem liegt darin, dass auch eine nur kurzzeitige Aktivierung des Promotors zu einer dauerhaften Markierung der Zellen führt, da die DNA irreversibel verändert wird. Die Anwendung des Cre-Rekombinase-Systems kann mit dem häufig *in vitro* genutzten Modell der Komplementierung biologischer Moleküle kombiniert werden (Michnick et al., 2007). So wird die hier vorgestellte *in vivo* Koinzidenzdetektion der beiden Promotoren durch Nutzung der neuen transgenen Mausmodelle möglich. Die dauerhafte Markierung der AO-Zellen ermöglicht ihre Identifizierung nach eingetretender Differenzierung im posttraumatischen Zeitfenster.

Im Gegensatz zu den fluoreszenten AO-Zellen zeigen die EYFP-Reporter positiven AO-Zellen nach sieben Tagen GFAP-Immunreaktivität. Die fluoreszenten AO-Zellen waren zu keinem untersuchten Zeitpunkt positiv für klassische astrogliale Marker (GFAP und S100β). Die Detektion des EYFP-Reporters erfolgt erst zu einem Zeitpunkt, in dem die Detektion der AO-Zellen aufgrund ihrer Fluoreszenz nicht mehr von EGFP-positiven protoplasmatischen Astrocyten unterscheidbar ist. Verbunden mit dem Wissen der Halbwertszeiten der fluoreszenten Proteine (beschränkt dies die gemeinsame Aktivität von PLP und GFAP-Promotor auf maximal 1-3 Tage. Das trotzdem in einem Zeitfenster von 15 Tagen AO-Zellen in den doppelt-transgenen Mäusen identifizierbar sind, lässt sich damit erklären, dass sie nicht nur direkt nach der Verletzung sondern auch während der Regenerationsphase aktiviert werden. So ist es denkbar, dass die zuerst aktivierten AO-Zellen sieben Tage nach der Verletzung GFAP-positiv sind und das DsRed1 nicht mehr detektierbar ist, da der PLP-Promotor schon mehrere Tage abgeschaltet ist. Durch die Aktivierung des endogenen GFAP-Promotors ist GFAP nachweisbar, dass nach Verletzungen ebenfalls verstärkt exprimiert wird (Mucke und Eddleston, 1993; Nolte et al., 2001). Dies zeigt sich auch an aktivierten Astrocyten im Verletzungsherd, die GFAP-Immunreaktivität zeigen und gegenüber der kontralateralen Seite eindeutig indentifizierbar sind. Diese Daten unterstützen die Beobachtung, dass sich Zellen der Oligodendrocyten-Lineage in reife Astrocyten differenzieren. Die Entwicklung aus OPCs zu reifen Astrocyten lässt sich am Wechsel der glialen Proteine von Olig2/Sox10 zu GFAP nachverfolgen.

In transgenen Mäusen mit dem hier verwendenten PLP Minigen (die regulatorischen Elemente enthalten auch das Intron I (Wight und Dobretsova, 2004)) sind die mRNAs stabilisiert. Damit ist eine höhere Expression zu beobachten. Die NCre-mRNAs unter dem GFAP-Promotor sind hingegen deutlich instabiler. Wir konnten GFAP-Promotor-kontrollierte NCre-Fragmente auch proteinbiochemisch aufgrund geringer Expression nicht nachweisen. Das CCre-Fragment ist 2-3 kDa kleiner als die entsprechenden PLP-Promotor-getriebenen CCre-Fragmente. Die CCre-mRNA ist unter der Kontrolle des GFAP-Promotors instabiler, als die mRNA des CCre mit der stabilisierenden Intronsequenz unter Kontrolle des PLP-Promotors. Vermutlich erfolgt ein partieller Abbau der mRNA vom 3'-Ende her. Werden die beiden Cre-Fragmente unter Kontrolle des GFAP-Promotors aber durch Komplementierung stabilisiert, ist das CCre-Fragment nachweisbar in der proteinbiochemischen Analyse. Aufgrund der hier gezeigten dennoch erfolgreichen Cre-Komplementierung wurde dieses Phänomen nicht weiter untersucht. Wir nehmen an, dass in den OPCs Cre-Fragmente bereits exisitieren Wird nun der GFAP-Promotor durch die akute Verletzung aktiviert, werden nur wenige und möglicherweise instabile komplementäre Cre-Fragmente synthetisiert. Diese werden aber umgehend durch die Komplementierung stabilisert. Die entstehende Cre-DNA-Rekombinase-Aktivität führt zur irreversiblen Modifikation der DNA und zur späteren Expression des Reporters in Zellen. Die nachgewiesene Immunreaktivität der AO-Zellen für oligodendrogliale Marker und die Nicht-Expression astroglialer Marker sind ein weiterer Hinweis auf dieses Szenario.

Schon in den 80 er Jahren wurde das Vorkommen von bipotenten Zellen beschrieben, die als O-2A Zellen bezeichnet wurden (Raff et al., 1983). *In vitro* differenzierten sich diese Zellen in Oligodendrocyten bzw. nach Zugabe von 10 % Serum in Astrocyten. Das Vorkommen der O-2A Zellen konnte sowohl im sich entwickelnden ZNS als auch im adulten Gehirn z.B. im optischen Nerv und im Rückenmark gezeigt werden (Noble und Wolswijk, 1992; Noble et al., 2004). *In vivo* konnte bisher aber nur die Differenzierung von O-2A Zellen in Oligodendrocyten gezeigt werden, die Differenzierung in Astrocyten gelang bisher nur in Zellkulturexperimenten (Noble und Wolswijk, 1992). O-2A Zellen *in vitro* zeigen eine unipolare, *in vivo* im reifen ZNS eine einfache bipolare Morphologie (Wolswijk und Noble, 1989). AO-Zellen zeigen zum Zeitpunkt ihrer Identifizierung anhand der gleichzeitigen Expression von EGFP und DsRed1 ebenfalls eine einfache Morphologie. Ausgehend von der Annahme, dass die OPCs, die sich zu AO-Zellen und später reifen Astrocyten entwickeln identisch mit den in der Literatur beschriebenen O-2A Zellen sind, ist die hier vorgelegte Arbeit die erste, die *in vivo* die Differenzierung von OPCs zu Astrocyten zeigt. Aufgrund des fehlenden Beweises, dass sich O-2A-Zellen *in vivo* in Astrocyten differenzieren können, wird heute in der Literatur zumeist nur noch von OPCs gesprochen (Nishiyama, 2007). Die

hier gefundenen AO-Zellen sind ein transientes Differenzierungsstadium der O-2A-Zellen auf dem Weg zu Astrocyten.

Eine weiterer Ursprung der Zellen wäre die Entwicklung aus GRP-Zellen (*glial restricted precursors*) (Gregori et al., 2002). Diese können während der Entwickung *in vivo* in Oligodendrocyten wie auch Astrocyten differenzieren, zudem bilden sie auch adulte O-2A Zellen (Noble et al., 2004). Bei der Annahme, dass die AO-Zellen sich aus GRPs entwickeln, die in ihrer Immunreaktivität OPCs entsprechen, wäre die Differenzierung zu Astrocyten zu erklären (Gregori et al., 2002). Bisher konnte nur gezeigt werden, dass sich in der Entwicklung des Rückenmarks aus GRPs über den Zwischendifferenzierungsschritt O-2A-Zelle Oligodendrocyten entwickeln (Noble et al., 2004). In Anbetracht der publizierten Daten, dass reife Oligodendrocyten nach kortikalen Stichläsionen nicht proliferieren (Norton, 1999), OPCs hingegen stimuliert werden (Dimou et al., 2008), kann geschlossen werden, dass sich die AO-Zellen, wie schon immunhistochemisch gezeigt, aus oligodendroglialen Vorläuferzellen differenzieren.

DsRed1 ist ungefähr doppelt so hell wie EGFP (Nagai et al., 2002). Die unterschiedlichen Abstufungen in der Expressionrate von DsRed1 und EGFP, die die verschiedenen quantitativen Resultate ergeben, zeigen, dass sich das Verhältnis von DsRed1 zu EGFP während der Differenzierung ändert und die unterschiedlichen Konzentration an fluoreszenten Proteinen unterschiedlichenn Differenzierungsstufen entsprechen. Ein Tetramer DsRed1 ist ungefähr genauso hell wie zwei Moleküle des Monomers EGFP. Daher ist davon auszugehen, dass in den Zellen die gelb bzw. grüngelb erscheinen deutlich höhere Konzentrationen an EGFP-Monomeren vorliegen als an DsRed1-Tetrameren. Nimmt man an das OPCs zu Astrocyten differenzieren, ist in den Zellen zu einem frühen Stadium viel DsRed1 (eher rot) vorhanden, zu einem späteren Zeitpunkt dann nur noch EGFP (eher grün). Zwischen diesen beiden Zeitpunkten ergeben sich die unterschiedlichen Farbabstufungen, die gezeigt werden können, basierend auf wechselnen Konzentrationen von DsRed1 und EGFP.

Die Verwendung des Reporters TgH(ROSA26-LoxP-stop-LoxP-EYFP)$_{ROSY}$ führt zu Einschränkungen bei der Detektion der Rekombination. Die embryonale Expression des ROSA26-Promotors ist hoch und so die Markerexpression ohne eine Verstärkung, z.B. durch eine Immunfärbung gegen das EYFP, detektierbar. Im postnatalen Gewebe ist die Expression des EYFP unter der Kontrolle des ROSA26-Promotors allerdings so gering, dass die intrinsische EYFP-Fluoreszenz nicht ausreicht, um ohne Verstärkung detektiert werden. Das EYFP-Signal muss daher mit einem Antikörper gegen EYFP amplifiziert werden (Delaunay et al., 2008).

Zudem wurde gezeigt, dass dieser Reporter eine Rekombination in Astroglia nur unvollständig anzeigt (Casper und McCarthy, 2006). Die hier vorgestellten Ergebnisse

zeigen daher sowohl während der Entwicklung als auch nach der traumatischen Aktivierung eine zu geringe Zahl EYFP-positiver Zellen an. Die tatsächliche Rekombination ist höher einzuschätzen (Casper und McCarthy, 2006).

In bisherigen Studien wurde die *in vivo* Differenzierung von O-2A-Zellen in Astrocyten nicht gefunden. Dies lässt vermuten, dass dieser Prozess während der Entwicklung nicht stattfindet. Es konnte aber gezeigt werden, dass sich O-2A-Zellen *in vivo* während der Entwicklung in Oligodendrocyten differenzieren. Die Entwicklung zu Astrocyten konnte nur *in vitro* durch Applikation von Serum induziert werden (Raff et al., 1983). Bei der Verletzung der Blut-Hirn-Schranke dringen neben Leukocyten aus dem Blutserum eine große Zahl weiterer Faktoren in das Hirnparenchym ein. Dies könnte eine Erklärung sein, warum in dieser Arbeit gezeigte Differenzierung zu Astrocyten nur nach traumatischen Hirnverletzungen gezeigt werden kann. Die adulte Bipotenz der O-2A-Zellen (über AO-Zellen) zeigt, dass es nach einem akuten Trauma essentiell für das Hirngewebe ist über eine genügende Anzahl von Astrocyten zu verfügen. Diese astrogliale Entwickung aus OPCs (O-2A-Zellen) ist trotz der vorhandenen Astrocyten wichtiger als eine Differenzierung zu myelinisierenden Oligodendrocyten. Publizierte Daten zeigen, dass proliferierende Astrocyten als adulte Stammzellen in verschiedenen Hirnregionen agieren (Doetsch et al., 1999; Seri et al., 2001). Die Dedifferenzierung von Astrocyten in frühen Entwicklungsstufen wie dem postnatalen (Ganat et al., 2006) bzw. embryonalen Gehirn (Gotz und Huttner, 2005) zeigt, wie wichtig es ist, Differenzierungen verschiedener glialer Zellpopulationen *in vivo* zu verstehen. Nur dann lassen sich therapeutische Ansätze finden, mit denen ein Einfluss auf z.B. ischämische Verletzungen ausgeübt werden kann. Es wurde gezeigt, dass einige postmitotische Astrocyten nach traumatischen Hirnverletzungen dedifferenzieren und *in vitro* das Potential haben sich zu Neuronen zu entwickeln (Buffo et al., 2008). Es erscheint möglich, dass diese Gruppe von sich dedifferenzierten Astrocyten aus OPCs (O-2A-Zellen) wieder aufgefüllt wird. Vielleicht entwickeln sich aus O-2A-Zellen genau diese multipotenten Astrocyten, um die Zahl dieser Gliazellen nach einer Verletzung zu erhöhen. Gliale Vorläuferzellen, die NG2 oder PDGFRα exprimieren, besitzen diese Eigenschaft sowohl vor als auch nach einer akuten Hirnverletzung nicht (Buffo et al., 2008). Daher könnte die Differenzierung nach Aktivierung aus O-2A-Zellen ein wichtiger Schritt für die sich entwicklenden Astrocyten sein, um diese Multipotenz zu erreichen (siehe Abb. 30). Adulte OPCs (O-2A-Zellen) und ihre Differenzierung zu Astrocyten zeigen wie wichtig es ist, zu verstehen wie Vorläuferzellen nach akuten Verletzungen aktiviert werden und reagieren. Diese Zellen könnten als therapeutische Quelle angesehen werden, um neuronale Differenzierung in Regionen zu ermöglichen, die sich weit entfernt von den Zonen der adulten Neurogenese (SVZ/SGZ) befinden (Buffo et al., 2008).

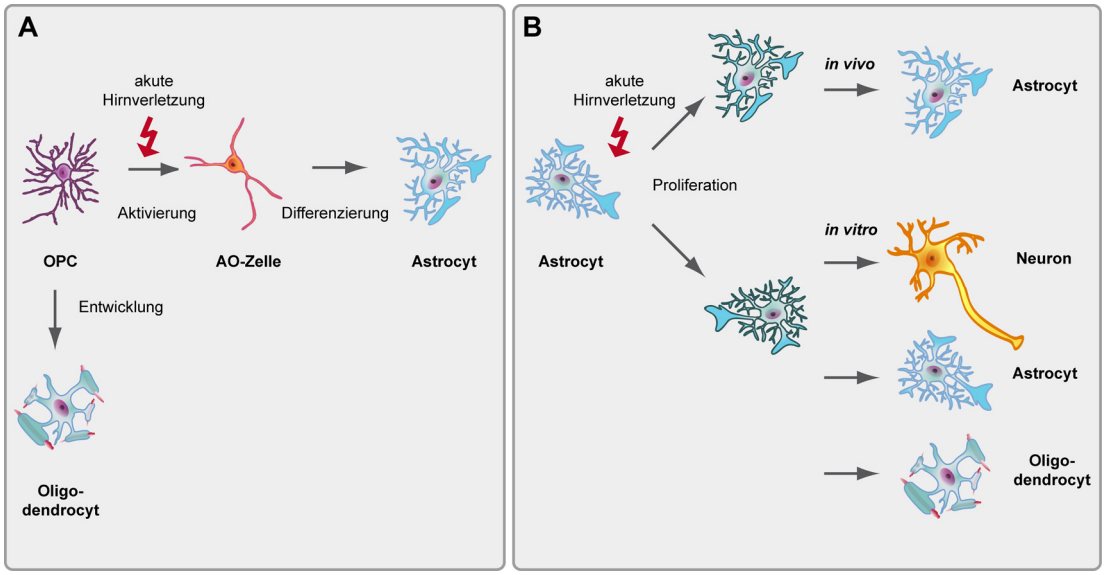


Abb. 30 Differenzierungspotential von OPCs und Astrocyten

A: Olig2/Sox10 positive OPCs entwickeln sich nach einer akuten Hirnverletzung über das transiente Zwischenstadium AO-Zellen zu reifen Astrocyten (in dieser Arbeit gezeigt). Diese OPCs differenzieren während der Entwickung zu reifen myelinisierenden Oligodendrocyten. B: In Buffo et al., 2008 wurde gezeigt, dass eine Subpopulation reifer Astrocyten nach einer akuten Verletzung proliferiert und diese Zellen *in vitro* das Potential zeigen neben Astrocyten auch Oligodendrocyten und Neurone zu bilden. *In vivo* erfolgt die Differenzierung zu reifen Astrocyten. Die Differenzierung von reifen Astrocyten aus OPCs lässt vermuten, dass diese spezielle Astrocyten-Subpopulation zu diesen multipotenten Astrocyten zu zählen ist und die Zellzahl nach einem akuten Trauma erhöht.

Interessant wäre, die Differenzierung aus OPCs (O-2A-Zellen) über AO-Zellen zu Astrocyten zu verfolgen. Dies wird durch Verwendung der der 2-Photonen-Mikroskopie in den doppelt-transgenen fluroeszenten Mäusen *in vivo* ermöglicht. Die genaue Differenzierung zu zeigen bleibt zukünftigen Studien überlassen. Dabei sollte die zeitliche Differenzierung der Zellen anhand der wechselnen Expression der fluoreszenten Proteine detektiert werden können. Zudem könnten verschiedene Wachstumsfaktoren eingesetzt werden, um zu prüfen, ob die Differenzierung beeinflusst werden kann.

