

4. Material und Methoden

4.1. Material

4.1.1. Chemikalien

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 Haen, Hannover; Merck, Darmstadt; Sigma-Aldrich, Taufkirchen; BioRad, München, Invitrogen, Karlsruhe bezogen. Zellkulturmedien und -lösungen wurden von Gibco-Invitrogen, Karlsruhe bezogen.

4.1.2. Gebrauchswaren

Gebrauchswaren, die nicht gesondert aufgeführt sind, wurden bei handelsüblichen Firmen wie Eppendorf, Hamburg; Greiner-Nunc, Nürtingen; Menzel-Gläser, Braunschweig; BD Falcon, Heidelberg und Gilson, Middleton, WI (USA) bestellt.

4.1.3. Gebrauchsfertige Reaktionssysteme

<i>ECL Plus Western-Blot Detection Reagents</i>	Amersham Bioscience
<i>EndoFree Plasmid Maxi Kit</i>	Qiagen, Düsseldorf
<i>Invisorb-DNA Tissue HTS 96-Kit / C</i>	Invitek, Berlin
<i>Invisorb-DNA Tissue Mini Kit</i>	Invitek
<i>pGEM-T Vector System I</i>	Promega, Mannheim
<i>pGEM-T Vector easy System I</i>	Promega
<i>QIAfilter Midi Kit</i>	Qiagen
<i>QIAprep 8 Miniprep Kit</i>	Qiagen
<i>QIAquick Gel Extraction Kit</i>	Qiagen
<i>Odyssey Imaging System</i>	Li-Cor Biosciences GmbH, Bad Homburg

4.1.4. Sterilisation

Die Sterilisation von Lösungen erfolgte im Dampfdruckautoklaven für 30 min bei 120°C und 10⁵ Pascal. Hitzeempfindliche Lösungen wurden sterilfiltriert (Porengröße: 0,2 µm).

4.1.5. Enzyme

Restriktionsendonukleasen vom Typ II (5-20 U/μl) wurden von Roche, Promega und New England Biolabs, Frankfurt bezogen. Es wurden die mitgelieferten Reaktionspuffer verwendet.

<i>Cloned Pfu</i> DNA Polymerase (2,5 U/μl)	Stratagene, La Jolla, CA (USA)
Hi Fi-Taq-Polymerase	Invitrogen
REDTaq™DNA-Polymerase	Sigma-Aldrich
T4 DNA-Ligase (3 U/μl)	Promega
Superscript II-Reverse Transcriptase	Invitrogen
Klenow-Fragment der DNA-Polymerase	Invitrogen
<i>Calf intestine phosphatase</i>	Roche

4.1.6. Verwendete Mauslinien

Alle in dieser Arbeit verwendeten Mäuse wurden in der lokalen Tierhaltungseinheit des Max-Planck-Institutes für Experimentelle Medizin, Göttingen gezüchtet. Sie wurden entsprechend den deutschen und den Richtlinien der Europäischen Union für Versuchstiere behandelt. Wildtypmäuse wurden entweder in der Tierhaltungseinheit gezüchtet oder von Charles River Laboratories, Bad Königshofen, bezogen.

Die verwendeten Wildtypstämme waren:

Inzuchtstamm C57/BI6

C57/BI6 wurde von C.C. Little im Jahr 1921 aus einer Zucht von Abby Lathrop's Bestand weiterentwickelt, der auch zu den Stämmen C57BR und C57L führte. Stämme 6 und 10 wurden 1937 separiert.

Inzuchtstamm FVB/N

Dieser Inzuchtstamm wurde 1935 von einem Auszuchtstamm aus der Schweiz [N:GP(S)] durch das *National Institute of Health* (NIH) erhalten. In den frühen 70er Jahren wurde der Stamm als Inzuchtstamm etabliert. Dabei wurde eine Sensitivität gegen das Friend'sche Leukämie Virus B entdeckt. Zu dieser Zeit wurde eine Inzucht dieser Linie für das Fv1b-Allel durchgeführt und der Stamm wurde FVB genannt. Die Tiere tragen eine Mutation im *Pde6^{brd1}*-Gen und leiden unter einer Retinadegeneration.

Auszuchtstamm NMRI

Dieser Auszuchtstamm aus der Schweiz wurde bei Lynch entwickelt und 1937 von Pioley, NIH als Inzuchtstamm gezüchtet. Von dort ging die Linie

an das Naval Medical Research Institute, USA (NMRI), woher auch der Name stammt. Sie wurde daraufhin am Zentralinstitut für Versuchstierzucht, Hannover, willkürlich verpaart. Er wird nun als Auszuchtbestand gehalten.

Als Inzuchtstamm wird ein Mausstamm bezeichnet, bei dem seit mindestens zwanzig Generationen Geschwisterverpaarungen beibehalten worden sind. Ausser dem Geschlechtsunterschied sind Mäuse eines Inzuchtstammes genetisch identisch, sie sind für praktisch alle genetischen Loci homozygot. Viele Eigenschaften variieren nicht von Generation zu Generation (Beck et al., 2000).

Die verwendeten transgenen Mauslinien sind in Tabelle 2 aufgeführt.

Tab. 2: Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten genetisch veränderten Mauslinien. Die genauere Beschreibung der einzelnen Mauslinien erfolgt in den jeweiligen Abschnitten dieser Arbeit.