5.3. Cre-Komplementierung als Koinzidenzdetektor für gliale Promotoraktivität

5.3.1. Rekombination nach Cre-Komplementierung während der embryonalen Entwicklung

Die hier in dieser Arbeit vorgestellte Rekombination nach Fragmentierung und anschliessender Komplementierung der Cre-Rekombinase, ist das erste Beispiel für eine *in vivo* Koinzidenzdetektion gleichzeitiger Genaktivität. In allen untersuchten Mauslinien konnte Reporter-Expression nicht nur nach einem kortikalen Hirntrauma gezeigt werden. Rekombination in verschiedenen neuralen Zellen wurde auch während der ZNS-Entwicklung detektiert.

Die Rekombinationshäufigkeit in Zellzahl und Zelltyp variierte in den untersuchten Linien während der Entwicklung. Alle Zellen zeigten EYFP-Reporter positive Astrocyten und NG2-Glia, drei Linien zeigten Rekombination auch in Oligodendrocyten der weißen Substanz oder in Projektionsneuronen in Kortex und Hippocampus.

Der humane GFAP-Promotor allein führt *in vivo* nach Rekombination zur Markierung von Astrocyten, Bergmann-Glia, Oligodendrocyten und Neuronen (Malatesta et al., 2003; Casper und McCarthy, 2006). Dies beruht auf der Aktivität des Promotors ab E12 in radialer Glia. Die Aktivierung des PLP-Promotors ab E9.5 induziert eine Rekombination in Neuronen und Oligodendrocyten, ab E13.5 in Oligodendrocyten wie auch Astrocyten (Leone et al., 2003; Delaunay et al., 2008). Zum Zeitpunkt E13.5 kann damit eine gleichzeitige Aktivität für beide Promotoren nachgewiesen werden. Sowohl alle GFAP-Promotor-aktiven radialen Glia als auch die gliogenen Vorläuferzellen mit Aktivität des PLP-Promotors sind positiv für den Transporter GLAST (Malatesta et al., 2003; Delaunay et al., 2008). Damit wird gezeigt, dass es eine Population von Vorläuferzellen geben könnte, in der sowohl der PLP- als auch der GFAP-Promotor aktiv sind. Diese Subpopulation von Zellen zeigt die koinzidente Aktivität beider Promotoren und führt in den Mauslinien zur Expression des Reporters in Astrocyten, NG2-Glia, Oligodendrocyten und Neuronen (siehe Abb. 31)

Untersucht man den Zeitpunkt der Rekombination können die ersten markierten Zellen erst bei E18.5 detektiert werden, obwohl publizierte Daten zeigen, dass GFAP und PLP-Promotor schon bei E12 aktiv sind. Die untersuchten Schnitte bei E12.5 und auch bei E15.5 zeigten aber in keiner der untersuchten Hirnregionen Rekombination. Ursache hierfür ist, dass zwischen der Expression der Cre-Fragmente, der Komplementierung, der anschliessenden DNA-Rekombination und der möglichen Detektion des Reporters eine gewisse Zeitspanne nötig ist. Unter Verwendung der intakten Cre-Rekombinase kann die benötigte Zeit zwischen Cre-Expression und Reporterdetektion immunhistochemisch gezeigt werden. Tage vor der detektierbaren

Reporterexpression kann die Cre-Rekombinase immunhistochemisch markiert werden (Delaunay et al., 2008). Unter Berücksichtigung, dass auch die Komplementierung weitere Zeit kostet, lässt sich die späte Detektion des EYFP-Reporteres ab E18.5 erklären.

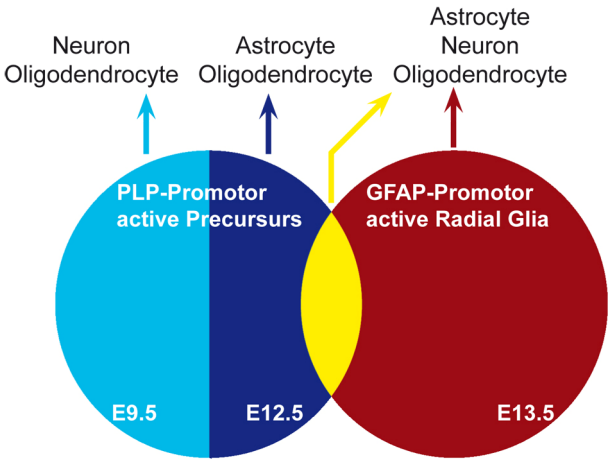


Abb. 31 Koinzidente Aktivität von GFAP- und PLP-Promotor während der Embryonalentwicklung

PLP-Promotor positive Vorläuferzellen sind ab E9.5 neurogen und differenzieren zu Neuronen und Oligodendrocyten. Ab E13.5 induziert die Aktivität des PLP-Promotors die Differenzierung von Vorläuferzellen zu Oligodendrocyten sowie Astrocyten. Ein Teil dieser Population exprimiert den glialen Transporter GLAST. Radiale Glia zeigt GFAP-Promotoraktivität ab E12 und diese Zellen sind GLAST-positiv. Dies zeigt, dass es eine Subpopulation von Zellen geben muss, die sich durch GLAST-Immunreaktivität auszeichnen, in denen der GFAP- wie auch der PLP-Promotor aktiv sind.

Die Resultate zeigen eindeutig eine Koinzidenz der Aktivität von PLP- und GFAP-Promotor während der Entwicklung. Das hier vorgestellte „Split Cre/loxP-System“ eröffnet daher alternative Möglichkeiten für Lineage-Analysen verschiedener Vorläuferzellen während der Entwicklung des ZNS. Die gleichzeitige Aktivierung verschiedener Promotoren kann als einschränkender Faktoren für die Markierung von Subpopulationen genutzt werden. Des Weiteren können in diesen Subpopulationen wichtige Zielgene, z.B. für Proliferation oder Differenzierung, über die Cre-Rekombination ausgeschaltet werden. Die wachsende Zahl von Mauslinien mit gefloxten Genen wird in der Zukunft zahlreiche konditionalen Deletionsstudien in Zellpopulationen ermöglichen. Über die Nutzung von Mäusen, in denen die Expression von Toxinrezeptoren (Diphtherietoxin-Rezeptor) nach Cre-Rekombination erfolgt (Brockschnieder et al., 2004; Buch et al., 2005), ist es möglich diese Subpopulationen gezielt nach Toxingabe zu eliminieren und die weitere Entwicklung des ZNS ohne sie zu verfolgen.

5.3.2. Postnatale Differenzierung der NG2-Glia

Im postnatalen Gehirn wurde die DNA-Rekombination in einer Vielzahl von NG2-positiven Zellen in verschiedenen Hirnregionen nachgewiesen. Die NG2-Immun reaktivität im postnatalen Gehirn wird sowohl verschiedenen Subgruppen von glialen Zellen (komplexe Gliazellen bzw. OPCs) als auch einer distinkten dritten Population von Makroglia (Synantocyten, Polydendrocyten bzw. NG2-Glia) zugeschrieben (Nishiyama, 2007).

Die Untersuchung des frühen postnatalen Gehirns in Mäusen mit Cre-Komplementierung zeigte, dass bei P2 weder im Großhirn noch im Cerebellum eine Kolokalisation von EYFP und NG2 detektiert werden kann. Zu diesem Zeitpunkt gibt es aber sehr viele Vorläuferzellen die NG2-positiv sind. Zu keinem anderen Zeitpunkt der Entwicklung des zentralen Nervensystems gibt es diese hohe Anzahl NG2-positiver Zellen. Es ist daher wahrscheinlich, dass die im adulten ZNS gefundenen NG2-Zellen mit nachgewiesener DNA-Rekombination aus postnatalen NG2-negativen Vorläuferzellen stammen.

Die Morphologie der NG2-positiven Zellen im adulten Gehirn entspricht der von beschriebenen Polydendrocyten (Nishiyama, 2007). Die rekombinierten NG2-Zellen zeigten die typischen feinen, sehr langen Fortsätze und sind daher einfach von protoplasmatischen Astrocyten unterscheidbar, die kürzere, dickere Fortsätze zeigen (Nishiyama, 2007). Die rekombinierten NG2-Zellen waren zu keinem der untersuchten Zeitpunkte gleichzeitig positiv für GFAP und NG2. Es konnten aber viele rekombinierte NG2-Zellen identifiziert werden, die in direktem Kontakt zu protoplasmatischen Astrocyten stehen. Diese Daten deuten auf eine direkte strukturelle Interaktion zwischen den beiden Zelltypen hin. NG2-Glia können auf eine Aktivierung durch Astrocyten über ATP ebenfalls mit Ca^{2+}-Konzentrationsänderungen (Ca^{2+}-Wellen) antworten. NG2-Zellen wie auch Astrocyten reagieren auf neuronale Aktivität *in situ* womit eine ATP-vermittelte Kommunikation (Gliotransmitter) zwischen Astrocyten und NG2-Glia existiert (Wigley et al., 2007). Diese Kommunikation ist durch die enge Interaktion der astrocytären wie auch NG2-glialen Fortsätzen gewährleistet.

5.4. Funktionelle Koinzidenzdetektion mit rekombinanten Viren

Rekombinante adeno-assoziierte Viren (rAAV) sind ein attraktives Werkzeug um genetisch einen Einfluss auf das ZNS zu nehmen Sie sind nicht toxisch und lösen im Allgemeinen keine Entzündungsreaktion im Nervengewebe aus. Durch die hohe Flexibilität sind virale Infektionen eine häufig genutzte Methode geworden, Zellen *in vivo* genetisch zu markieren oder zu modifizieren. Im Gegensatz zu transgenen Mausmodellen ist die Erzeugung rekombinanter Viren schnell und ihr Einsatz ist zu jedem Zeitpunkt während der Hirn-Entwicklung bzw. während der Progression einer Krankheit möglich. Aus diesem Grund wurde die Funktionalität der Komplementierung

der Cre-Fragmente auch getestet werden, wenn ihre Expression von rekombinanten adeno-assoziierten Virenvektoren gesteuert wird (During et al., 2003). Hierzu wurde der Fokus auf interneuronale Promotoren gelegt, da die Klassifizierung von interneuronalen Subpopulationen eine wichtige Fragestellung ist (Monyer und Markram, 2004; Markram et al., 2004). Als interneuronale Promotoren wurden der GAD67-Promotor ausgewählt, der die Expression des GABA-synthetisierenden Enzyms Glutamatdecarboxylase (*glutamatic acid decarboxylase* = GAD67) steuert, des Weiteren der Promotor für das Neurohormon Cholecystokinin (CCK). Beide sind spezifisch im Gehirn für Subpopulationen von Interneuronen. Für Kontrollzwecke wurden auch Viren hergestellt, die die beiden Cre-Fragmente unter der Kontrolle des humanen GFAP-Promotors steuern. Die gleichzeitige Infektion mit Viren, die die beiden Cre-Fragmente unter dem gleichen Promotor steuern, führt zur Rekombination in den erwarteten Zellen. Mit GAD67-C/N-Cre-Viren im Hippocampus erfolgte die Markierung von Parvalbumin positiven-Interneuronen, die Injektion von GFAP-C/N-Cre-Viren in den Kortex führte zur Rekombination in protoplasmatischen GFAP-positiven Astrocyten. Die Ko-Injektion von CCK-NCre und GAD67-CCre markierte Parvalbum bzw. Calretinin-positive Interneurone. Das letzte Experiment zeigte, dass die Koinzidenzdetektion interneuronaler Promotoren mit Hilfe der Cre-Komplementierung möglich ist.

Die Nutzung des regulatorischen posttranskriptionalen Elements WPRE (*woodchuck posttranscriptional regulatory element*) fördert die cytoplasmatische Akkumulation und Translation der mRNA, was in einer deutlich höheren Expression resultiert (Fitzsimons et al., 2002). Aber auch die Nutzung von viralen Vektoren im ZNS ist limitiert. Ein genaues Verständnis des Infektionsprozesses ist wichtig, um Einschränkungen zu überwinden und die Nutzung der rAAVs zu optimieren. Alle bekannten Serotypen gelangen über eine Rezeptor-vermittelte Endocytose in die infizierten Zellen (Buning et al., 2008). Durch Variationen der Aminosäurezusammensetzung des Capsids, differieren die Serotypen in den genutzten Rezeptoren, die sie für die Infektion der Zelle nutzen. Bestimmte Serotypen sind geeigneter um Gliazellen bzw. Neurone zu untersuchen (Buning et al., 2008). Dies erklärt auch die hier gefundene Rekombination in Pyramidenneuronen nach Infektion der Viren, die die Expression unter glialen bzw. interneuronalen Promotoren kontrollierten. Der verwendete Serotyp 2 ist geeignet um Projektionsneurone zu infizieren (Burger et al., 2005). Besonders bei einem erhöhten Titer der Viren kann eine Expression der Cre-Fragmente in anderen Zelltypen nicht ausgeschlossen werden.

Unter Nutzung von rAAVs kann die Cre-Komplementierung verwendet werden, um in vielen Zelltypen auch ausserhalb des ZNS Zell-Lineage-Studien oder konditionale Deletionen durchzuführen. Die Daten demonstrieren, dass die Cre-Komplementierung in verschiedenen Modellsystemen angewandt werden kann und unabhängig vom zellulären Kontext ist.

5.5. Cre-Komplementierung als neue neurobiologische Methode

5.5.1. Hohe DNA-Rekombinase Aktivität nach Cre-Komplementierung

Die Komplementierung der Cre-Rekombinase bei Expression beider Fragmente unter dem gleichen Promotor wurde untersucht, um die Ergebnisse mit den Rekombinationen der intakten Cre-Rekombinase unter Verwendung der glialen Promotoren zu vergleichen. Die Analyse der postnatalen Expression des EYFP-Reporters nach Komplementierung durch die Aktivierung des PLP-Promotors ergab Rekombination in Oligodendrocyten, Astrocyten wie auch Neuronen in allen untersuchten Hirnregionen, was der Rekombination in publizierten Mauslinien entspricht. Der PLP-Promotor ist ab E9.5 in der Ventrikularschicht des Mittelhirns (Diencephalon) aktiv (Ikenaka et al., 1992; Timsit et al., 1992; Timsit et al., 1995). Bei E13.5 können Zellen identifiziert werden, die Marker wie Nestin, GLAST und BLBP exprimieren (Delaunay et al., 2008). Im postnatalen Gehirn konnte die Rekombination in reifen myelinisierenden Oligodendrocyten, protoplasmatischen Astrocyten, Ependymzellen und NeuN- bzw. Calretinin-positiven Neuronen im Diencephalon gezeigt werden. Die Verwendung einer induzierbaren TgN(PLP-CreERT2)-Maus (Leone et al., 2003) zeigte dass die Reporter-positiven Zellen bei E9.5 sich hauptsächlich zu Neuronen differenzieren (~95 %). Die Zellen, die nach E13.5 rekombinieren, differenzieren sich dagegen hauptsächlich zu Gliazellen (Astrocyten, Olig2-positive Vorläuferzellen). PLP-Promotor aktive Zellen sind bei E9.5 neurogen und ab E13.5 gliogen (Le et al., 2005). Im Rückenmark werden Oligodendrocyten und Motorneurone von einer gemeinsamen frühe Vorläuferzelllinie gebildet (Richardson et al., 2000; Kessaris et al., 2001). Zu einem späteren Zeitpunkt generieren dann aber die GPRs (*glial restricted precursors*) Oligodendrocyten und Astrocyten (Gregori et al., 2002). Wichtig zu beachten ist, dass die Studien in verschiedenen Hirnregionen gemacht wurden und daher nicht vollständig miteinander verglichen werden können.

Die Komplementierung nach Expression unter der Kontrolle des GFAP-Promotors führt zur Rekombination von Astrocyten, Oligodendrocyten und Neuronen in allen untersuchten Hirnregionen. Die Rekombination nach Komplementierung der Cre-Rekombinase gesteuert durch den GFAP-Promotor ist identisch mit bisher publizierten Daten. Die Verwendung transgener Mauslinien die unter Kontrolle des GFAP-Promotors die komplette Cre-Rekombinase exprimierten, zeigte ebenfalls Rekombination in Astrocyten, Oligodendrocyten und Neuronen *in vivo* (Zhuo et al., 2001; Malatesta et al., 2003; Casper und McCarthy, 2006). Die Cre-Rekombinase ist z.B. ab E12 im cerebralen Kortex detektierbar und kolokalisiert mit radialen Gliamarkern wie GLAST. Die Mehrzahl der Projektionsneurone im Neokortex differenziert aus radialer Glia, während Parvalbumin-, Calbindin- oder Calretinin-positive kortikale Interneurone nicht von dieser Lineage abstammen (Malatesta et al., 2003). Neben Neuronen und

Astrocyten rekombinieren auch viele Oligodendrocyten in den myeliniserenden Trakten des Cerebellums, des Corpus Callosum, des Thalamus und des Rückenmarks und gehen damit ebenfalls auf einen Vorläufer zurück, in dem der GFAP-Promotor aktiviert ist (Casper und McCarthy, 2006). Auch die Rekombination in GABAergen Interneuronen konnte in vielen untersuchten Regionen nachgewiesen werden (Casper und McCarthy, 2006). In den hier verwendetetn Tieren, in denen die Cre-Rekombinase unter dem GFAP-Promotor komplementiert, konnten all diese Zelltypen detektiert werden. Eine Ausnahme bilden die Interneurone, die in keiner der untersuchten Mauslinien nachgewiesen werden konnte. Die Population von NG2-Zellen, die nach Cre-Komplementierung detektierbar ist, wurde in den bisherigen Publikationen nicht untersucht.

Zu beobachten waren aber regionale Unterschiede zwischen den verglichenen Mauslinien mit Cre-Komplementierung. Beim Vergleich der Linien mit Cre-Komplementierung unter dem PLP-Promotor und der Rekomination des intakten Enzyms unter Kontrolle des PLP-Promotors (Delaunay et al., 2008) zeigte sich, dass die Art und Anzahl der rekombinierten Zellen zwar differierte aber nicht unwesentlich auseinander lag. Die *in vitro*-Daten zeigten, dass die Effektivität der komplementierten Cre-Rekombinase bei ungefähr 30% verglichen mit dem kompletten Enzym lag (Jullien et al., 2003; Casanova et al., 2003). Vergleiche der Rekombinationshäufigkeit zwischen der intakten Cre-Rekombinase und den Cre-Fragmenten nach Komplementierung zeigen, dass die hier gezeigete DNA-Rekombination *in vivo* in den hier verwendeten Mauslinien höher einzuschätzen ist. Die Anzahl rekombinierter Zellen ist in vielen Hirnregionen ähnlich hoch wie nach Rekombination des intakten Enzyms.

Die Rekombination nach Cre-Komplementierung gesteuert unter den glialen Promotoren GFAP und PLP ist vergleichbar mit der Rekombination des nicht-komplementierten Enzyms. Die hier während der Entwicklung induzierte Cre-Komplementierung unter dem GFAP- bzw. PLP-Promotor liefert dasselbe Ausmaß an Rekombination wie eine intakte PLP- oder GFAP-Promotor gesteuerte Cre-DNA-Rekombinase. Wir können daher davon ausgehen, dass die Cre-Komplementierung ein sehr mächtiges genetisches Werkzeug für *in vivo*-Anwendungen darstellt.

5.5.2. Cre-Komplementierung als neues System

Neben der hier erfolgreich gezeigten Cre-Komplementierung (Casanova et al., 2003; Jullien et al., 2003; Jullien et al., 2007) wurden unter anderem auch die folgenden Proteine komplementiert, um z.B. Protein-Protein-Interaktionen zu klären: GFP/YFP (Magliery et al., 2005; Hu et al., 2002), die β-Galctosidase (Ullmann et al., 1965; Rossi et al., 1997) sowie die TEV-Protease (Protease des *Tobacco Etch Virus*; (Wehr et al., 2006). Die Komplementierung und damit Rekonstitution von fluoreszenten Proteinfragmenten ist von Vorteil, da hier der funktionale Proteinkomplex direkt in

lebenden Zellen visualisiert werden kann (Zhang et al., 2004b; Kerppola, 2006). Trotzdem erreicht man mit bimolekularer Fluoreszenzkomplementierung nur ein transientes Signal in den untersuchten Zellen (Hu et al., 2002). Die irreversible Modifikation der DNA mit Hilfe der Cre-Komplementierung hingegen verwandelt ein transientes Signal (hier: Expression beider Cre-Hälften bei koinzidenter Aktivität der Promotoren) in ein permanentes Signal (Reporterexpression nach DNA-Modifikation). Die publizierten *in vitro* Daten der Cre-Komplementierung zeigten, dass die Fragmentierung der Cre-Rekombinase und spätere Zusammenführung zu einem aktiven Enzym führt, dessen Aktivität *in vitro* unterhalb der normalen Enzymaktivität liegt (Jullien et al., 2003; Casanova et al., 2003). Die Ermittlung der gleichzeitigen Aktivität bestimmter Promotoren über den Ansatz einer fragmentierten Cre-Rekombinase und damit die Markierung einzelner Subpopulationen von Zellen ermöglicht die Detektion während und nach ihrer Entwicklung *in vivo*. Allein im ZNS gibt es viele Zellen, deren Einteilung in funktionelle Subtypen ein noch nicht geklärtes Problem ist. Hierzu gehören wie schon erwähnt Astroglia, OPCs und Interneurone. Aber auch ausserhalb des ZNS kann das System der Cre-Komplementierung eingesetzt werden um bestimmte Zellpopulationen zu untersuchen. Denkbar ist auch eine Markierung von Zellen, in denen z.B. die gleichzeitige Aktivierung von Transkriptionsfaktoren zur Rekombination führt. In diesem Fall müsste die Expression der Cre-Fragmente nach Transkriptionsfaktorbindung an die DNA gestartet werden.

Für die Dimerisierung und Komplementierung der Cre-Fragmente wurde die Interaktionsdomäne eines Transkriptionsfaktors aus *Saccharomyces cerevisiae* (Hefe) ausgewählt, um das Risiko, dass diese Interaktionsdomäne mit endogenen Coiled-Coil-Domänen des Mausproteoms interagiert, zu minimieren. Es wurde die Coiled-Coil-Domäne des GCN4-Transkriptionsfaktors verwendet, von der gezeigt wurde, dass sie stabile Dimere bildet (Hope und Struhl, 1987). Zudem wurde sie *in vitro* eingesetzt und führte zu einer stabilen Komplementierung der Dihydrofolat-Reduktase und der TEV-Protease (Pelletier et al., 1998; Wehr et al., 2006). Obwohl nicht auszuschliessen ist, dass die Cre-Konstrukte an endogene Proteine binden und so mit zellulären Signaltransduktionsprozessen interferieren, ist eine artefizielle Beeinträchtigung unwahrscheinlich. In den verschiedenen erzeugten transgenen Mauslinien konnten keine Verhaltensauffälligkeiten bezogen auf Zucht- und Käfigverhalten sowie die Expression zellulärer Marker beobachtet werden.

6. ZUSAMMENFASSUNG

Transgene Mausmodelle mit fluoreszenter Proteinexpression unter der Kontrolle zelltyp-spezifischer Promotoren ermöglichen es neurale Zelltypen in gesundem wie geschädigtem Gewebe zu visualisieren. In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, welche Auswirkungen akute Hirnverletzungen auf Astrocyten und Oligodendrocyten haben. Dafür wurde eine Mauslinie verwendet, die in Astrocyten EGFP unter dem Promotor des sauren Gliafaserproteins (GFAP) und in Oligodendrocyten DsRed1 unter der Kontrolle des Proteolipidprotein-Promotors (PLP) exprimiert. Zwei verschiedene Hirn-Trauma-Modelle wurden für die Untersuchungen herangezogen: die kortikale Stichverletzung und die mittlere cerebrale Arterienocclusion, die als Analogon zum Hirnschlag angesehen wird. In beiden Modellen konnten posttraumatisch Zellen identifiziert werden, die sowohl EGFP als auch DsRed1 exprimierten, und damit gleichzeitig astro- wie oligodendrogliale Eigenschaften zeigten. Diese AO-Zellen (für astroglial und oligodendroglial) erschienen frühestens drei Tage nach der Verletzung in unmittelbarer Nähe zum Verletzungsherd. Sie konnten aber bereits 15 Tage nach der Verletzung nicht mehr detektiert werden. Die immunhistochemische Analyse zeigte, dass die AO-Zellen mit Markern für oligodendrogliale Vorläuferzellen markiert werden können, aber keine neuronalen Eigenschaften besitzen.

Um die weitere Differenzierung der AO-Zellen zu verfolgen, wurden neue transgene Mausmodelle hergestellt, die unter GFAP- und PLP-Promotor Fragmente der Cre-DNA-Rekombinase exprimierten. Die Komplementierung dieses Proteins führt zu einem aktiven Enzym, das in der Lage ist LoxP-flankierte DNA-Sequenzen zu schneiden. Die Verwendung eines Reportersystems mit Stop-gefloxter EYFP-Kassette im ROSA26-Locus (TgH(ROSA26-flox-Stop-flox-EYFP)$_{ROSY}$) ermöglichte die Visualisierung der Rekombination in Zellen mit erfolgreicher Komplementierung.

Die Verwendung der neuen doppelt-transgenen Mausmodelle zeigte eine simultane Aktivierung von GFAP- und PLP-Promotor in der embryonalen Entwicklung der Mäuse, was zur Markierung von Gliazellen (hauptsächlich protoplasmatische Astrocyten und NG2-Glia) führte. Ebenso konnten Zellen mit DNA-Rekombination als Zeichen der koinzidenten Promotor-Aktivität auch nach akuten Hirnschädigungen beobachtet werden. Acht Tage nach der Verletzung wurden die ersten Zellen mit DNA-Rekombination detektiert. Vier bis acht Wochen später zeigte sich die Differenzierung zu protoplasmatischen, GFAP-positiven Astrocyten.

Um den Anwendungsbereich der Cre-Komplementierung weiter zu testen, wurden rekombinante adeno-assoziierte Viren verwendet und die beiden Cre-Fragmente unter glialen bzw. interneuronalen Promotoren exprimiert. Die Injektion in den Kortex bzw. den Hippocampus der ROSY-Reportermäuse führte zur selektiven Markierung von Gliazellen bzw. Interneuronen.

Die Verwendung der neuen transgenen Mausmodelle ist das erste Beispiel einer *in vivo* Komplementierung unter Verwendung zweier verschiedener Promotoren und damit ein Beispiel für eine *in vivo* Koinzidenzdetektion zweier Promotoren. Dieser Ansatz zeigt, dass es 1. möglich ist *in vivo* die Cre-Rekombinase zu komplementieren und so einen Subtyp von Zellen (hier gezeigt für Gliazellen und Interneurone) zu markieren und dass 2. während einer Läsion Oligodendrocytenvorläuferzellen aktiviert werden, die sich zunächst zu AO-Zellen mit oligodendroglialen als auch astroglialen Eigenschaften differenzieren, und anschliessend protoplasmatische Astrocyten werden. Die hier gefundenen Zellen haben das Potential als Vorläuferzellen für reife Astrocyten im Verletzungsfall des ZNS zu dienen.

7. SUMMARY

The use of transgenic mouse models with green fluorescent astrocytes and red fluorescent oligodendrocytes allows the direct visualisation of cellular responses in the healthy and injured brain. After acute traumatic lesions or ischemic stroke in the neocortex fast neuronal and glial cell death is frequently observed. Activations of different glial cells like astroglia, oligodendrocytes and microglia cells are sequelae of secondary injury processes. A complex and not yet understood sequence of cellular responses initiate functional recovery after such neurodegenerative processes.

Here, we applied cortical stab wound lesioning and middle cerebral artery occlusion (MCAO, an animal model of ischemic stroke) to characterize the responses of glial cells such as astrocytes and oligodendrocytes in close proximity to the lesion site. Three days after the lesion, we detected glial cells that displayed, both, astro- and oligodendroglial properties recognized by a simultaneous expression of GFAP- and PLP-promoter driven EGFP and DsRed1. Therefore, these cells were designated AO cells. Since AO cells could be labelled by the oligodendroglial progenitor markers Olig2 and Sox10, but not for neuronal or mature astrocyte markers, we classified them as activated oligodendroglial progenitor cells (OPC). Since AO cells disappeared about 15 days after the injury, we could not follow their fate in the double-transgenic fluorescent mice. Therefore, we developed a mouse model in which the transient signal, i.e. co-activity of GFAP and PLP promoter upon injury, could be switched into a permanent one.

Cre/LoxP recombination is the gold standard for conditional gene modification *in vivo*. The Cre DNA recombinase recognizes loxP sites and catalyzes DNA excision between two loxP sites. Here, we designed inactive "split-Cre" fragments that regain enzymatic activity upon overlapping activity of two different promoters. We took advantage of the functional complementation of split Cre DNA fragments as coincidence detectors and generated transgenic mice in which N- and C-terminal Cre fragments (NCre and CCre) were targeted by the GFAP and PLP promoter. In cells of these transgenic mice (crossed to a ROSA26 reporter mouse) the fragments complemented each other when both promoters were simultaneously active. The functional Cre recombinase with reconstituted enzyme activity modified DNA sequences with flanking loxP sited. Using these new transgenic mouse lines we could show that after acute injuries AO cells differentiate into protoplasmatic GFAP-positive astrocytes *in vivo*. Additionally, in the brain of transgenic mice with coincident activities of PLP- and the GFAP promoter during development, we could genetically define a subgroup of progenitor cells that give rise to glial cells (astrocytes, oligodendrocytes and NG2-glia) and neurons.

Due to its flexibility viral infection has become a common tool to genetically label or modify cells *in vivo*. The broad-range applicability of the split-Cre system was confirmed, when we used adeno-associated viral gene transfer to express NCre and CCre fragments. A subset of interneurons was labeled by the using GAD67- and CCK promoters to express split-Cre *in vivo*.

8. ANHANG I

8.1. Komplementierungssysteme

Einge Proteine/Enzyme ergeben nach Fragmentierung zusammengefügt wieder einen funktionalen Komplex. Dazu gehören die Ribonuclease ((Richards, 1958), die β-Galactosidase ((Ullmann et al., 1965; Rossi et al., 1997), die Dihydrofolate Reductase (Pelletier et al., 1998) sowie die fluoreszenten Proteine GFP und YFP (Magliery et al., 2005; Hu et al., 2002). Die Fusion von YFP-Hälften mit der basischen Region der Leucin-Zipper-Domäne zeigte erstmals, dass Komplementierung mit fluoreszenten Proteinen möglich ist (Hu et al., 2002).

Ein weiteres Beispiel, das *in vitro* erfolgreich angewendet werden kann, ist das Split/TEV-System. Durch Verwendung inaktiver Fragmente der TEV Protease (Protease des *Tobacco Etch Virus*), die ihre Aktivität wiedererlangen, wenn sie zusammen exprimiert werden, kann zur Analyse von Protein-Protein-Interaktionen verwendet werden. Die funktionelle Wirkung der TEV Protease kann durch passende Reportersysteme gezeigt werden (Wehr et al., 2006). Die Funktionalität ist in der Abbildung 30 B gezeigt. Das Split-Tev-System wurde eingesetzt, um die Neuregulin-induzierte ErbB2/ErbB4-Rezeptorheterodimerisierung zu zeigen (Wehr et al., 2006).

Andere Komplementierungsansätze nutzten die Cre-Rekombinase (Casanova et al., 2003; Jullien et al., 2003). Es konnte gezeigt werden, dass die Komplementierung der Rekombinase zur Modifikation der DNA führt. Dabei wurden bisher zwei verschiedene Systeme publiziert. Zum einen die Expression zweier Cre-Hälften unter der Kontrolle zweier Promotoren und so die selektivere Markierung von Zellen nach Dimerisierung der Hälften (α-Komplementierung) (Casanova et al., 2003). *In vitro* besitzen die beiden Cre-Fragmente nach erfolgreicher Komplementierung ca 30 % der Aktivität des intakten Enzyms (Casanova et al., 2003). In einem ähnlichen Ansatz werden beide Cre-Hälften unter dem gleichen Promoter exprimiert, dabei aber mit mit FKBP12 (*FK506-binding protein*) bzw. FRB (Bindungsdomäne des FKBP12-Rapamycin-assoziierten Proteins) fusioniert. Beide Fragmente können nur bei Zugabe von Rapamycin komplementieren und ein aktives Enzym bilden (Jullien et al., 2003). Diese Variante entspricht der zeitlich induzierbaren Variante CreERT2, bei der die Ligandenbindungsdomäne des Östrogenrezeptors mit Cre fusioniert wurde und nach Tamoxifengabe Cre-Aktivität induziert (Brocard et al., 1997, Metzger et al., 1995) (Feil et al., 1996; Schwenk et al., 1998; Hirrlinger, Scheller et al., 2006). Es konnte gezeigt werden, dass der gleichzeitige Knockin der beiden Cre-Hälften in den ROSA26-Locus *in vivo* nach Rapamycin-Gabe zur Dimerisierung der Hälften führt und verschiedene Reportermäuse Rekombination zeigen (Jullien et al., 2007).