Mauslinie	Linienkode	Quelle	genetischer Hintergrund
TgN(hGFAP-ECFP)	GCFD	Vorliegende Arbeit und Hirrlinger et al., 2005	FVB/N
TgN(hGFAP-AmCyan1)	GCYM	Vorliegende Arbeit und Hirrlinger et al., 2005	C57/Bl6
TgN(hGFAP-AsRed2)	GREL	Vorliegende Arbeit und Hirrlinger et al., 2005	FVB/N
TgN(hGFAP-mRFP1)	GRFx	Hirrlinger et al., 2005	FVB/N
TgN(hGFAP-EGFP)	GFE _x	Nolte et al., 2001	FVB/N
TgN(mPLP-ECFP)	PCFx	Vorliegende Arbeit	FVB/N und C57/Bl6
TgN(hGFAP-CreERT2)	GCT _x	Vorliegende Arbeit und Hirrlinger et al. 2006	FVB/N
TgN(mThy1.2-EYFP)	TYF _x	Hirrlinger et al., 2005	FVB/N
TgN(mThy1.2-HcRed1)	THR _x	Hirrlinger et al., 2005	FVB/N
ROSA26-STOPflox-EYFP	ROSY	Srinivas et al., 2001	C57/Bl6
ROSA26-STOPflox-LacZ	ROSB	Soriano, 1999	C57/Bl6
Ell α -Cre	ELLA	Lakso et al., 1992	C57/Bl6
GluRAflox	GLRA	R. Sprengel, P. Seeburg unpubliziert	C57/Bl6
GluRDflox	GLRD	E. Fuchs, H. Monyer unpubliziert	C57/Bl6

4.1.7. Verwendete Bakterienstämme und Zelllinien

4.1.7.1. Escherichia coli, Laborstamm

XL1-Blue (Stratagene)

[recA1, end A1, gyrA96, thi-1, hsdR17, supE44, relA1, lac (F⁻, pro AB, lacI^qZΔM15 Tn10(Tet^r))]

4.1.7.2. Eukaryontische Zelllinien

COS7: Tumorzellen aus der Niere der afrikanischen grünen Meerkatze, SV40 transformiert, Kultivierung in DMEM (5 mM Glucose); 10 % FKS

CHO: Tumorzellen aus Ovarien des chinesischen Hamsters, Kultivierung in F12-Medium; 10 % FKS

HEK293: Embryonale humane Nierenzellen, Kultivierung in DMEM (25 mM Glukose); 5 % FKS

PC12: Phäochromozytomzellen aus der Nebenniere, Kultivierung in DMEM (5 mM Glucose); 10 % FKS, 10 % Pferdeserum, Poly-L-Lysinbeschichtung notwendig

4.1.8. Plasmide

Die Plasmidkarten wurden mit Hilfe des Programmpaketes *DNASar/Lasergene 6* und *SimVector 3* erstellt und dokumentiert. Die in dieser Arbeit verwendeten Plasmide sind in Tab. 3 und 4 zusammengefasst.

4.1.9. Synthetische Oligonukleotide

Die verwendeten Oligonukleotide wurden mit Hilfe des Programms PrimerSelect des Programmpaketes *DNASar/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 H₂O bezeichnet), die Lagerung bei -20°C. In Tabelle 5 und 6 sind die Sequenzen der verwendeten Oligonukleotide aufgeführt. Alle Sequenzen sind in 5' → 3'-Richtung angegeben.

Tab. 3: Übersicht über die im Rahmen der vorliegenden Arbeit klonierten Transgenvektoren und Ausgangsvektoren.

DNA-Konstrukt	Verwendung	Ausgangsvektor	Quelle
phGFAP-ECFP-C1	TgN(hGFAP-ECFP)	pECFP-C1	Vorliegende Arbeit, Hirrlinger et al., 2005
phGFAP-AmCyan1-C1	TgN(hGFAP-AmCyan1)	pAmCyan-C1	Vorliegende Arbeit, Hirrlinger et al., 2005
phGFAP-AsRed2-N1	TgN(hGFAP-AsRed2)	pAsRed-N1	Vorliegende Arbeit, Hirrlinger et al., 2005
phGFAP-CreERT2	TgN(hGFAP-CreERT2)	pGFAP-Univ	Vorliegende Arbeit
pmPLP-ECFP	TgN(mPLP-ECFP)	pPLP-PD-IaATX	Vorliegende Arbeit
phGFAP-mRFP	TgN(hGFAP-mRFP)	pRSETB-mRFP	Hirrlinger et al., 2005

Tab. 4: Übersicht über die verwendeten kommerziell erhältlichen, publizierten und im Rahmen der vorliegenden Arbeit klonierten Plasmide.

Vektor	Promotor	Ausgangsvektor	Quelle
pUniversal	-	pBluescriptII-SK(+)	Vorliegende Arbeit
pCMV-mRFP-C1	CMV	pECFP-C1	Vorliegende Arbeit
pCMV-AsRed	CMV	pUniversal	Vorliegende Arbeit
pPLP-PD-IaATX	mPLP	pBluescript	Fuss et al., unpubliziert
pCreERT2	CMV	pBluescript	Feil et al., 1997
pBS-Tripartite	-	pBluescript	Mayford et al., 1996
pBS-hgh-polyA	-	pBluescript	Hirt et al., 1987
pECFP-C1	CMV		Clontech
pAsRed-N1	CMV		Clontech
pAmCyan-C1	CMV		Clontech
pBluescriptII-SK ⁺	CMV		Stratagene

Tab. 5: Übersicht über die verwendeten Primer zur Genotypisierung genetisch veränderter Mauslinien. Nicht aufgeführt sind Primer, die zur molekularen Klonierung oder zur Sequenzierung verwendet wurden.

Linien-code	Primer Nummer / Sequenz	Bande(n) (bp)	Anlagerungstemperatur (°C)	Mauslinie
GCFD	4750: 5'-CAGGTTGGAGAGGAGACGCATCA	TG 517	60	TgN(hGFAP-ECFP)
	4749: 5'-CCAGCTTGCCCCCAGGATGT			
GCYM	4750: 5'-CAGGTTGGAGAGGAGACGCATCA	TG 327	60	TgN(hGFAP-AmCyan1)
	4751: 5'-GGTGGGTAGCCGGTGAAGC			
GREL	4750: 5'-CAGGTTGGAGAGGAGACGCATCA	TG 478	60	TgN(hGFAP-AsRed2)
	4753: 5'-CCGTCGGCGGGAAAGTTGTT			
GRFx	5517: 5'-GGCCGTCGGAGGGGAAGTT	TG 510	60	TgN(hGFAP-mRFP1)
	5518: 5'-AGGAGCGAGCAGAGCCAGAGC			
PCFx	4649: 5'-CCTCGTGACCACCCTGAC	TG 247	60	TgN(mPLP-ECFP)
	4749: 5'-CCAGCTTGCCCCCAGGATGT			
TYFx	4858: 5'-TCTGAGTGGCAAAAGGACCTTAGG	TG 320	60	TgN(mThy1.2-EYFP)
	4859: 5'-CGCTGAACCTTGTGGCCGTTTACG			
THRx	2200: 5'-TGAGATAATTTGAAGGACTTGG	TG 320	60	TgN(mThy1.2-HcRed1)
	3355: 5'-CGGCCTGCTGAAGGAGAGATGCGCATC			
GCTx	4193: 5'-CCTGGAAAATGCTTCTGTCCG	TG 391	60	TgN(hGFAP-CreERT2)
	4192: 5'-CAGGGTGTATAAGCAATCCC			
PCET	4193: 5'-CCTGGAAAATGCTTCTGTCCG	TG 391	60	TgN(mPLP-CreERT2)
	4192: 5'-CAGGGTGTATAAGCAATCCC			
ROSY/ ROSB	3735: 5'-AAAGTCGCTCTGAGTTGTTAT	KI 250 WT 500	56	TgH(ROSA26-STOPfloxed-EYFP, -LacZ)
	3736: 5'-GCGAAGAGTTTGTCCCTCAACC			
	3737: 5'-GGAGCGGGAGAAAATGGATATG			
GLRA	7975: 5'-CACTCACAGCAATGAAGCAGGAC	WT 200 Floxed 250	55	TgH(GluRAfloxed)
	7976: 5'-CTGCCTGGTAAAGTGACTTGG			
GLRD	7988: 5'-CACTATGCTCAGTTCTCTCAAG	WT 370 Floxed 450	52	TgH(GluRDfloxed)
	7989: 5'-ACGATTGCAACTAAGTTCCACAC			

Tab. 6: Übersicht über die verwendeten Primer zur molekularen Klonierung oder zur Sequenzierung. Nicht aufgeführt sind Primer, die zur Genotypisierung genetisch veränderter Mauslinien verwendet wurden.

Primer Nummer	Primer Sequenz (5'→3')	Fragment-größe	Verwendung
4128	ACCTCCATTAATCCCACCTCCCTCTCTGTGCTG	2,3 kb	Amplifikation von hGFAP-Promotor aus pGFAP-EGFP
4127	GCTCCTCGCCCTTGCTCACCA	2,3 kb	Amplifikation von hGFAP-Promotor aus pGFAP-EGFP
4784	GGCGGCCACCCGGTCGCCACC	750 bp	Amplifikation von ECFF aus pECFF-N1
4785	CCTTAATTAAGCGGCCGCTTTA	750 bp	Amplifikation von ECFF aus pECFF-N1
T7	ATTATGCTGAGTGATACCCGC	sense	Sequenzierung von subklonierten PCR-Produkten
SP6	TAAATCCACTGTGATATCT	antisense	Sequenzierung von subklonierten PCR-Produkten
4361-2	GCCCAACCCACCCCTCAG-3	sense	Sequenzierung in GFAP-Promotor von 5'
4362	CCCGCGCCGAGGTGAAGT-3	sense	Sequenzierung von GFAP-Promotor 3'-Ende in MCS
T3	TTAATTGGGAGTGATTTCCC	antisense	Sequenzierung von pBluescript MCS
4670	AACTGACAACTTAGCGCA	antisense	Sequenzierung pUniversal Intron in MCS 1
4671	GCTTGGCACGTGCCTCTCATG	antisense	Sequenzierung pUniversal poly A in MCS 2
4672	ATGACATCCACTTTCCTTTCTCT	sense	Sequenzierung pUniversal Intron in MCS 2
5635	CCCTTAAGGATCTGACGGTTCACCTAAAC	antisense	Amplifikation CMV-Promotor
5636	CCTTAATTAATAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTC	sense	Amplifikation CMV-Promotor
6312	TGTGATGCTATTGCTTTATTTG	antisense	Sequenzierung SV40 polyA nach 5'

4.1.10. Antikörper

Die für die immunhistochemische Analyse verwendeten Primär- und Sekundärantikörper sind in Tabelle 7 aufgeführt. Die für die Proteinchemie und die Immunzytochemie verwendeten Antikörper sind bei den entsprechenden Kapiteln im Abschnitt 4.2. Methoden angegeben. Das polyklonale Antiserum gegen GFP ist gegen Epitope aus allen GFP-Varianten wie ECFP, EYFP u. ä. gerichtet und wird im Folgenden der Einfachheit halber immer mit der Variante (z. B. anti-ECFP) bezeichnet.