Die Fusion zweier Cre-Fragmente mit der Coiled-coil-GCN4-Interaktionsdomäne führt *in vitro* zu einem stabilen funktionalen Enzym (Beate Kellert, Diplomarbeit Max-Planck-Institut für experimentelle Medizin/Universität Göttingen, 2006). Vorteil ist hier, dass die Fragmente *in vitro* genutzt werden können, um die Interaktion von Proteinen zu identifizieren, *in vivo* um eine koinzidente Interaktion von Promotoren zu zeigen. Der Ansatz die Cre-Kompelementierung zu nutzen um die koinzidente Aktivität zweier Promotoren zu zeigen ist in der Abbildung 30 C dargestellt. In dieser Arbeit wurden dafür der GFAP- und PLP-Promotor (in transgenen Mäusen) sowie der GAD67- und der CCK-Promotor (rekombinante adenoo-assoziierte Viren) genutzt.

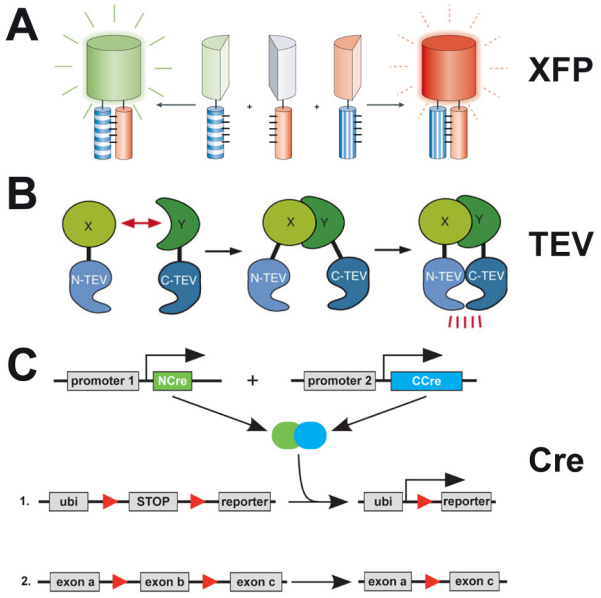


Abb. 32 Anwendungsbeispiele für Komplementierungen mit biologischer Relevanz

A: Komplementierung von XFPs erlaubt die simultane Visualisierung von multiplen Protein-Interaktionen in der gleichen Zelle. Der Ansatz basiert auf der Komplementierung von Fragmenten verschiedener XFPs mit verschiedenen spektralen Eigenschaften. Je nachdem welche Fragmente einen Komplex bilden, ergibt sich eine andere Emission der komplementierten Proteine (nach (Hu und Kerppola, 2003). B: Das Split-Tev-System komplementiert eine funktionsfähige Protease des *Tobacco Etch Virus* (TEV-Protease) aus inaktiven Fragmenten. Diese Protease ist nur aktiv, wenn fusionierte Konstrukte miteinander interagieren. Die Verwendung von fluoreszenten bzw. lumineszenten Reportersystemen ermöglicht eine Visualisierung der TEV-Aktivität (nach (Wehr et al., 2006). C: Die Cre-Komplementierung nutzt ein ähnliches Verfahren. Inaktive Fragmente der Cre-Rekombinase komplexieren zu einen funktionsfähigen Enzym, wenn die Cre-Fragmente in der gleichen Zelle exprimiert werden. Sie fusionieren über die Interaktion der GCN4-Coiled-Coil-Domänen.

8.2. Cre-Komplementierung

8.2.1. PLP-Promotor kontrollierte Cre-Komplementierung

PCR-positive Founder wurden mit C57/Bl6-N-WT-Tieren verpaart. Die PCR-positiven F1-Nachkommen wurden getötet, das Gehirn entnommen und in flüssigem Stickstoff tiefgefroren. Anschließend wurden die gefrorenen Hirne für die Analyse im Western Blot präpariert. Als Kontrolle wurden transfizierte Zelllysate (COS1-Zellen) mit den C- und N-terminalen Cre-Konstrukten eingesetzt.

Die NCre-Hälfte wurde über den fusionierten Flag-Tag, die CCre-Hälfte (mit Myc-Tag) über einen polyklonalen Cre-Antikörper detektiert.

Im Western-Blot konnten zwei transgen exprimierende Linien für die CCre-Hälfte unter dem PLP-Promotor identifiziert werden: PLP-CCre(K) und (R) (Abb. 31 A) sowie drei transgen exprimierende Linien mit der Expression des NCre-Fragments: PLP-NCre(A)/(C) und (D) (Abb. 31 B). Diese fünf Linien zeigten jeweils detektierbares Protein in der proteinchemischen Analyse per Western Blot. Die restlichen Linien, die kein nachweisbares Protein exprimierten, wurden getötet.

8.2.2. GFAP-Promotor kontrollierte Cre-Komplementierung

PCR-positive Founder wurden mit WT-Mäusen des Stammes C57/Bl6-N verpaart und transgene Tiere nach der PCR-Analyse für den Western Blot präpariert. Auf diese Weise konnte ein Tier detektiert werden, dass unter der Kontrolle des GFAP-Promotors das CCRe-Fragment exprimert: GFAP-CCre(F) (Abb. 31 C). Auffällig ist, dass die Bande des GFAP-CCre-Tieres tiefer läuft, als die Bande der transfizierten COS1-Zellen sowie das Lysat des ebenfalls mit aufgetragenem Tieres der Linie PLP-CCre(K).

Leider war es nicht möglich, GFAP-NCre-Founder durch Western Blot-Analyse zu detektieren. Daher wurde die Analyse der GFAP-NCre-Founder mittels Immunhistochemie nach Verpaarung mit Tieren, die die CCre-Hälfte exprimierten, sowie dem ROSY-Reporter durchgeführt. Tiere mit beiden Cre-Hälften und dem Reporter wurden perfundiert und immunhistochemisch auf EYFP-Expression hin analysiert. Auf diese Weise konnten vier GFAP-NCre-Founder identifiziert werden: GFAP-NCre(Q)/(T)/(V) und (W). Mit diesen vier Tieren wurden dann gezielt die Western Blot-Analysen wiederholt, aber es konnte bei keinem Tier eine NCre-Bande detektiert werden. Die Linie GFAP-NCre(Q) wurde nicht weiter vewendet. Bemerkenswert ist aber, dass ein doppelt-transgenes Tier, welches beide Cre-Fragmente exprimiert (GFAP-CCre(F)/NCre(V)) mehr CCre exprimiert, als ein Tier, dass nur das CCre-Fragmente allein expimiert (GFAP-CCre(F)). Es wurden in beiden Fällen die gleichen Proteinmengen aufgetragenen.

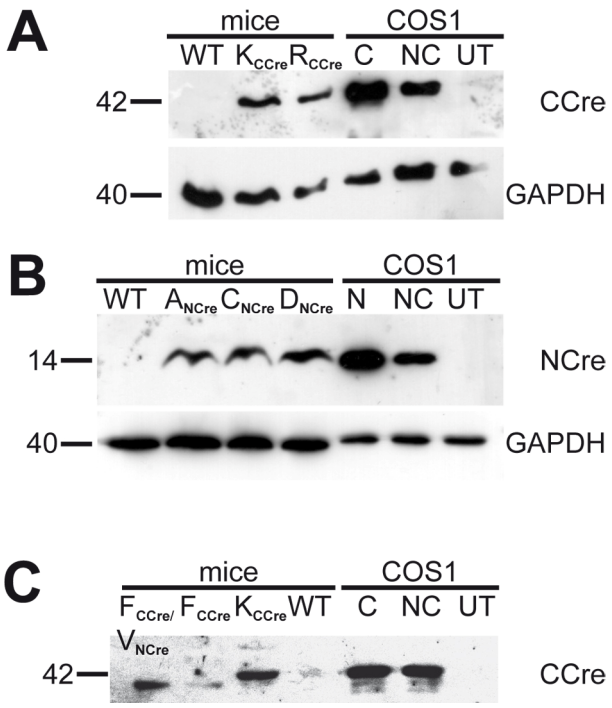


Abb. 33 Western Blot-Analyse der PLP-C/NCre- bzw. der GFAP-C/NCre-Founder

Hirnlysate positiver Tiere der Linien PLP-CCre(K) (K_{CCre}) und PLP-CCre(R) (R_{CCre}) wurden getestet. Als Negativkontrolle wurden Hirnlysate von WT-Mäusen bzw. untransfizierte COS1-Zelllysate aufgetragen. Als Positivkontrolle wurden Proteinlysate von Zellen verwendet, die entweder mit CCre oder mit beiden Cre-Fragmenten transfiziert wurden. Der C-terminale Teil der Cre-Rekombinase hat eine Größe von 42 kDa. In B sind Hirnlysate von Tieren der Linien PLP-NCre(A) (A_{NCre}), PLP-NCre(C) (C_{NCre}) sowie PLP-NCre(D) (D_{NCre}) gezeigt. Der N-Terminus der Cre-Rekombinase wurde über einen Flag-Tag detektiert und hat eine Größe von 14 kDa. Als Kontrolle wurden Proteinlysate von COS1-Zellen aufgetragen, die entweder mit NCre oder mit beiden Cre-Fragmenten transfiziert waren. Als Negativkontrolle wurden untransfizierte Zelllysate bzw. Hirnlysate aus WT-Mäusen aufgetragen. Als Kontrolle für die aufgetragenen Menge Protein wurde wurde in den Blots ein α-GAPDH-Antikörper verwendet. In C wurden GFAP-Cre-Tiere aufgetragen. Es wurden Hirnlysate der Tiere der Linie GFAP-CCre(F) (Bande 2; F_{CCre}) als auch Hirnlysate doppelt-transgener Tiere mit der zweiten N-terminalen Cre-Hälfte aufgetragen (GFAP-CCre(F)/NCre(V), F_{CCre} + V_{NCre}). Als Positivkontrolle wurde das Hirnlysat eines PLP-CCre-Tieres (Linie PCCK, K_{CCre}) und transfizierte COS1-Zelllysate mit dem C-Cre-Fragment bzw. mit beiden Konstrukten benutzt. Als Negativkontrollen wurden Hirnlysate von WT-Mäusen sowie untransfizierte COS1-Zelllysate verwendet. Die CCre-Fragmente wurden mit einem polyklonalem Cre-Antikörper und die NCre-Fragmente mit einem monoklonalem Flag-Antikörper detektiert.

8.2.3. Unterschiede zwischen PLP-Cre-Komplementierung und der intakten Cre-Rekombinase

In der Abb. 32 ist die Rekombination anhand der Markerexpression in verschiedenen Hirnregionen bei den Linien PLP-CCre(K)/NCre(A), PLP-CCre(R)/NCre(D) sowie der Linie PLP-Cre(F) (erstere beide PLP-Cre-Komplementierung, letztere Linie PLP-Cre (PLCF; Sandra Göbbels, Delaunay et al., 2008) gezeigt. Deutlich wird, dass sich die Linien in der Anzahl der rekombinierten Zellen unterscheiden. Die rekombinierten Zelltypen sind in allen untersuchten Hirnregionen gleich. Es können rekombinierte Oligodendrocyten, Astrocyten und Neurone identifiziert werden. Es sind auch einige NG2-Glia rekombiniert, die aufgrund ihrer Morphologie leicht erkennbar sind. Kortex (ctx), Striatum (str), Cerebellum (cb), die weiße Substanz des Cerebellums (cb wm), das Corpus Callosum (cc) und die CA1-Region des Hippocampus (CA1) werden miteinander verglichen. Im Cerebellum sind Bergmann Glia zusammen mit benachbarten Purkinjezellen rekombiniert.

8.2.4. Rekombination nach GFAP-Promotor kontrollierter Cre-Komplementierung

Die Rekombination der Linie GFAP-CCre(F)/NCre(V) zeigt die Rekombination nach Komplementierung der Cre-Rekombinase, wenn die beiden Cre-Fragmente durch den GFAP-Promotor gesteuert werden. Es gibt rekombinierte Zellen in allen untersuchten Hirnregionen des ZNS, gezeigt werden Bulbus Olfactorius (bo), Kortex (ctx), Hippocampus (HC), Thalamus (thal), Hypothalamus (hypothal), Corpus Callosum (cc) und die weiße Substanz des Cerebellums (cb wm). Identifiziert werden können alle Klassen der makroglialen Zelltypen (Astrocyten, Oligodendrocyten (nicht gezeigt) und NG2-Glia) neben rekombinierten Neuronen. In keiner der untersuchten Regionen konnten rekombinierte Mikroglia identifiziert werden.

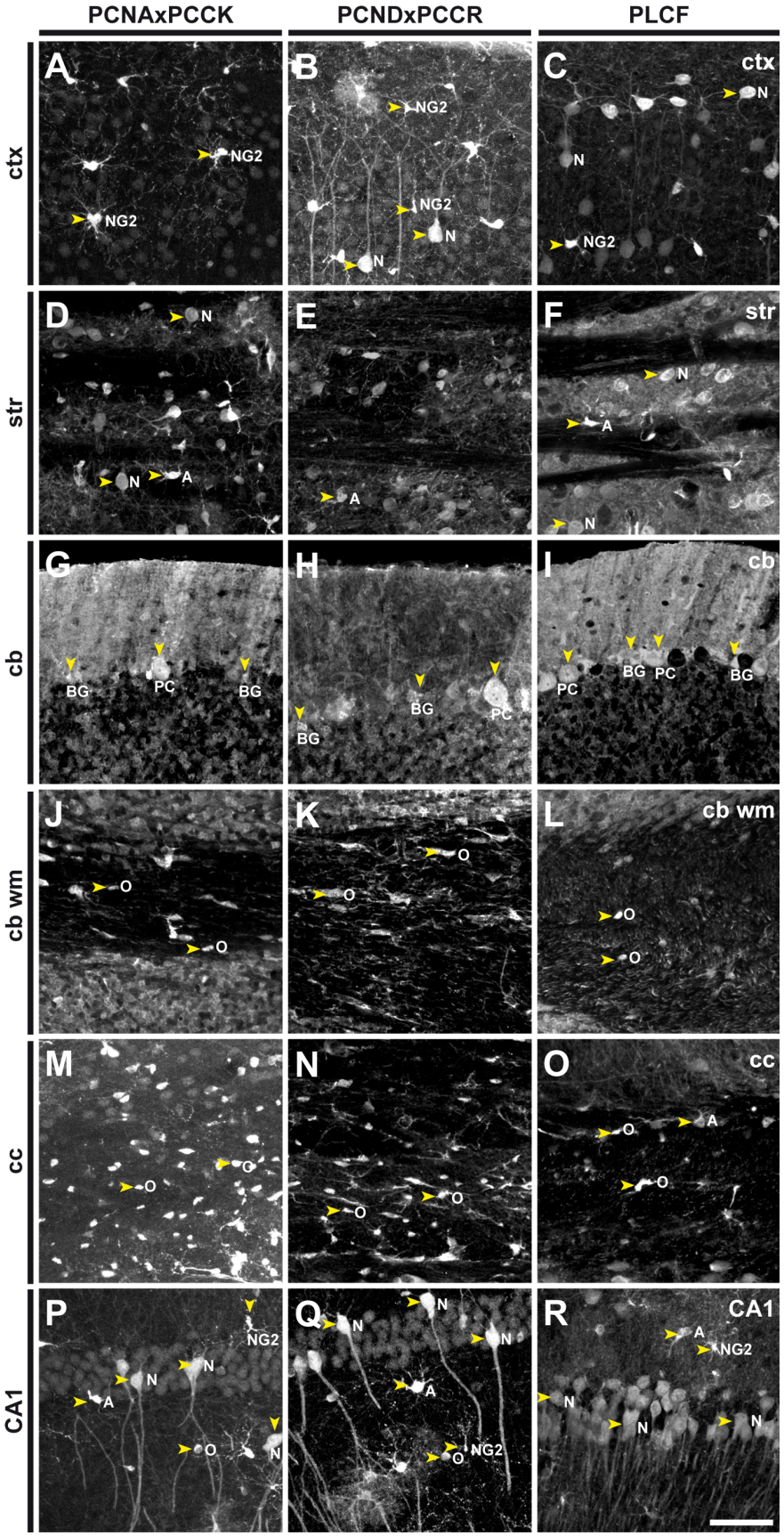

PCNAxPCCK
PCNDxPCCR
PLCF
ctx
str
cb
cb wm
cc
CA1
A
B
C
D
E
F
G
H
I
J
K
L
M
N
O
P
Q
R
NG2
N
A
BG
PC
O

Abb. 34 DNA-Rekombination in Tieren mit Cre-Komplementierung und intakter Cre-Rekombinase unter Kontrolle des PLP-Promotors

Vergleich verschiedener Hirnregionen in den Komplementierungslinien PLP-CCre(K)/-NCre(A) (PCNAxPCCK) (A, D, G, J, M und P), PLP-CCre(R)/NCre(D) (B, E, H, K, N und O) (PCNDxPCCR) und einer Mauslinie in der die intakte Cre-Rekombinase durch den PLP-Promotor kontrolliert wird (PLP-Cre(F). Gezeigt werden Kortex (ctx), Striatum (str), Cerebellum (cb), die weiße Substanz des Cerebellums (cb wm), das Corpus Callosum (cc) und die CA1-Region des Hippocampus (CA1). Neben rekombinierten Oligodendrocyten gibt es in allen Linien markierte Astrocyten, NG2-Glia und Neurone. Der Balken entspricht 50 µm und gilt für alle Bildausschnitte. ctx: Kortex; str: Striatum, cb: Cerebellum; cb wm: weiße Substanz des Cerebellums; cc: Corpus Callosum; CA1:CA1-Region des Hippocampus; A: Astrocyt; BG: Bergmann Glia; N: Neuron; NG2: NG2-Glia; O: Oligodendrocyt; PC: Purkinjezelle.