4.1.11. Datenbanken/Software

Datenbankrecherchen (Sequenzsuche und -vergleiche, Literatursuche) wurden mit Hilfe des Internetservice des *National Center for Biotechnology Information* (Internetadresse: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) durchgeführt. Sequenzanalysen, Primerdesign, DNA-Vergleiche und Proteinsequenzanalysen erfolgten mit dem Programmpaket *DNA Star/Lasergene 6*. Fotos wurde mit der Zeiss *LSM-Image-Software* und Adobe *Photoshop 6.0* bearbeitet. Abbildungen wurden mit den Programmen Adobe *InDesign 2.0* und Plasmidkarten mit *SimVector 3.0* erstellt. Daten wurden mit dem Programm *Excel 3.0* verarbeitet. Referenzen wurden mit dem Programm *Reference Manager 10* archiviert. Für die elektrophysiologischen Messungen wurde das Programm *Patch-Master 9.0* (Heka Elektronik) verwendet. Die Bearbeitung der Daten erfolgte mit dem Programm *Igor Pro Version 4.0* (WaveMetrics, Inc.).

4.1.12. Puffer, Medien und Lösungen

Die zur Kultur von eukaryontischen Zellen verwendeten Medien (DMEM 5 mM Glukose, DMEM 25 mM Glukose) wurden käuflich erworben (Invitrogen). Vor Gebrauch wurden hitzeinaktiviertes (56°C, 25 min) fetales Kälberserum (FKS, Invitrogen) und gegebenenfalls 1 % Penicillin/Streptomycin-Lösung (Invitrogen) zugesetzt.

Sato-Medium (100 ml)

2 ml B27 Supplement (Gibco BRL), 1 ml L-Glutamin (200 mM), 1 ml Penicillin/Streptomycin (1 % (w/v)). 1 ml Pferdeserum, 1 ml Natriumpyruvat (1,1 % (w/v)), 10 µl Triiodthyronin (0,34 % (w/v) in 96 % (v/v) Ethanol, Calbiochem), 13 µl L-Thyroxin (0,31 in 0,52 % (w/v) NaOH, 49 % (v/v) Etanol) mit DMEM (25 % Glukose) auf 100 ml auffüllen.

Tab. 7: Übersicht über die verwendeten Antikörper in der Immunhistochemie. Nicht aufgeführt sind Antikörper, die in der Immunzytochemie oder in *Western Blot*-Analysen verwendet wurden.

Antikörper	Spezies	Quelle	Verdünnung
monoklonale Antikörper			
anti-NG2	Ratte	Jaqueline Trotter, Universität Mainz	1 : 100
anti-MAG	Maus	Chemicon	1 : 200
anti-NeuN	Maus	Chemicon	1 : 100
anti-GFAP	Maus	Novocastra	1 : 200
anti-CNPase, 11-5B	Maus	Sigma	1 : 300
anti-GFP	Maus	Molecular Probes	1 : 500
anti-Calbindin	Maus	Sigma	1 : 600
polyklonale Antiseren			
anti-GFP	Kaninchen	Abcam	1 : 200
anti-GluRA	Kaninchen	Chemicon	1 : 150
anti-GluRD	Kaninchen	Chemicon	1 : 150
Sekundäre Antikörper			
Cy3-gekoppelter anti-Ratte-IgG	Ziege	Dianova	1 : 1000
Cy3-gekoppelter anti-Maus-IgG	Ziege	Dianova	1 : 1000
Cy2-gekoppelter anti-Maus-IgG	Ziege	Dianova	1 : 100
Cy3-gekoppelter anti-Kaninchen-IgG	Ziege	Dianova	1 : 1000
Cy2-gekoppelter anti-Kaninchen-IgG	Ziege	Dianova	1 : 100
Cy3-gekoppelter anti-Meerschwein-IgG	Ziege	Dianova	1 : 1000

4.2. Methoden

4.2.1. Molekularbiologische Methoden

Molekularbiologische Standardmethoden orientieren sich soweit nicht anders angegeben nach (Sambrook et al., 1989) und nach Angaben der Hersteller.

4.2.1.1. DNA-Verdau mit Restriktionsendonukleasen

DNA-Restriktionsverdau wurden mit Typ-II Restriktionsendonukleasen in Volumina von 20-200 µl durchgeführt. Die Wahl des 10x Reaktionspuffers richtete sich nach Herstellerangaben. 1 µl Enzym schneidet im einfachen Verdau 1 pmol Schnittstellen pro Restriktionsenzymeinheit U und h (für 1 Nukleotid gilt: 330 g=1 mol). Es wurde meist ein doppelter Überverdau durchgeführt.

4.2.1.2. Generierung nichtkohesiver DNA-Enden

Das Auffüllen der 5'-Überhänge und das gleichzeitige Entfernen von 3'-Überhängen zur Vorbereitung auf die Ligation nicht kompatibler Schnittstellen erfolgte durch den Einsatz von 5 U Klenow-Fragment der DNA-Polymerase (Invitrogen) pro 1 µg DNA. Im Reaktionsansatz enthalten waren zudem dNTPs in einer Konzentration von jeweils 100 µM, 0,1 mg/ml Rinderserumalbumin (BSA) sowie 5x Polymerase-Puffer. Inkubiert wurde für 1 h bei 37°C, die Reaktion wurde dann für 10 min bei 75°C abgestoppt.

4.2.1.3. Dephosphorylierung von DNA-Enden

Nach dem Restriktionsverdau bleiben an den Enden der DNA-Fragmente Phosphatreste zurück, die für die Ligation benötigt werden. Entfernt man diese mit einer Phosphatase, kann keine Selbstligation des Vektors mehr stattfinden. Das einzufügende DNA-Fragment besitzt jedoch noch beide Phosphatreste und kann daher seinerseits immer noch mit der Vektor-DNA ligieren. Die 5'-Phosphatgruppen geschnittener Vektoren wurden bei 37°C für 1 h mit alkalischer Phosphatase aus Kälberdarm (3 U/10 µg DNA, Roche, Penzberg) entfernt, um eine Religation des Vektors ohne Insertion eines DNA-Fragments zu verhindern. Nach einer Aufreinigung mit Hilfe des *QIAquick PCR Purifikations Kits* (Qiagen) nach Angaben des Herstellers wurde die DNA in 10-50 µl 10 mM Tris/HCl pH 8,5 gelöst und

die Konzentration eines Aliquots wurde auf einem Agarosegel abgeschätzt.

4.2.1.4. Ligation von DNA

Bei der Ligation werden Vektor und gewünschtes Insertionsfragment über 5'-Phosphatgruppen mit Hilfe des Enzyms Ligase und unter Verbrauch von ATP verbunden. Die Ligation von DNA-Fragmenten in Plasmidvektoren erfolgte bei 4°C für 12-16 h, 16°C für 12 h oder Raumtemperatur für 4 h durch Inkubation mit T4 DNA-Ligase, wobei Vektor und DNA-Fragment in einem molaren Verhältnis von 1 : 3 eingesetzt wurden. Für einen 10 µl Ligationsansatz wurden nach Angaben des Herstellers 50 - 100 ng Vektor-DNA, 150-300 ng DNA-Fragment mit 3 U T4 DNA-Ligase in dem vom Hersteller mitgelieferten ATP-haltigen Puffer inkubiert.

4.2.1.5. Klonierung von PCR-Produkten

PCR-Produkte wurden über Agarosegele oder mit Hilfe des *QIAquick PCR Purification Kits* (Qiagen) aufgereinigt und anschliessend wie unter 4.2.1.4. beschrieben in den entsprechenden Ligationsansatz eingesetzt. Die Ligation erfolgte z.T. in pGem-T oder pGem-T easy (Promega). Die Reaktion findet hierbei zwischen Adenosin-Überhängen, die die Taq-Polymerase während der PCR-Reaktion an 5'-Enden anfügt, und einem pGem-T oder pGem-T easy Vektor mit Thymidin-Überhängen am 3'-Ende statt. Wurde eine *Proofreading*-Polymerase (Hi Fi-Taq-Polymerase, Invitrogen) verwendet, mussten diese Adenosinüberhänge mit Hilfe einer zweiten Reaktion mit Taq-Polymerase angefügt werden, da *Proofreading*-Polymerasen eine 3'-Exonukleaseaktivität aufweisen. Dazu wurde 1-7 µl des aufgereinigten PCR-Produktes mit 1 µl 10x Puffer, dATP in einer Endkonzentration von 0,3 mM und 5 U Red-Taq-Polymerase in einem Endvolumen von 10 µl für 30 min bei 37°C inkubiert und von diesem Ansatz 1-2 µl in die Ligationsreaktion eingesetzt. PCR-Produkte mit endständigen Restriktionsschnittstellen, die durch die als Primer fungierenden Oligonukleotide eingebracht wurden, wurden zum Teil bei 37°C für 2 h dreifach überverdaut, über ein Agarosegel aufgereinigt, in H₂O gelöst und ligiert.

4.2.1.6. Klonierung von Oligonukleotiden

Für die Generierung einer neuen multiplen Klonierungssequenz (MCS) (Abb. 25) in pBluescript SK⁺ (Stratagene) wurden Oligonukleotide mit der

gewünschten Sequenz von der DNA *Core facility* des Max-Planck-Institutes für Experimentelle Medizin, Göttingen, synthetisiert und nach Entfernung der ursprünglichen MCS in den Vektor eingebracht. Dazu wurden die Oligonukleotide mit 10 mM Tris/HCl pH 8,5 auf eine Konzentration von 10 pmol/µl eingestellt. Je 5 µl der verdünnten *sense* und *antisense* Oligonukleotide wurden gemischt und bei 95°C 2 min inkubiert, um eventuelle Sekundärstrukturen aufzuheben. Nachdem die so behandelten Oligonukleotide langsam auf Raumtemperatur abgekühlt waren, wurden zwischen 10 und 30 ng für eine Ligation in den mit zwei verschiedenen Restriktionsenzymen geöffneten Vektor pBluescript SK⁺ eingesetzt.

4.2.1.7. Herstellung transformationskompetenter Zellen

Zur Erzielung ihrer Transformationskompetenz wurden Bakterien (*ESCHERICHIA COLI* XL1-Blue [recA1, end A1, gyrA96, thi-1, hsdR17, supE44, relA1, lac (F⁻ pro AB, lacI^qZΔM15 Tn10(Tet^r))], Stratagene) in 250 ml TB-Medium (1,2 % (w/v) Bacto Trypton, 2,4 % (w/v) Bacto Hefeextrakt, 0,4 % (w/v) Glycerol, 17 mM KH₂PO₄, 70 mM K₂HPO₄, 30 µg/ml Tetrazyklin) bei 18°C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6 (24-40 h) inkubiert (Inoue et al., 1990). Nach Inkubation auf Eis für 10 min wurde die Bakteriensuspension bei 4°C für 10 min mit 2500 min⁻¹ (GS3-Rotor, Sorvall, Langensfeld) zentrifugiert. Das in 80 ml kaltem TB Jap-Medium (10 mM PIPES, 15 mM CaCl₂, 250 mM KCl mit KOH pH 6,7 eingestellt, 55 mM MnCl₂, sterilfiltriert (0,45 µm Porenweite), 2 % (w/v) Dimethylsulfoxid (DMSO)) resuspendierte Pellet wurde nach Inkubation für 10 min auf Eis bei 4°C für 10 min mit 2500 min⁻¹ (Sorvall GS3-Rotor) zentrifugiert und in 18,6 ml kaltem TB Jap-Medium und 1,4 ml DMSO (Endkonzentration 7,5%) aufgenommen. Nach Inkubation auf Eis für 10 min wurden Aliquots zu je 200 µl in Stickstoff eingefroren und bei -70°C gelagert.