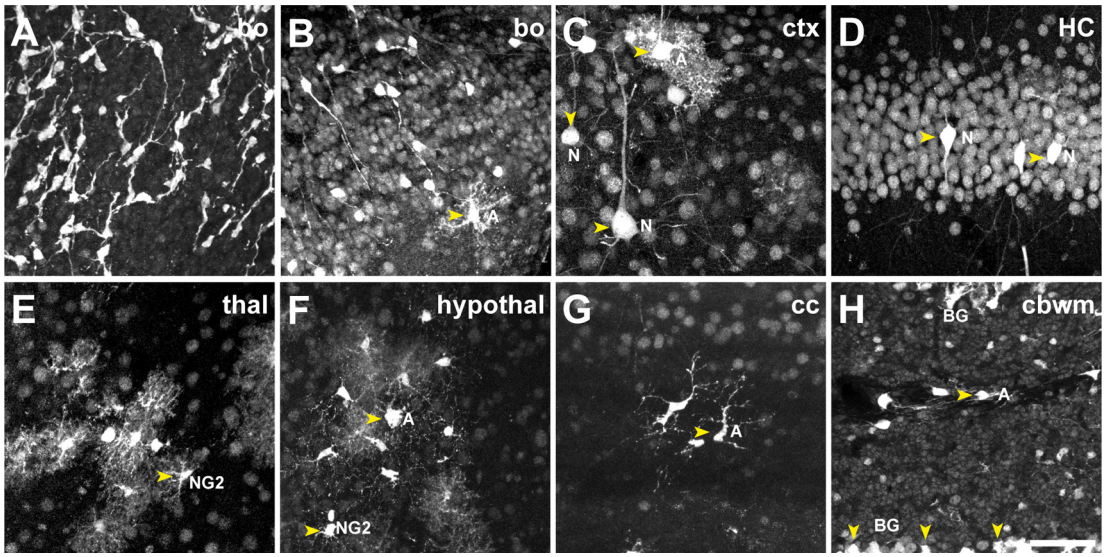


Abb. 35 Cre-Komplementierung unter der Kontrolle des humanen GFAP-Promotors in verschiedenen Hirnregionen (GFAP-CCre(F)/NCre(V))

In A-H sind verschiedene Hirnregionen gezeigt. Ausgewählt wurden Bulbus Olfactorius (bo), Kortex (ctx), Hippocampus (HC), Thalamus (thal), Hypothalamus (hypothal), Corpus Callosum (cc) und die weiße Substanz des Cerebellums (cb wm). Es können Astrocyten, NG2-Glia und Neurone identifiziert werden. Der Balken entspricht 50 µm und gilt für alle Bildausschnitte. bo: Bulbus Olfactorius; ctx: Kortex; HC: Hippocampus; thal: Thalamus; hypothal: Hypothalamus; cc: Corpus Callosum; cb wm: weiße Substanz des Cerebellums; A: Astrocyt; BG: Bergmann Glia; N: Neuron; NG2: NG2-Glia.

8.2.5. Koinzidenzdetektion von GFAP und PLP-Promotor in verschiedenen Hirnregionen

Es können rekombinierte Zellen ab E18.5 detektiert werden. In den folgenden Abbildungen sind verschiedene Hirnregionen in nach Komplementierung in verschiedenen Linien gezeigt. Es konnte Rekombination sowohl nach GFAP-CCre/PLP-NCre- bzw. GFAP-NCrexPLP-CCre-Komplementierung detektiert werden. Deutlich erkennbar, dass Rekombinationshäufigkeit zwischen den Linien stark schwankt. So sind in der Linie GFAP-CCre(F)/PLPNCre(D) ähnlich wenige Zellen rekombiniert wie in der Linie GFAP-NCre(W)/PLP-CCre(K). Eine deutlich höhere Rekombination zeigt sich in den Linien GFAP-NCre(T)/PLP-CCre(K) bzw. (R). Die stärkste Rekombination ist in der Linie GFAP-NCre(V)/PLP-CCre(K) identifizierbar.

Verglichen wurden Regionen wie Bulbus Olfactorius (BO), Kortex (ctx), die Region um das 3. dorsale Ventrikel (3rd ventr), den Thalamus (thal), das Mittelhirn (de), den Hippocampus (HC; CA2), das Striatum (str), den Hirnstamm (bs), den Hypothalamus (hypothal), die Körnerzellschicht des Cerebellums (cb kzs) sowie die weiße Substanz des Cerebellums, das Corpus Callosum (cc) und das Cerebellum (cb). In allen untersuchten Kombinationen können rekombinierte Astrocyten und NG2-Glia identifiziert werden. In der Kombination GFAP-NCre(W)/PLP-CCre(K) gibt es rekombinierte Oligodendrocyten in der weißen Substanz des Cerebellums, in der Linie GFAP-NCre(V)/-PLP-CCre(K) sind rekombinierte Pyramidenneurone in Kortex und Hippocampus identifizierbar. In der Linie GFAP-CCre(F)/PLP-NCre(D) konnten vereinzelt ebenfalls Neurone identifiziert werden (Daten nicht gezeigt).

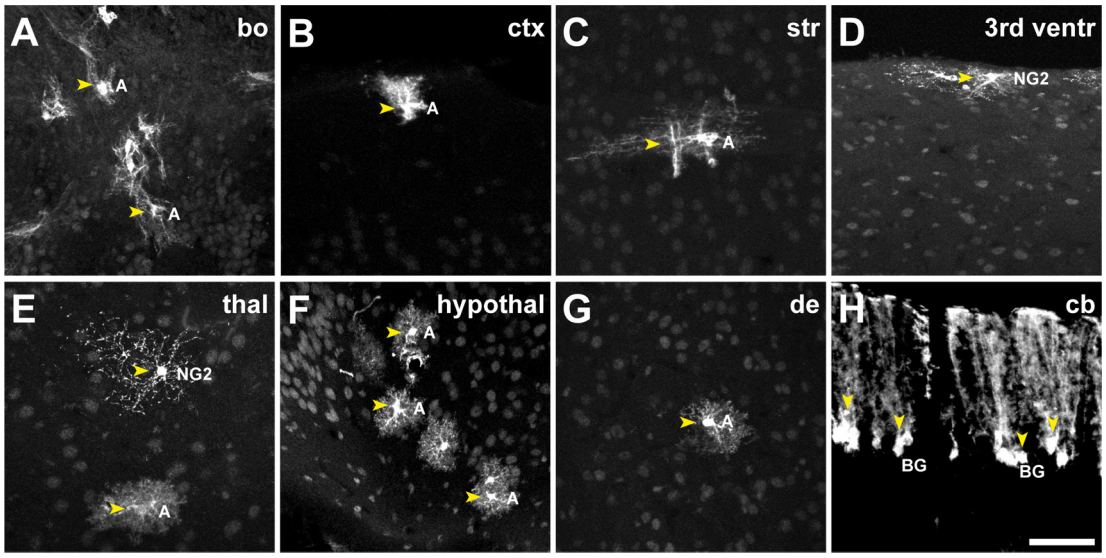


Abb. 36 Koinzidenzdetektion der Aktivität der Promotoren GFAP und PLP – Linie GFAP-CCre(F)/PLP-NCre(D)

In A-H wird die Rekombination in verschiedenen Hirnregionen gezeigt. Rekombination kann in Astrocyten und NG2-Glia in den verschiedenen Hirnregionen Bulbus Olfactorius (bo), Kortex (ctx), Striatum (str), 3. dorsaler Ventrikel (3rd ventr), Thalamus (thal), Hypothalamus (hypothal), Mittelhirn (de) und Cerebellum (cb) detektiert werden. Die Astrocyten in C und F stehen in direktem Kontakt mit Blutgefäßen (bv). Der Balken entspricht 50 µm und gilt für alle Bildausschnitte. bo: Bulbus Olfactorius, ctx: Kortex; str: Striatum; 3rd ventr: 3. dorsler Ventrikel; thal: Thalamus; hypothal: Hypothalamus; de: Mittelhirn; cb: Cerebellum; A: Astrocyt; BG: Bergmann Glia; NG2: NG2-Glia; bv: Blutgefäß.

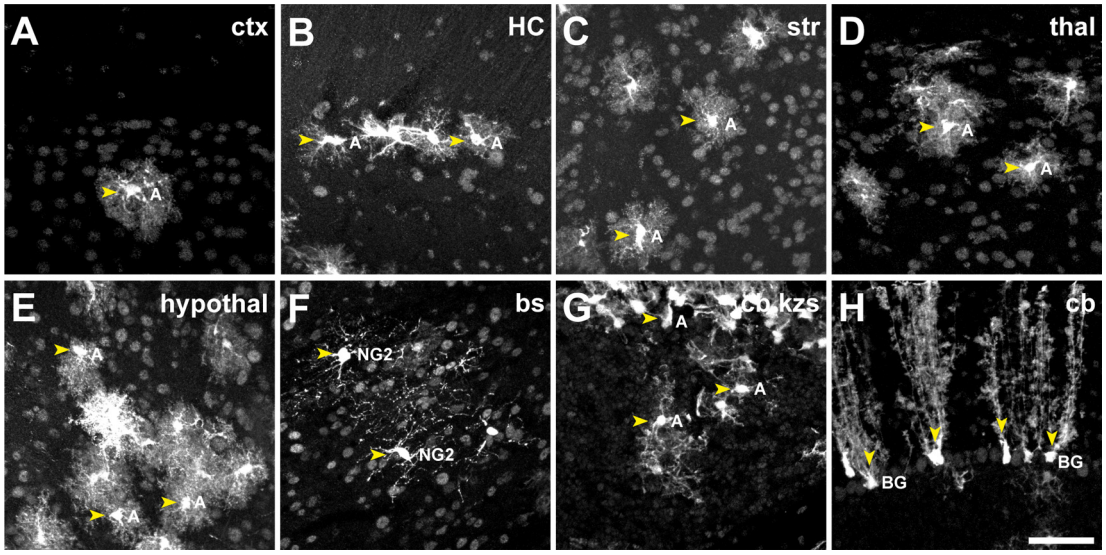


Abb. 37 Koinzidenzdetektion der Aktivität der Promotoren GFAP und PLP – Linie GFAP-NCre(T)/PLP-CCre(K)

In A-H wird die Rekombination in doppelt-transgenen Mäusen in verschiedenen Hirnregionen gezeigt. Die Rekombination in Astrocyten und NG2-Glia in den verschiedenen Hirnregionen wie Kortex (ctx), HC: Hippocampus; Striatum (str), Thalamus (thal), Hypothalamus (hypothal), Hirnstamm (bs), Mittelhirn (de) und Cerebellum (cb) ist erkennbar. Die Astrocyten in B stehen in direktem Kontakt mit einem Blutgefäß (bv). Der Balken entspricht 50 µm und gilt für alle Bildausschnitte. ctx: Kortex; HC: Hippocampus; str: Striatum; thal: Thalamus; hypothal: Hypothalamus; bs: Hirnstamm; cb kzs: Körnerzellschicht des Cerebellums; cb: Cerebellum; A: Astrocyt; BG: Bergmann Glia; NG2: NG2-Glia; bv: Blutgefäß.

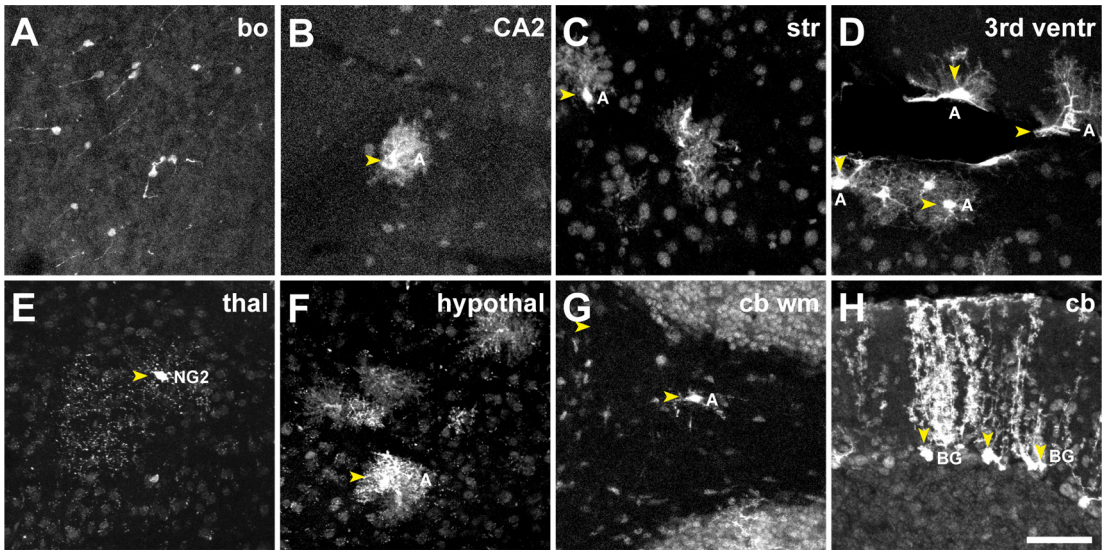


Abb. 38 Koinzidenzdetektion der Aktivität der Promotoren GFAP und PLP – Linie GFAP-NCre(T)/PLP-CCre(R)

A-H zeigt die Rekombination nach Cre-Komplementierung in verschiedenen Hirnregionen. Die Rekombination in Astrocyten und NG2-Glia in den verschiedenen Hirnregionen wie Bulbus Olfactorius (bo), der CA2-Region des Hippocampus (CA2); Striatum (str), 3. dorsaler Ventrikel (3rd ventr), Thalamus (thal), Hypothalamus (hypothal), der weißen Substanz des Cerebellums (cb wm), und dem Cerebellum (cb) ist erkennbar. Der Balken entspricht 50 µm und gilt für alle Bildausschnitte. bo: Bulbus Olfactorius; CA2: CA2-Region des Hippocampus; str: Striatum; 3rd ventr: 3. dorsler Ventrikel; thal: Thalamus; hypothal: Hypothalamus; cb wm: weiße Substanz des Cerebellums; cb: Cerebellum; A: Astrocyt; BG: Bergmann Glia; NG2: NG2-Glia.

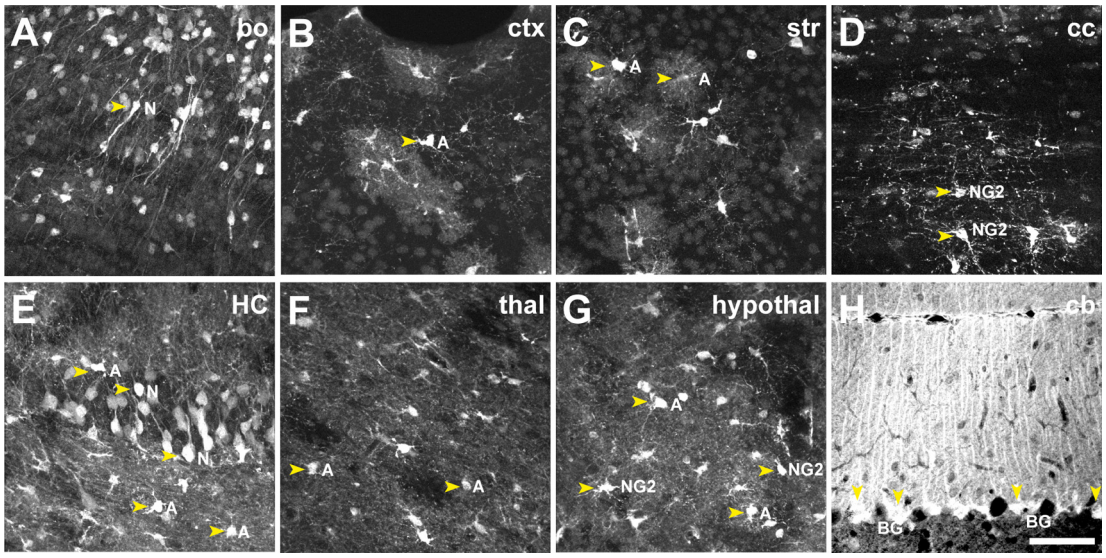


Abb. 39 Koinzidenzdetektion der Aktivität der Promotoren GFAP und PLP – Linie GFAP-NCre(V)/PLP-CCre(K)

In A-H werden rekombinierte Zellen der Linie GFAP-NCre(V)/PLP-CCre(K) in verschiedenen Hirnregionen gezeigt, wie Astrocyten und NG2-Glia Dazu kommen in dieser Linie noch rekombinierte Neurone z.B. im Bulbus Olfactorius (bo), und dem Hippocampus (HC). Rekombination konnte auch gezeigt weren für Kortex (ctx), Striatum (str), Corpus Callosum (cc), Thalamus (thal), Hypothalamus (hypothal) und Cerebellum (cb). Der Balken entspricht 50 µm und gilt für alle Bildausschnitte. bo: Bulbus Olfactorius; ctx: Kortex; str: Striatum; Corpus Callosum (cc); HC: Hippocampus; thal: Thalamus; hypothal: Hypothalamus; cb: Cerebellum; A: Astrocyt; BG: Bergmann Glia; N: Neuron; NG2: NG2-Glia.