4.2.1.8. Transformation von Bakterien

200 µl transformationskompetente *ESCHERICHIA COLI* XL1-Blue-Bakterien wurden bei 4°C aufgetaut und auf Eis für 10 min mit 3,4 µl einer 1:10 Verdünnung von β-Mercaptoethanol in H₂O inkubiert. Nach Zugabe von 5 µl des Ligationsansatzes und Inkubation auf Eis für 10 min erfolgte ein Hitzeschock bei 42°C für 30 s. Darauf folgte ein zweiminütiger Abkühlungsprozess auf Eis, die Zugabe von 800 µl vorgewärmtem Luria-

Bertani- (LB)-Medium (1 % Bacto-Peptone, 0,5 % Bacto Hefeextrakt, 1 % NaCl, mit NaOH auf pH 7,5 eingestellt, autoklaviert) und eine anschliessende Inkubation von mind. 45 min bei 37°C und 160 min⁻¹, währenddessen die Bakterien das Antibiotikum-Resistenzgen exprimieren. Anschliessend wurden 0,1-1 ml auf antibiotikahaltige LB-Selektionsplatten (1 % Bacto-Peptide, 0,5 % Bacto Hefeextrakt, 1 % NaCl, 1,5 % Agar, mit NaOH auf pH 7,5 eingestellt, autoklaviert und nach dem Abkühlen mit dem entsprechenden Antibiotikum versetzt, (100 µg/ml Ampicillin oder 50 µg/ml Kanamycin)) ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Bei Vektoren mit der Möglichkeit zur Blau-Weiss-Selektion wurden LB-Platten mit zusätzlich 35 µg/ml 5-Brom-4-Chlor-3-Indoyl-β-D-Galaktosid (X-Gal)/15 µg/ml Isopropyl-Thiogalaktosid (IPTG) verwendet.

4.2.1.9. Lagerung von Bakterienkulturen

Zur langfristigen Aufbewahrung von Bakterien wurden je 800 µl Flüssigkultur in LB-Selektionsmedium (1 % Bacto-Peptide, 0,5 % Bacto Hefeextrakt, 1 % NaCl, mit NaOH auf pH 7,5 eingestellt, autoklaviert und nach dem Abkühlen mit dem entsprechenden Antibiotikum versetzt (100 µg/ml Ampicillin oder 50 µg/ml Kanamycin)) mit 200 µl autoklaviertem Glycerol gemischt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschliessend bei -80°C gelagert.

4.2.1.10. Präparation von Plasmiden aus Bakterien

Plasmidpräparationen basierten auf einem modifizierten Protokoll von Birnboim und Doly (Birnboim und Doly, 1979). Die Aufreinigung kleiner Mengen Plasmid-DNA (5-10 µg) beruhte auf der Bindung von DNA an ein Silikagel unter Hochsalzbedingungen (Vogelstein und Gillespie, 1979). Zur Aufreinigung mittlerer (bis 100 µg) und grosser Plasmid-Mengen (bis 500 µg) wurde ein Ionenaustauscher-Kunstharz verwendet (Qiagen). Für Präparationen in kleinem Massstab wurden Bakterienkolonien von LB-Platten mit sterilen Zahnstochern in 3 ml LB-Selektionsmedium (100 µg/ml Ampicillin oder 50 µg/ml Kanamycin) überführt und über Nacht unter Schütteln bei 37°C inkubiert. Präparationen mittlerer bzw. grosser Plasmid-Mengen erfolgten nach Animpfen von 25 bzw. 100 ml Übernachtskulturen in LB-Selektionsmedium. Die Aufreinigung wurde mit QIAprep-Kits (Qiagen) nach Angaben des Herstellers durchgeführt (Qiagen Plasmid Handbuch).

4.2.1.11. Präparation genomischer DNA aus Mausgeweben

Genomische DNA (bis 50 µg) wurde aus Schwanzbiopsiematerial (ca. 0,5 cm) oder aus anderen Geweben mit dem *Invisorb-Kit* (Invitex) oder *QIAamp Tissue Kit* (Qiagen) nach Angaben des jeweiligen Herstellers gewonnen und bei 4°C gelagert. Für die Genotypisierung über die PCR-Analyse wurde routinemässig 1 µl eingesetzt.

4.2.1.12. Präparation von Gesamt-RNA aus Mausgeweben

Präparierte Mausgewebe wurden mit Hilfe eines Ultraturrax (IKA Labortechnik, Staufen) zerkleinert. Die Präparation von Gesamt-RNA erfolgte mit Hilfe des *RNeasy Mini Kit* (Qiagen). Sie wurde nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Nach der RNA-Präparation wurden die Eluate bei -70°C eingefroren. Die Konzentration der RNA wurde spektrometrisch bei OD₂₆₀ vermessen.

4.2.1.13. Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die DNA- bzw. RNA-Konzentration einer Lösung wurde mit Hilfe eines Spektralphotometers (Ultrospec 3000, Pharmacia) durch Messung der optischen Dichte bestimmt. Nach Verdünnung der wässrigen Lösung (üblicherweise 1:100) wurde die Absorption bei 260 nm in einer Quarzküvette bestimmt und nach folgender Formel berechnet:

$$\text{Konzentration } [\mu\text{g}/\mu\text{l}] = \text{OD}_{260} \times F \times \text{Verdünnungsfaktor}/1000$$

Für dsDNA entspricht eine OD₂₆₀ = 1 einer Konzentration von 50 µg/ml (F = 50 µg/ml); für RNA-Lösungen und ssDNA 40 µg/ml (F = 40 µg/ml) bei einer Schichtdicke von 1 cm. Durch Messung der Absorption bei 280 nm wurde der Verunreinigungsgrad der Lösung bestimmt, wobei ein Wert von 1,5 - 2,0 für das Verhältnis OD₂₆₀/OD₂₈₀ eine wenig verunreinigte Lösung anzeigt. Die Molarität einer Oligonukleotidlösung wurde über die Extinktionskoeffizienten E [M⁻¹cm⁻¹] der Nukleotide nach der Formel $M = \text{OD}_{260}/E_{\text{gesamt}}$ ermittelt, wobei E_{gesamt} die Summe der Extinktionskoeffizienten darstellt (Guanin: E = 12010 M⁻¹cm⁻¹; Adenin: E = 15200 M⁻¹cm⁻¹; Thymin: E = 8400 M⁻¹cm⁻¹; Cytosin: E = 7050 M⁻¹cm⁻¹).

4.2.1.14. Agarose-Gelelektrophorese von DNA

Für die Auftrennung von DNA-Fragmenten zwischen 0,5 und 15 kb Grösse wurden 0,7-2 % Agarosegele verwendet. Die Agarose (Seakem LE Agarose, BioRad, München) wurde in TAE (40 mM Tris/Acetat, 1 mM

EDTA, pH 8) zum Lösen aufgekocht und nach Zusatz von Ethidiumbromid (Endkonzentration 1 µg/ml) in einen Gelschlitten gegossen. Die Proben-taschen wurden durch das Einsetzen verschiedener Gelkämme in den Gelschlitten erhalten. Der Schlitten wurde in eine Flachgelkammer gelegt und mit Laufpuffer (TAE) bedeckt. Vor dem Auftragen wurden die DNA-Proben mit DNA-Ladepuffer (0,25 % (w/v) Bromphenolblau; 0,25 % (w/v) Xylencyanol; 15 % (w/v) Ficoll (Typ 400)) versetzt. Die angelegte Spannung betrug abhängig von der Grösse der Gelkammer und der Agarosekonzentration 30-160 V (5-10 V/cm) (Spannungsgerät: Pharmacia GmbH, Heidelberg). Durch die Interkalation von Ethidiumbromid in die DNA konnte diese nach der Elektrophorese auf einem UV-Illuminator (Intas UV-Systeme, Heidelberg) sichtbar gemacht und fotografiert werden. Als Grössenmarker dienten entweder der 100 bp Marker oder der 1 kb Marker (Fermentas, St. Leon-Rot). Gelkammer, Kämme und Schlitten wurden von der institutseigenen Werkstatt hergestellt.

4.2.1.15. Elution von DNA aus Agarosegelen

Zur Elution von DNA aus Agarosegelen wurden das *QiaQuick Gel Extraction Kit* (Qiagen) verwendet. Der Gelbereich, der die aufzu-reinigende DNA enthält, wurde unter langwelligem UV-Licht (356 nm, Intas UV-Systeme, Heidelberg) mit einem Einwegskalpell aus dem Gel geschnitten. Das in ein Reaktionsgefäss überführte Gelfragment wurde nach Angaben des Herstellers aufgereinigt

4.2.1.16. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion wurde nach Standardprotokollen durchgeführt. Als Zeitintervall für die Elongation wurde eine Rate von etwa 500 bp/min zu Grunde gelegt. Standardreaktionen fanden in einem Volumen von 20 µl statt. Die Reaktionen wurden in einem DNA *Engine TETRAD 2 Peltier Thermal Cycler* (MJ Research, Waltham, MA, USA) durchgeführt. Die Optimierung der Reaktion erfolgte durch Zugabe von BSA, DMSO, Tween 20 oder „Substanz Q“ (Qiagen) und der Veränderung der MgCl₂-Konzentration, der Anlagerungs- und/oder der Extensions-temperatur oder der Zyklenzahl. Ein typischer Ansatz (20 µl) setzt sich wie folgt zusammen: 14,3 µl H₂O, 2 µl 10x Puffer, 1 µl Primer 1 (5 µM), 1 µl Primer 2 (5 µM), 0,7 µl RedTaq-DNA-Polymerase.

4.2.1.17. DNA-Sequenzierung

DNA-Sequenzanalysen wurden von der DNA *Core facility* des Max-Planck-Institutes für Experimentelle Medizin, Göttingen, Arbeitsgruppe 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.

4.2.1.18. Reverse Transkriptase-PCR

Boten-RNA (mRNA) wurde durch Reverse Transkriptase (RT)-PCR nachgewiesen. Dazu wurde Gesamt-RNA aus Geweben von Wildtyp- und transgenen Mäusen mit Hilfe des *RNeasy mini kits* (Qiagen) nach Angaben des Herstellers aufgereinigt. Die Konzentration der erhaltenen RNA wurde spektrometrisch bestimmt und 1 µg als Matrize für eine RT-Reaktion eingesetzt. Die entsprechende komplementäre DNA (cDNA) wurde durch eine reverse Transkription unter Verwendung der *Superscript II* Reversen Transkriptase (Invitrogen) nach Angaben des Herstellers synthetisiert. Es wurde als interne Kontrolle zusätzlich zu dem interessierenden Fragment ein 237 bp grosses Fragment von β-Aktin amplifiziert (*sense* und *antisense Primer* 5'-GGG TCA GAA GGA CTC CTA TG-3' und 5'-GGT CTC AAA CAT GAT CTG GG-3').