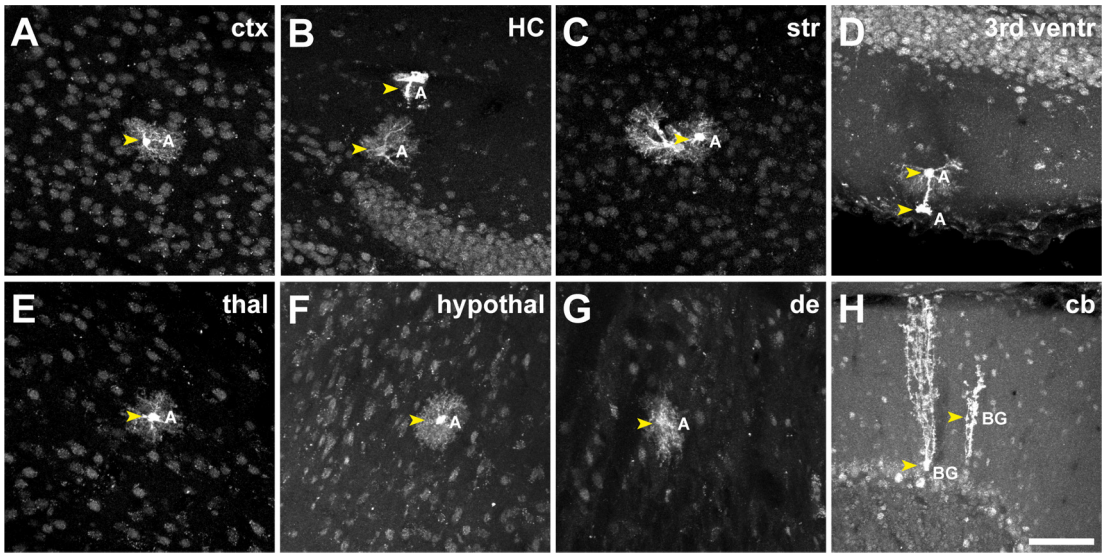


Abb. 40 Koinzidenzdetektion der Aktivität der Promotoren GFAP und PLP – Linie GFAP-NCre(W)/PLP-CCre(K)

In A-H wird die Rekombination in verschiedenen Zellen (Astrocyten) in unterschiedlichen Hirnregionen. Eine geringe Anzahl rekombinierter Zellen im Vergleich zu den anderen Linien ist erkennbar: Gezeigt werden Kortex (ctx), Hippocampus (HC), Striatum (str), die Region um den 3. dorsalen Ventrikel (3rd), Thalamus (thal), Hypothalamus (hypothal), Mittelhirn (de) und Cerebellum (cb). Der Balken entspricht 50 µm und gilt für alle Bildausschnitte. ctx: Kortex; HC: Hippocampus; str: Striatum; 3rd ventr: 3. dorsaler Ventrikel; thal: Thalamus; hypothal: Hypothalamus; de: Mittelhirn; cb: Cerebellum; A: Astrocyt; BG: Bergmann Glia.

9. ANHANG II

9.1. Publikationsliste

9.1.1. Publikationen

Originalarbeiten:

Hirrlinger PG*, **Scheller A***, Braun C, Quintela-Schneider M, Fuss B, Hirrlinger J, Kirchhoff F. (2005), Expression of reef coral fluorescent proteins in the central nervous system of transgenic mice. Mol Cell Neurosci. Nov;30(3):291-303.
* gleichberechtigte Autorenschaft

Hirrlinger PG, **Scheller A**, Braun C, Hirrlinger J, Kirchhoff F. (2006) Temporal control of gene recombination in astrocytes by transgenic expression of the tamoxifen-inducible DNA recombinase variant CreERT2. Glia. Jul;54(1):11-20.

Übersichtsartikel

Scheller A, Kirchhoff F, (2007)
Leuchtenden Proteine im Nervensystem der Maus. Neuroforum 3/07.

Scheller A, Kirchhoff F, (2008) How to identify astrocytes. erschienen in: Encyclopedia of Neurosciences. Eds. Adelman G und Smith BH, Elsevier.

Eingereichte Arbeiten

Hirrlinger J, **Scheller A**, Hirrlinger PG, Kellert B, Tang W, Wehr MC, Goebbels S, Reichenbach A, Sprengel R, Rossner MJ, Kirchhoff F, (2008) Novel Cre complementierung indicates coincident activity of different genes in vivo. (eingereicht im September 2008).

Dibaj P, Steffens H, Nadrigny F, **Scheller A**, Hirrlinger J, Schomburg ED, Neusch C, Kirchhoff F, (2008) Coordinated control of microglial responses to acute spinal cord injury by nitric oxide and ATP. (eingereicht im September 2008).

Artikel in Vorbereitung

Scheller A, Hirrlinger J, Kirchhoff F, Identification of O-2A cells in vivo.

9.1.2. Poster

Internationale Symposien

Pawlowski PG, **Schuchardt A**, Braun C, Hirrlinger J und Kirchhoff F (2004) Comparative analysis of fluorescent proteins from jellyfish and reef corals in transgenic mice using different neural promoters. 4th FENS Meeting Lisbon, Portugal.

Braun C, Hirrlinger J, Pawlowski PG, **Schuchardt A**, Raivich ., Fuss B und Kirchhoff F (2004) Trauma-induced glia activation in PLP-DsRED/GFAP-EGFP double-transgenic mice. 4th FENS Meeting Lisbon, Portugal.

Schuchardt A, Hirrlinger PG, Kirchhoff F (2005) Structure and physiology of mouse astrocytes with transgenic expressin of the ref fluorescent protein mRFP1. VII European Conference on Glial Cells in Health and Disease Amsterdam, The Netherlands.

Hirrlinger PG, **Scheller A**, Hirrlinger J und Kirchhoff F (2005) Temporal control of astroglia-spezific gene recombination in transgenic mice with human GFAP promoter driven expression of tamoxifen-sensitive CreERT2. SfN 35th Annual Meeting Washington D.C., USA.

Scheller A, Nadrigny F, Kirchhoff F (2007) Analysis of NG2 expression at the synaptiv glia-neuron interface. VIII European Conference on Glial Cells in Health and Disease London, Great Britain.

Saab AS, Rudolph S, Hirrlinger PG, **Scheller A**, Hirrlinger J, Monyer H, Sprengel R, Harke B, Hell SW, Kirchhoff F, (2007) Induced Deletion of AMPA-type glutamate receptors in Bergmann Glia. VIII European Conference on Glial Cells in Health and Disease London, Great Britain.

Scheller A, Nadrigny F, Kirchhoff F (2007) Use of quantum dot imaging to analyse AMPA receptor/NG2 complexes in NG2-glia. SfN 37th Annual Meeting San Diego, USA.

Saab AS, Rudolph S, Hirrlinger PG, **Scheller A**, Kirchhoff F, (2007) Mice with induced ablation of AMPA-type glutamate receptors in Bergmann glia display hind limb clasping. SfN 37th Annual Meeting San Diego, USA.

Rudolph S, Saab AS, Hirrlinger PG, **Scheller A**, Rubio ME, Kirchhoff F, (2007) Compromised ultrastructure of Bergmann glial processes and Purkinje cell dendrites in mice with induced, Bergmann glia selective ablation of AMPA-type glutamate receptors. 37th Annual Meeting San Diego, USA.

9.2. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich ganz herzlich bei Herrn PD Dr. Frank Kirchhoff für die Bereitstellung des interessanten Projektes sowie die Betreuung bei der Durchführung bedanken. Durch ihn habe ich viele interessante Aspekte der Wissenschaft kennen gelernt und die Lösung neurobiologischer Fragen erarbeitet. Ich danke ihm für seine Diskussionsbereitschaft rund um unsere Labor-Projekte. Sein Verständnis und seine Geduld bei dem Lernprozess, wie eine junge Mutterschaft und die Realisierung einer Promotion gleichzeitig zu planen und durchzuführen sind, waren während meiner Arbeit extrem hilfreich.

Herrn Prof. Gerd Multhaup danke ich für die Übernahme des Gutachtens für meine Promotion.

Ein besonderes Dankeschön gilt meinen Kollegen der Arbeitsgruppe Neurophysiologie, allen voran Aiman Saab. Es hat viel Spaß gemacht, mit ihm über transgene Mäuse und Experimente zu philosophieren und die Durchführungen zu planen. Dr. Fabien Nadrigny möchte ich besonders für die Unterstützung mit Matlab danken, Nora Hoberg für die Hilfe bei den vielen Genotypisierungen und Mausperfusionen. Allen Kollegen danke ich für das motivierende Arbeitsklima in unserer Gruppe, das die Arbeit stets zu einem Vergnügen gemacht hat.

Dr. Johannes Hirrlinger möchte ich für seine Hilfe, Diskussionsbereitschaft und Unterstützung bei dem Cre-Komplementierungs-Projekt danken. Zunächst hier in Göttingen, später von Leipzig aus – es hat Spaß gemacht, mit ihm zusammen zu arbeiten. Beate Kellert danke ich für die hilfreichen Vorarbeiten zum Cre-Komplementierungs-Projekt.

Allen Mitarbeitern des Tierhauses möchte ich für die gute Zusammenarbeit danken, insbesondere Daniel Flemming, der immer ein offenes Ohr für Mausprobleme aller Art hatte. Auch Rainer Libal, Daniela Bartosch, Cornelia Casper, Tanja Leinert, Simone Schmidt und Stefanie Thiel sollen an dieser Stelle genannt sein.

Nicht zu vergessen die vielen Helfer, die mich in so vielen Dingen unterstützt haben – allen voran Ute Kirchhoff, die bei Software-Problemen oder als kurzfristiger Babysitter stets spontan und unkompliziert half. Annette Fahrenholz danke ich für die Unterstützung bei den DAB-Färbungen, Ingeborg Krämer und Anne Quaschning für die unschätzbare Hilfe bei der Recherche und Beschaffung von Literatur.

Herrn Prof. Klaus-Armin Nave und allen Mitarbeitern der Abteilung Neurogenetik möchte ich für das angenehme Arbeitsklima und die große Hilfsbereitschaft innerhalb unserer großen Abteilung danken.

Bei Herrn Prof. Rolf Sprengel möchte ich mich für die Bereitstellung der rekombinaten Viren bedanken, bei Dr. Sönke Schwarting und Dr. Thorsten Döppner für die Hilfe bei den mittleren cerebralen Arterienocclusionen.

Meiner Familie danke ich für die jederzeitige Unterstützung, alle kurzfristigen Hilfseinsätze und den Rückhalt während meiner Promotion.

Mein ganz besonderer Dank gilt Timo, dafür dass er immer für mich da war, privat wie auch beruflich. Ich danke ihm für sein großes Verständnis und seine uneingeschränkte Unterstützung. Ohne ihn wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

9.3. Lebenslauf

Aus Datenschutzgründen wird der Lebenslauf in der hier veröffentlichten elektronischen Version nicht gezeigt.

9.4. Referenzen

Abremski K, Hoess R (1984) Bacteriophage P1 site-specific recombination. Purification and properties of the Cre recombinase protein. J Biol Chem 259:1509-1514.

Abremski K, Hoess R, Sternberg N (1983) Studies on the properties of P1 site-specific recombination: evidence for topologically unlinked products following recombination. Cell 32:1301-1311.

Agresti C, Meomartini ME, Amadio S, Ambrosini E, Volonte C, Aloisi F, Visentin S (2005) ATP regulates oligodendrocyte progenitor migration, proliferation, and differentiation: involvement of metabotropic P2 receptors. Brain Res Brain Res Rev 48:157-165.

Aguirre A, Gallo V (2004) Postnatal neurogenesis and gliogenesis in the olfactory bulb from NG2-expressing progenitors of the subventricular zone. J Neurosci 24:10530-10541.

Antony JM, van MG, Opii W, Butterfield DA, Mallet F, Yong VW, Wallace JL, Deacon RM, Warren K, Power C (2004) Human endogenous retrovirus glycoprotein-mediated induction of redox reactants causes oligodendrocyte death and demyelination. Nat Neurosci 7:1088-1095.

Araque A, Parpura V, Sanzgiri RP, Haydon PG (1999) Tripartite synapses: glia, the unacknowledged partner. Trends Neurosci 22:208-215.

Ballabh P, Braun A, Nedergaard M (2004) The blood-brain barrier: an overview: structure, regulation, and clinical implications. Neurobiol Dis 16:1-13.

Baumann N, Pham-Dinh D (2001) Biology of oligodendrocyte and myelin in the mammalian central nervous system. Physiol Rev 81:871-927.

Belachew S, Chittajallu R, Aguirre AA, Yuan X, Kirby M, Anderson S, Gallo V (2003) Postnatal NG2 proteoglycan-expressing progenitor cells are intrinsically multipotent and generate functional neurons. J Cell Biol 161:169-186.

Belachew S, Gallo V (2004) Synaptic and extrasynaptic neurotransmitter receptors in glial precursors' quest for identity. Glia 48:185-196.

Belachew S, Yuan X, Gallo V (2001) Unraveling oligodendrocyte origin and function by cell-specific transgenesis. Dev Neurosci 23:287-298.

Belayev L, Busto R, Zhao W, Ginsberg MD (1996) Quantitative evaluation of blood-brain barrier permeability following middle cerebral artery occlusion in rats. Brain Res 739:88-96.

Bergles DE, Diamond JS, Jahr CE (1999) Clearance of glutamate inside the synapse and beyond. Curr Opin Neurobiol 9:293-298.

Bignami A, Eng LF, Dahl D, Uyeda CT (1972) Localization of the glial fibrillary acidic protein in astrocytes by immunofluorescence. Brain Res 43:429-435.

Birnboim HC, Doly J (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. Nucleic Acids Res 7:1513-1523.

Brockschnieder D, Lappe-Siefke C, Goebbels S, Boesl MR, Nave KA, Riethmacher D (2004) Cell depletion due to diphtheria toxin fragment A after Cre-mediated recombination. Mol Cell Biol 24:7636-7642.

Buch T, Heppner FL, Tertilt C, Heinen TJ, Kremer M, Wunderlich FT, Jung S, Waisman A (2005) A Cre-inducible diphtheria toxin receptor mediates cell lineage ablation after toxin administration. Nat Methods 2:419-426.

Buffo A, Rite I, Tripathi P, Lepier A, Colak D, Horn AP, Mori T, Gotz M (2008) Origin and progeny of reactive gliosis: A source of multipotent cells in the injured brain. Proc Natl Acad Sci U S A 105:3581-3586.

Buffo A, Vosko MR, Erturk D, Hamann GF, Jucker M, Rowitch D, Gotz M (2005) Expression pattern of the transcription factor Olig2 in response to brain injuries: implications for neuronal repair. Proc Natl Acad Sci U S A 102:18183-18188.

Buning H, Perabo L, Coutelle O, Quadt-Humme S, Hallek M (2008) Recent developments in adeno-associated virus vector technology. J Gene Med 10:717-733.

Burger C, Nash K, Mandel RJ (2005) Recombinant adeno-associated viral vectors in the nervous system. Hum Gene Ther 16:781-791.

Bush TG, Puvanachandra N, Horner CH, Polito A, Ostenfeld T, Svendsen CN, Mucke L, Johnson MH, Sofroniew MV (1999) Leukocyte infiltration, neuronal degeneration, and neurite outgrowth after ablation of scar-forming, reactive astrocytes in adult transgenic mice. Neuron 23:297-308.

Butt AM, Duncan A, Hornby MF, Kirvell SL, Hunter A, Levine JM, Berry M (1999) Cells expressing the NG2 antigen contact nodes of Ranvier in adult CNS white matter. Glia 26:84-91.

Butt AM, Hamilton N, Hubbard P, Pugh M, Ibrahim M (2005) Synantocytes: the fifth element. J Anat 207:695-706.

Cai J, Chen Y, Cai WH, Hurlock EC, Wu H, Kernie SG, Parada LF, Lu QR (2007) A crucial role for Olig2 in white matter astrocyte development. Development 134:1887-1899.

Casanova E, Lemberger T, Fehsenfeld S, Mantamadiotis T, Schutz G (2003) Alpha complementation in the Cre recombinase enzyme. Genesis 37:25-29.

Casper KB, McCarthy KD (2006) GFAP-positive progenitor cells produce neurons and oligodendrocytes throughout the CNS. Mol Cell Neurosci 31:676-684.

Chalfie M, Tu Y, Euskirchen G, Ward WW, Prasher DC (1994) Green fluorescent protein as a marker for gene expression. Science 263:802-805.

Crome O, Doeppner TR, Schwarting S, Muller B, Bahr M, Weise J (2007) Enhanced poly(ADP-ribose) polymerase-1 activation contributes to recombinant tissue plasminogen activator-induced aggravation of ischemic brain injury in vivo. J Neurosci Res 85:1734-1743.

Danbolt NC (2001) Glutamate uptake. Prog Neurobiol 65:1-105.

Davalos D, Grutzendler J, Yang G, Kim JV, Zuo Y, Jung S, Littman DR, Dustin ML, Gan WB (2005) ATP mediates rapid microglial response to local brain injury in vivo. Nat Neurosci 8:752-758.

Deitmer JW, Verkhratsky AJ, Lohr C (1998) Calcium signalling in glial cells. Cell Calcium 24:405-416.

Delaunay D, Heydon K, Cumano A, Schwab MH, Thomas JL, Suter U, Nave KA, Zalc B, Spassky N (2008) Early neuronal and glial fate restriction of embryonic neural stem cells. J Neurosci 28:2551-2562.

Deng W, Wang H, Rosenberg PA, Volpe JJ, Jensen FE (2004) Role of metabotropic glutamate receptors in oligodendrocyte excitotoxicity and oxidative stress. Proc Natl Acad Sci U S A 101:7751-7756.

Diers-Fenger M, Kirchhoff F, Kettenmann H, Levine JM, Trotter J (2001) AN2/NG2 protein-expressing glial progenitor cells in the murine CNS: isolation, differentiation, and association with radial glia. Glia 34:213-228.

Dimou L, Simon C, Kirchhoff F, Takebayashi H, Gotz M (2008) Progeny of Olig2-expressing progenitors in the gray and white matter of the adult mouse cerebral cortex. J Neurosci 28:10434-10442.

Dobkin BH (2005) Clinical practice. Rehabilitation after stroke. N Engl J Med 352:1677-1684.

Doetsch F, Caille I, Lim DA, Garcia-Verdugo JM, varez-Buylla A (1999) Subventricular zone astrocytes are neural stem cells in the adult mammalian brain. Cell 97:703-716.

Domercq M, Sanchez-Gomez MV, Areso P, Matute C (1999) Expression of glutamate transporters in rat optic nerve oligodendrocytes. Eur J Neurosci 11:2226-2236.

During MJ, Young D, Baer K, Lawlor P, Klugmann M (2003) Development and optimization of adeno-associated virus vector transfer into the central nervous system. Methods Mol Med 76:221-236.

Dutton RP, McCunn M (2003) Traumatic brain injury. Curr Opin Crit Care 9:503-509.

Eddleston M, Mucke L (1993) Molecular profile of reactive astrocytes--implications for their role in neurologic disease. Neuroscience 54:15-36.

Eng LF, Ghirnikar RS, Lee YL (2000) Glial fibrillary acidic protein: GFAP-thirty-one years (1969-2000). Neurochem Res 25:1439-1451.

Faulkner JR, Herrmann JE, Woo MJ, Tansey KE, Doan NB, Sofroniew MV (2004) Reactive astrocytes protect tissue and preserve function after spinal cord injury. J Neurosci 24:2143-2155.

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.

Feng G, Mellor RH, Bernstein M, Keller-Peck C, Nguyen QT, Wallace M, Nerbonne JM, Lichtman JW, Sanes JR (2000) Imaging neuronal subsets in transgenic mice expressing multiple spectral variants of GFP. Neuron 28:41-51.

Fern R, Moller T (2000) Rapid ischemic cell death in immature oligodendrocytes: a fatal glutamate release feedback loop. J Neurosci 20:34-42.

Fields RD, Stevens-Graham B (2002) New insights into neuron-glia communication. Science 298:556-562.

Fitzsimons HL, Bland RJ, During MJ (2002) Promoters and regulatory elements that improve adeno-associated virus transgene expression in the brain. Methods 28:227-236.

Frei E, Klusman I, Schnell L, Schwab ME (2000) Reactions of oligodendrocytes to spinal cord injury: cell survival and myelin repair. Exp Neurol 163:373-380.

Fuss B, Mallon B, Phan T, Ohlemeyer C, Kirchhoff F, Nishiyama A, Macklin WB (2000) Purification and analysis of in vivo-differentiated oligodendrocytes expressing the green fluorescent protein. Dev Biol 218:259-274.

Gage FH (2000) Mammalian neural stem cells. Science 287:1433-1438.

Gage FH, Olejniczak P, Armstrong DM (1988) Astrocytes are important for sprouting in the septohippocampal circuit. Exp Neurol 102:2-13.

Ganat YM, Silbereis J, Cave C, Ngu H, Anderson GM, Ohkubo Y, Ment LR, Vaccarino FM (2006) Early postnatal astroglial cells produce multilineage precursors and neural stem cells in vivo. J Neurosci 26:8609-8621.

Garcia AD, Doan NB, Imura T, Bush TG, Sofroniew MV (2004) GFAP-expressing progenitors are the principal source of constitutive neurogenesis in adult mouse forebrain. Nat Neurosci 7:1233-1241.

Garden GA, Moller T (2006) Microglia biology in health and disease. J Neuroimmune Pharmacol 1:127-137.

Giaume C, Kirchhoff F, Matute C, Reichenbach A, Verkhratsky A (2007) Glia: the fulcrum of brain diseases. Cell Death Differ 14:1324-1335.

Gordon JW (1983) Studies of foreign genes transmitted through the germ lines of transgenic mice. J Exp Zool 228:313-324.

Gottlieb M, Domercq M, Matute C (2000) Altered expression of the glutamate transporter EAAC1 in neurons and immature oligodendrocytes after transient forebrain ischemia. J Cereb Blood Flow Metab 20:678-687.

Gotz M, Huttner WB (2005) The cell biology of neurogenesis. Nat Rev Mol Cell Biol 6:777-788.

Gould E, Beylin A, Tanapat P, Reeves A, Shors TJ (1999) Learning enhances adult neurogenesis in the hippocampal formation. Nat Neurosci 2:260-265.

Grass D, Pawlowski PG, Hirrlinger J, Papadopoulos N, Richter DW, Kirchhoff F, Hulsmann S (2004) Diversity of functional astroglial properties in the respiratory network. J Neurosci 24:1358-1365.

Gregori N, Proschel C, Noble M, Mayer-Proschel M (2002) The tripotential glial-restricted precursor (GRP) cell and glial development in the spinal cord: generation of bipotential oligodendrocyte-type-2 astrocyte progenitor cells and dorsal-ventral differences in GRP cell function. J Neurosci 22:248-256.

Grutzendler J, Kasthuri N, Gan WB (2002) Long-term dendritic spine stability in the adult cortex. Nature 420:812-816.

Hamilton DL, Abremski K (1984) Site-specific recombination by the bacteriophage P1 lox-Cre system. Cre-mediated synapsis of two lox sites. J Mol Biol 178:481-486.

Hanisch UK (2002) Microglia as a source and target of cytokines. Glia 40:140-155.

Hatten ME, Liem RK, Shelanski ML, Mason CA (1991) Astroglia in CNS injury. Glia 4:233-243.

Hawkins BT, Davis TP (2005) The blood-brain barrier/neurovascular unit in health and disease. Pharmacol Rev 57:173-185.

Haydon PG (2001) GLIA: listening and talking to the synapse. Nat Rev Neurosci 2:185-193.

Hirrlinger J, Hulsmann S, Kirchhoff F (2004) Astroglial processes show spontaneous motility at active synaptic terminals in situ. Eur J Neurosci 20:2235-2239.

Hirrlinger PG, Scheller A, Braun C, Hirrlinger J, Kirchhoff F (2006) Temporal control of gene recombination in astrocytes by transgenic expression of the tamoxifen-inducible DNA recombinase variant CreERT2. Glia 54:11-20.

Hirrlinger PG, Scheller A, Braun C, Quintela-Schneider M, Fuss B, Hirrlinger J, Kirchhoff F (2005) Expression of reef coral fluorescent proteins in the central nervous system of transgenic mice. Mol Cell Neurosci 30:291-303.

Hope IA, Struhl K (1987) GCN4, a eukaryotic transcriptional activator protein, binds as a dimer to target DNA. EMBO J 6:2781-2784.

Houser CR (2007) Interneurons of the dentate gyrus: an overview of cell types, terminal fields and neurochemical identity. Prog Brain Res 163:217-232.

Hu CD, Chinenov Y, Kerppola TK (2002) Visualization of interactions among bZIP and Rel family proteins in living cells using bimolecular fluorescence complementation. Mol Cell 9:789-798.

Hu CD, Kerppola TK (2003) Simultaneous visualization of multiple protein interactions in living cells using multicolor fluorescence complementation analysis. Nat Biotechnol 21:539-545.

Huang J, Upadhyay UM, Tamargo RJ (2006) Inflammation in stroke and focal cerebral ischemia. Surg Neurol 66:232-245.

Iadecola C, Nedergaard M (2007) Glial regulation of the cerebral microvasculature. Nat Neurosci 10:1369-1376.

Ikeda H, Murase K (2004) Glial nitric oxide-mediated long-term presynaptic facilitation revealed by optical imaging in rat spinal dorsal horn. J Neurosci 24:9888-9896.

Ikenaka K, Kagawa T, Mikoshiba K (1992) Selective expression of DM-20, an alternatively spliced myelin proteolipid protein gene product, in developing nervous system and in nonglial cells. J Neurochem 58:2248-2253.

Ilzecka J (1996) The protective role of ceruloplasmin against the activity of free radicals in brain ischaemia. Ann Univ Mariae Curie Sklodowska [Med] 51:97-101.

Inoue H, Nojima H, Okayama H (1990) High efficiency transformation of Escherichia coli with plasmids. Gene 96:23-28.

Inoue K (2005) PLP1-related inherited dysmyelinating disorders: Pelizaeus-Merzbacher disease and spastic paraplegia type 2. Neurogenetics 6:1-16.

John GR, Lee SC, Brosnan CF (2003) Cytokines: powerful regulators of glial cell activation. Neuroscientist 9:10-22.

Jones LL, Margolis RU, Tuszynski MH (2003) The chondroitin sulfate proteoglycans neurocan, brevican, phosphacan, and versican are differentially regulated following spinal cord injury. Exp Neurol 182:399-411.

Jullien N, Goddard I, Selmi-Ruby S, Fina JL, Cremer H, Herman JP (2007) Conditional Transgenesis Using Dimerizable Cre (DiCre). PLoS ONE 2:e1355.

Jullien N, Sampieri F, Enjalbert A, Herman JP (2003) Regulation of Cre recombinase by ligand-induced complementation of inactive fragments. Nucleic Acids Res 31:e131.

Jung S, Aliberti J, Graemmel P, Sunshine MJ, Kreutzberg GW, Sher A, Littman DR (2000) Analysis of fractalkine receptor CX(3)CR1 function by targeted deletion and green fluorescent protein reporter gene insertion. Mol Cell Biol 20:4106-4114.

Karadottir R, Cavelier P, Bergersen LH, Attwell D (2005) NMDA receptors are expressed in oligodendrocytes and activated in ischaemia. Nature 438:1162-1166.

Kawaguchi Y, Kondo S (2002) Parvalbumin, somatostatin and cholecystokinin as chemical markers for specific GABAergic interneuron types in the rat frontal cortex. J Neurocytol 31:277-287.

Kawaja MD, Gage FH (1991) Reactive astrocytes are substrates for the growth of adult CNS axons in the presence of elevated levels of nerve growth factor. Neuron 7:1019-1030.

Kerppola TK (2006) Visualization of molecular interactions by fluorescence complementation. Nat Rev Mol Cell Biol 7:449-456.

Kessaris N, Pringle N, Richardson WD (2001) Ventral neurogenesis and the neuron-glial switch. Neuron 31:677-680.

Kim SU, de VJ (2005) Microglia in health and disease. J Neurosci Res 81:302-313.

Kogan SC, Doherty M, Gitschier J (1987) An improved method for prenatal diagnosis of genetic diseases by analysis of amplified DNA sequences. Application to hemophilia A. N Engl J Med 317:985-990.

Koistinaho M, Koistinaho J (2005) Interactions between Alzheimer's disease and cerebral ischemia--focus on inflammation. Brain Res Brain Res Rev 48:240-250.

Kreutzberg GW (1996) Microglia: a sensor for pathological events in the CNS. Trends Neurosci 19:312-318.

Lakso M, Pichel JG, Gorman JR, Sauer B, Okamoto Y, Lee E, Alt FW, Westphal H (1996) Efficient in vivo manipulation of mouse genomic sequences at the zygote stage. Proc Natl Acad Sci U S A 93:5860-5865.

Lalo U, Pankratov Y, Kirchhoff F, North RA, Verkhratsky A (2006) NMDA receptors mediate neuron-to-glia signaling in mouse cortical astrocytes. J Neurosci 26:2673-2683.

Laterza OF, Modur VR, Crimmins DL, Olander JV, Landt Y, Lee JM, Ladenson JH (2006) Identification of novel brain biomarkers. Clin Chem 52:1713-1721.

Le BB, Chatzopoulou E, Heydon K, Martinez S, Ikenaka K, Prestoz L, Spassky N, Zalc B, Thomas JL (2005) Oligodendrocyte development in the embryonic brain: the contribution of the plp lineage. Int J Dev Biol 49:209-220.

Leone DP, Genoud S, Atanasoski S, Grausenburger R, Berger P, Metzger D, Macklin WB, Chambon P, Suter U (2003) Tamoxifen-inducible glia-specific Cre mice for somatic mutagenesis in oligodendrocytes and Schwann cells. Mol Cell Neurosci 22:430-440.

Levine JM, Reynolds R, Fawcett JW (2001) The oligodendrocyte precursor cell in health and disease. Trends Neurosci 24:39-47.

Li H, Lu Y, Smith HK, Richardson WD (2007) Olig1 and Sox10 interact synergistically to drive myelin basic protein transcription in oligodendrocytes. J Neurosci 27:14375-14382.

Lichtman JW, Livet J, Sanes JR (2008) A technicolour approach to the connectome. Nat Rev Neurosci 9:417-422.

Lipton P (1999) Ischemic cell death in brain neurons. Physiol Rev 79:1431-1568.

Lois C, Garcia-Verdugo JM, varez-Buylla A (1996) Chain migration of neuronal precursors. Science 271:978-981.

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. J Biol Chem 193:265-275.

Lukes A, Mun-Bryce S, Lukes M, Rosenberg GA (1999) Extracellular matrix degradation by metalloproteinases and central nervous system diseases. Mol Neurobiol 19:267-284.

Luskin MB (1993) Restricted proliferation and migration of postnatally generated neurons derived from the forebrain subventricular zone. Neuron 11:173-189.

Magliery TJ, Wilson CG, Pan W, Mishler D, Ghosh I, Hamilton AD, Regan L (2005) Detecting protein-protein interactions with a green fluorescent protein fragment reassembly trap: scope and mechanism. J Am Chem Soc 127:146-157.

Malatesta P, Hack MA, Hartfuss E, Kettenmann H, Klinkert W, Kirchhoff F, Gotz M (2003) Neuronal or glial progeny: regional differences in radial glia fate. Neuron 37:751-764.

Mallon BS, Shick HE, Kidd GJ, Macklin WB (2002) Proteolipid promoter activity distinguishes two populations of NG2-positive cells throughout neonatal cortical development. J Neurosci 22:876-885.

Man S, Ubogu EE, Ransohoff RM (2007) Inflammatory cell migration into the central nervous system: a few new twists on an old tale. Brain Pathol 17:243-250.

Mandai K, Matsumoto M, Kitagawa K, Matsushita K, Ohtsuki T, Mabuchi T, Colman DR, Kamada T, Yanagihara T (1997) Ischemic damage and subsequent proliferation of oligodendrocytes in focal cerebral ischemia. Neuroscience 77:849-861.

Margolis RK, Margolis RU (1993) Nervous tissue proteoglycans. Experientia 49:429-446.

Markram H, Toledo-Rodriguez M, Wang Y, Gupta A, Silberberg G, Wu C (2004) Interneurons of the neocortical inhibitory system. Nat Rev Neurosci 5:793-807.

Matthias K, Kirchhoff F, Seifert G, Huttmann K, Matyash M, Kettenmann H, Steinhauser C (2003) Segregated expression of AMPA-type glutamate receptors and glutamate transporters defines distinct astrocyte populations in the mouse hippocampus. J Neurosci 23:1750-1758.

Matute C, Alberdi E, Domercq M, Sanchez-Gomez MV, Perez-Samartin A, Rodriguez-Antiguedad A, Perez-Cerda F (2007) Excitotoxic damage to white matter. J Anat 210:693-702.

Matute C, Domercq M, Sanchez-Gomez MV (2006) Glutamate-mediated glial injury: mechanisms and clinical importance. Glia 53:212-224.

McKeon RJ, Jurynec MJ, Buck CR (1999) The chondroitin sulfate proteoglycans neurocan and phosphacan are expressed by reactive astrocytes in the chronic CNS glial scar. J Neurosci 19:10778-10788.

Menet V, Prieto M, Privat A, Ribotta M (2003) Axonal plasticity and functional recovery after spinal cord injury in mice deficient in both glial fibrillary acidic protein and vimentin genes. Proc Natl Acad Sci U S A 100:8999-9004.

Michnick SW, Ear PH, Manderson EN, Remy I, Stefan E (2007) Universal strategies in research and drug discovery based on protein-fragment complementation assays. Nat Rev Drug Discov 6:569-582.

Micu I, Jiang Q, Coderre E, Ridsdale A, Zhang L, Woulfe J, Yin X, Trapp BD, McRory JE, Rehak R, Zamponi GW, Wang W, Stys PK (2006) NMDA receptors mediate calcium accumulation in myelin during chemical ischaemia. Nature 439:988-992.

Miller RF (2004) D-Serine as a glial modulator of nerve cells. Glia 47:275-283.

Miller RH (2002) Regulation of oligodendrocyte development in the vertebrate CNS. Prog Neurobiol 67:451-467.

Monyer H, Markram H (2004) Interneuron Diversity series: Molecular and genetic tools to study GABAergic interneuron diversity and function. Trends Neurosci 27:90-97.

Mothet JP, Pollegioni L, Ouanounou G, Martineau M, Fossier P, Baux G (2005) Glutamate receptor activation triggers a calcium-dependent and SNARE protein-dependent release of the gliotransmitter D-serine. Proc Natl Acad Sci U S A 102:5606-5611.

Mucke L, Eddleston M (1993) Astrocytes in infectious and immune-mediated diseases of the central nervous system. FASEB J 7:1226-1232.

Mucke L, Oldstone MB, Morris JC, Nerenberg MI (1991) Rapid activation of astrocyte-specific expression of GFAP-lacZ transgene by focal injury. New Biol 3:465-474.

Mullis KB, Faloona FA (1987) Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. Methods Enzymol 155:335-350.

Myer DJ, Gurkoff GG, Lee SM, Hovda DA, Sofroniew MV (2006) Essential protective roles of reactive astrocytes in traumatic brain injury. Brain 129:2761-2772.

Nagai T, Ibata K, Park ES, Kubota M, Mikoshiba K, Miyawaki A (2002) A variant of yellow fluorescent protein with fast and efficient maturation for cell-biological applications. Nat Biotechnol 20:87-90.

Nagasawa H, Kogure K (1989) Correlation between cerebral blood flow and histologic changes in a new rat model of middle cerebral artery occlusion. Stroke 20:1037-1043.

Nave KA, Trapp BD (2008) Axon-glial signaling and the glial support of axon function. Annu Rev Neurosci 31:535-561.

Neufeld AH, Liu B (2003) Glaucomatous optic neuropathy: when glia misbehave. Neuroscientist 9:485-495.

Nimmerjahn A, Kirchhoff F, Helmchen F (2005) Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo. Science 308:1314-1318.

Nishiyama A (2007) Polydendrocytes: NG2 cells with many roles in development and repair of the CNS. Neuroscientist 13:62-76.

Nishiyama A, Yang Z, Butt A (2005) Astrocytes and NG2-glia: what's in a name? J Anat 207:687-693.

Noble M, Proschel C, Mayer-Proschel M (2004) Getting a GR(i)P on oligodendrocyte development. Dev Biol 265:33-52.

Noble M, Wolswijk G (1992) Development and regeneration in the O-2A lineage: studies in vitro and in vivo. J Neuroimmunol 40:287-293.

Nolte C, Matyash M, Pivneva T, Schipke CG, Ohlemeyer C, Hanisch UK, Kirchhoff F, Kettenmann H (2001) GFAP promoter-controlled EGFP-expressing transgenic mice: a tool to visualize astrocytes and astrogliosis in living brain tissue. Glia 33:72-86.

Nortje J, Menon DK (2004) Traumatic brain injury: physiology, mechanisms, and outcome. Curr Opin Neurol 17:711-718.

Norton WT (1999) Cell reactions following acute brain injury: a review. Neurochem Res 24:213-218.

Oberheim NA, Wang X, Goldman S, Nedergaard M (2006) Astrocytic complexity distinguishes the human brain. Trends Neurosci 29:547-553.

Ormo M, Cubitt AB, Kallio K, Gross LA, Tsien RY, Remington SJ (1996) Crystal structure of the Aequorea victoria green fluorescent protein. Science 273:1392-1395.

Pascual O, Casper KB, Kubera C, Zhang J, Revilla-Sanchez R, Sul JY, Takano H, Moss SJ, McCarthy K, Haydon PG (2005) Astrocytic purinergic signaling coordinates synaptic networks. Science 310:113-116.

Pekny M, Nilsson M (2005) Astrocyte activation and reactive gliosis. Glia 50:427-434.

Pelletier JN, Campbell-Valois FX, Michnick SW (1998) Oligomerization domain-directed reassembly of active dihydrofolate reductase from rationally designed fragments. Proc Natl Acad Sci U S A 95:12141-12146.

Petito CK, Olarte JP, Roberts B, Nowak TS, Jr., Pulsinelli WA (1998) Selective glial vulnerability following transient global ischemia in rat brain. J Neuropathol Exp Neurol 57:231-238.

Pinto L, Gotz M (2007) Radial glial cell heterogeneity--the source of diverse progeny in the CNS. Prog Neurobiol 83:2-23.

Polito A, Reynolds R (2005) NG2-expressing cells as oligodendrocyte progenitors in the normal and demyelinated adult central nervous system. J Anat 207:707-716.

Raff MC, Miller RH, Noble M (1983) A glial progenitor cell that develops in vitro into an astrocyte or an oligodendrocyte depending on culture medium. Nature 303:390-396.

Raivich G, Bohatschek M, Kloss CU, Werner A, Jones LL, Kreutzberg GW (1999) Neuroglial activation repertoire in the injured brain: graded response, molecular mechanisms and cues to physiological function. Brain Res Brain Res Rev 30:77-105.

Richards FM (1958) On the enzymatic activity of subtilisin-modifiedribonuclease. Proc Natl Acad Sci U S A 44:162-166.

Richardson WD, Kessaris N, Pringle N (2006) Oligodendrocyte wars. Nat Rev Neurosci 7:11-18.

Richardson WD, Smith HK, Sun T, Pringle NP, Hall A, Woodruff R (2000) Oligodendrocyte lineage and the motor neuron connection. Glia 29:136-142.

Rosenberg GA (2002) Matrix metalloproteinases in neuroinflammation. Glia 39:279-291.

Rossi F, Charlton CA, Blau HM (1997) Monitoring protein-protein interactions in intact eukaryotic cells by beta-galactosidase complementation. Proc Natl Acad Sci U S A 94:8405-8410.

Salter MG, Fern R (2005) NMDA receptors are expressed in developing oligodendrocyte processes and mediate injury. Nature 438:1167-1171.

Sanchez-Gomez MV, Alberdi E, Ibarretxe G, Torre I, Matute C (2003) Caspase-dependent and caspase-independent oligodendrocyte death mediated by AMPA and kainate receptors. J Neurosci 23:9519-9528.

Schipke CG, Ohlemeyer C, Matyash M, Nolte C, Kettenmann H, Kirchhoff F (2001) Astrocytes of the mouse neocortex express functional N-methyl-D-aspartate receptors. FASEB J 15:1270-1272.

Scholz M, Cinatl J, Schadel-Hopfner M, Windolf J (2007) Neutrophils and the blood-brain barrier dysfunction after trauma. Med Res Rev 27:401-416.

Schwenk F, Kuhn R, Angrand PO, Rajewsky K, Stewart AF (1998) Temporally and spatially regulated somatic mutagenesis in mice. Nucleic Acids Res 26:1427-1432.

Seri B, Garcia-Verdugo JM, McEwen BS, varez-Buylla A (2001) Astrocytes give rise to new neurons in the adult mammalian hippocampus. J Neurosci 21:7153-7160.

Sherwood CC, Stimpson CD, Raghanti MA, Wildman DE, Uddin M, Grossman LI, Goodman M, Redmond JC, Bonar CJ, Erwin JM, Hof PR (2006) Evolution of increased glia-neuron ratios in the human frontal cortex. Proc Natl Acad Sci U S A 103:13606-13611.

Shimomura O (2005) The discovery of aequorin and green fluorescent protein. J Microsc 217:1-15.

Shimomura O, Johnson FH, SAIGA Y (1962) Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusan, Aequorea. J Cell Comp Physiol 59:223-239.

Silver J, Miller JH (2004) Regeneration beyond the glial scar. Nat Rev Neurosci 5:146-156.

Simard M, Arcuino G, Takano T, Liu QS, Nedergaard M (2003) Signaling at the gliovascular interface. J Neurosci 23:9254-9262.

Somjen GG (1988) Nervenkitt: notes on the history of the concept of neuroglia. Glia 1:2-9.

Srinivas S, Watanabe T, Lin CS, William CM, Tanabe Y, Jessell TM, Costantini F (2001) Cre reporter strains produced by targeted insertion of EYFP and ECFP into the ROSA26 locus. BMC Dev Biol 1:4.

Stallcup WB (2002) The NG2 proteoglycan: past insights and future prospects. J Neurocytol 31:423-435.

Sternberg N, Hamilton D (1981) Bacteriophage P1 site-specific recombination. I. Recombination between loxP sites. J Mol Biol 150:467-486.

Streit WJ (2002) Microglia as neuroprotective, immunocompetent cells of the CNS. Glia 40:133-139.

Streit WJ, Walter SA, Pennell NA (1999) Reactive microgliosis. Prog Neurobiol 57:563-581.

Swanson RA, Ying W, Kauppinen TM (2004) Astrocyte influences on ischemic neuronal death. Curr Mol Med 4:193-205.

Takano T, Tian GF, Peng W, Lou N, Libionka W, Han X, Nedergaard M (2006) Astrocyte-mediated control of cerebral blood flow. Nat Neurosci 9:260-267.

Tang X, Davies JE, Davies SJ (2003) Changes in distribution, cell associations, and protein expression levels of NG2, neurocan, phosphacan, brevican, versican V2, and tenascin-C during acute to chronic maturation of spinal cord scar tissue. J Neurosci Res 71:427-444.

Theodosis DT, Poulain DA, Oliet SH (2008) Activity-dependent structural and functional plasticity of astrocyte-neuron interactions. Physiol Rev 88:983-1008.

Timsit S, Martinez S, Allinquant B, Peyron F, Puelles L, Zalc B (1995) Oligodendrocytes originate in a restricted zone of the embryonic ventral neural tube defined by DM-20 mRNA expression. J Neurosci 15:1012-1024.

Timsit SG, Bally-Cuif L, Colman DR, Zalc B (1992) DM-20 mRNA is expressed during the embryonic development of the nervous system of the mouse. J Neurochem 58:1172-1175.

Tom VJ, Doller CM, Malouf AT, Silver J (2004) Astrocyte-associated fibronectin is critical for axonal regeneration in adult white matter. J Neurosci 24:9282-9290.

Trachtenberg JT, Chen BE, Knott GW, Feng G, Sanes JR, Welker E, Svoboda K (2002) Long-term in vivo imaging of experience-dependent synaptic plasticity in adult cortex. Nature 420:788-794.

Tsien RY (1998) The green fluorescent protein. Annu Rev Biochem 67:509-544.

Tuason MC, Rastikerdar A, Kuhlmann T, Goujet-Zalc C, Zalc B, Dib S, Friedman H, Peterson A (2008) Separate proteolipid protein/DM20 enhancers serve different lineages and stages of development. J Neurosci 28:6895-6903.

Ullmann A, Perrin D, Jacob F, Monod J (1965) [Identification, by in vitro complementation and purification, of a peptide fraction of Escherichia coli beta-galactosidase]. J Mol Biol 12:918-923.

van PH, Schinder AF, Christie BR, Toni N, Palmer TD, Gage FH (2002) Functional neurogenesis in the adult hippocampus. Nature 415:1030-1034.

Verkhratsky A, Kirchhoff F (2007) Glutamate-mediated neuronal-glial transmission. J Anat 210:651-660.

Verkhratsky A, Orkand RK, Kettenmann H (1998) Glial calcium: homeostasis and signaling function. Physiol Rev 78:99-141.

Verkhusha VV, Kuznetsova IM, Stepanenko OV, Zaraisky AG, Shavlovsky MM, Turoverov KK, Uversky VN (2003) High stability of Discosoma DsRed as compared to Aequorea EGFP. Biochemistry 42:7879-7884.

Vives V, Alonso G, Solal AC, Joubert D, Legraverend C (2003) Visualization of S100B-positive neurons and glia in the central nervous system of EGFP transgenic mice. J Comp Neurol 457:404-419.

Vogelstein B, Gillespie D (1979) Preparative and analytical purification of DNA from agarose. Proc Natl Acad Sci U S A 76:615-619.

Wehr MC, Laage R, Bolz U, Fischer TM, Grunewald S, Scheek S, Bach A, Nave KA, Rossner MJ (2006) Monitoring regulated protein-protein interactions using split TEV. Nat Methods 3:985-993.

Werner HB, Kuhlmann K, Shen S, Uecker M, Schardt A, Dimova K, Orfaniotou F, Dhaunchak A, Brinkmann BG, Mobius W, Guarente L, Casaccia-Bonnefil P, Jahn O, Nave KA (2007) Proteolipid protein is required for transport of sirtuin 2 into CNS myelin. J Neurosci 27:7717-7730.

Westbrook GL (1993) Glutamate receptors and excitotoxicity. Res Publ Assoc Res Nerv Ment Dis 71:35-50.

Wight PA, Dobretsova A (2004) Where, when and how much: regulation of myelin proteolipid protein gene expression. Cell Mol Life Sci 61:810-821.

Wigley R, Hamilton N, Nishiyama A, Kirchhoff F, Butt AM (2007) Morphological and physiological interactions of NG2-glia with astrocytes and neurons. J Anat 210:661-670.

Wilhelmsson U, Li L, Pekna M, Berthold CH, Blom S, Eliasson C, Renner O, Bushong E, Ellisman M, Morgan TE, Pekny M (2004) Absence of glial fibrillary acidic protein and vimentin prevents hypertrophy of astrocytic processes and improves post-traumatic regeneration. J Neurosci 24:5016-5021.

Wolswijk G, Noble M (1989) Identification of an adult-specific glial progenitor cell. Development 105:387-400.

Xu HT, Pan F, Yang G, Gan WB (2007) Choice of cranial window type for in vivo imaging affects dendritic spine turnover in the cortex. Nat Neurosci 10:549-551.

Ye P, Bagnell R, D'Ercole AJ (2003) Mouse NG2+ oligodendrocyte precursors express mRNA for proteolipid protein but not its DM-20 variant: a study of laser microdissection-captured NG2+ cells. J Neurosci 23:4401-4405.

Yu Ma , David Smith, Patrick R. Hof, Bernd Foerster, Scott Hamilton, Stephen J. Blackband,, Mei Yuand Helene Benveniste, (2008) *In vivo* 3D digital atlas database of the adult C57BL/6J mouse brain by magnetic resonance microscopy Frontiers in Neuroanatomy April 2008 (2)

Zhang Q, Haydon PG (2005) Roles for gliotransmission in the nervous system. J Neural Transm 112:121-125.

Zhang Q, Pangrsic T, Kreft M, Krzan M, Li N, Sul JY, Halassa M, Van BE, Zorec R, Haydon PG (2004a) Fusion-related release of glutamate from astrocytes. J Biol Chem 279:12724-12733.

Zhang S, Ma C, Chalfie M (2004b) Combinatorial marking of cells and organelles with reconstituted fluorescent proteins. Cell 119:137-144.

Zhu X, Bergles DE, Nishiyama A (2008) NG2 cells generate both oligodendrocytes and gray matter astrocytes. Development 135:145-157.

Zhuo L, Sun B, Zhang CL, Fine A, Chiu SY, Messing A (1997) Live astrocytes visualized by green fluorescent protein in transgenic mice. Dev Biol 187:36-42.

Zhuo L, Theis M, varez-Maya I, Brenner M, Willecke K, Messing A (2001) hGFAP-cre transgenic mice for manipulation of glial and neuronal function in vivo. Genesis 31:85-94.

Zonta M, Angulo MC, Gobbo S, Rosengarten B, Hossmann KA, Pozzan T, Carmignoto G (2003) Neuron-to-astrocyte signaling is central to the dynamic control of brain microcirculation. Nat Neurosci 6:43-50.