4.2.1.19. Analyse der Cre-vermittelten Rekombination

Die Cre-vermittelte Exzision der mit LoxP-Sequenzen flankierten STOP-Kassette in Hirngewebe von Mäusen nach Behandlung mit Tamoxifen wurde analysiert. Dazu wurden doppeltransgene TgN(hGFAP-CreERT2) x R26-EYFP Mäuse acht Tage lang einmal täglich mit 1 mg Tamoxifen injiziert. Aus verschiedenen Geweben wurde genomische DNA mit Hilfe des *Invitek Tissue Mini Kits* (Invitek) nach Angaben des Herstellers isoliert. *Primer SA sense* 5'-GGT TGA GGA CAA ACT CTT CGC-3', *PGK antisense* 5'-CTA CCC GCT TCC ATT GCT CAG-3' oder *EYFP antisense* 5'-CTC GTT GGG GTC TTT GCT CAG-3' wurden für eine PCR mit einer Anlagerungstemperatur von 57°C und 37 Zyklen verwendet. Die Amplifikation eines 900 bp grossen Fragmentes zeigte die Cre-vermittelte Rekombination an, während die Amplifikation eines 480 bp grossen Fragmentes die nichtrekombinierte DNA anzeigte.

4.2.2. Manipulation und Zucht von Mäusen

Im Alter von 4-6 Wochen wurden die Mäuse unter Verwendung eines Ohrstanzgerätes mit einem Lochcode markiert. Zur Verwaltung des Mausbestandes wurde das Datenbankprogramm PyRAT (Scionics Computer Innovation GmbH, Dresden) verwendet.

4.2.2.1. Mikroinjektion von DNA in befruchtete Oozyten

Für die Pronukleusinjektion von DNA wurde ein Verfahren nach Standardprotokollen verwendet (Gordon et al., 1980; Gordon und Ruddle, 1981; Gordon und Ruddle, 1983; McKnight et al., 1983; Palmiter et al., 1982).

Zur Injektion wurde das klonierte DNA-Konstrukt durch präparativen restriktionsenzymatischen Verdau von Vektorsequenzen befreit und mit Hilfe des *QiaQuick Gel Extractions Kits* (Qiagen) aufgereinigt. Die Elution erfolgte in Mikroinjektionspuffer (5 mM Tris/HCl (pH 7,4), 0,1 mM EDTA). Die erhaltene linearisierte DNA wurde in Mikroinjektionspuffer auf eine Konzentration von 30 ng DNA/ μ l eingestellt und die Qualität über eine Gelelektrophorese und anschliessende Photodokumentation überprüft. Bis zur Injektion wurde die DNA in autoklavierten Reaktionsgefässen bei -20°C gelagert.

Die Mikroinjektion erfolgte in den männlichen Pronukleus von 0,5 Tage alten murinen Zygoten (1-Zell-Stadium). Durch eine hormonelle Ovulationsauslösung (Superovulation) kann bei Mausweibchen zuverlässig eine Ovulation termingerecht herbeigeführt werden. Unmittelbar nach der Applikation der Hormone erfolgte dann die Verpaarung mit fertilen Männchen. Vaginalpfropf-positive Tiere wurden dann zur Embryonengewinnung mit CO_2 getötet. Die Eileiter wurden präpariert und die Eileiterampulle unter mikroskopischer Kontrolle ruptiert. Nach enzymatischer Abtrennung der Kumuluszellen mit Hyaluronidase-Lösung wurden die Embryonen im Brutschrank kultiviert. Die Embryonen wurden zunächst unter dem Mikroskop auf lebende und tote untersucht und aussortiert. Lebende Embryonen wurden dann mit der Haltekapillare fixiert. Mit der Mikroinjektionskapillare wurde dort die Zona pellucida, die Zytoplasmamembran und die Pronukleusmembran durchstoßen und etwa 1-2 pl der auf 3 ng/ μ l eingestellten DNA-Lösung in den grösseren männlichen Vorkern injiziert.

Die Embryonen wurden in pseudogravide Ammen des für diesen Zweck geeigneten Stammes NMRI (C57BL6×DBA/2) FI transferiert. Zur Induktion einer Pseudogravidität wurden diese sich im Östrus befindenden Ammen zuvor mit vasktomierten Männchen verpaart. Durch den Paarungsreiz kommt es dann zur hormonellen Gravidität (Pseudogravidität). Diese Ammentiere wurden dann mit 2,5% 2,2,2-Tribromethanol in H₂O (100 µl/10 g Körpergewicht i. p.) narkotisiert und die mikroinjizierten Zygoten in das Infundibulum injiziert. Ein Teil der übertragenen Embryonen entwickelte sich in der Empfängermaus weiter.

Die Mikroinjektion und die Vorbereitung der Mäuse wurde von Simone Schmidt (Tierhaus des Max-Planck Institutes für experimentelle Medizin, Göttingen) durchgeführt.

4.2.2.2. Schwanzbiopsien

Schwanzbiopsien wurden üblicherweise im Alter zwischen 3 und 4 Wochen während des Absetzens von der Mutter durchgeführt, um daraus genomische DNA zur routinemässigen Genotypisierung transgener Mäuse mittels PCR zu gewinnen. Dabei wurde ein etwa 0,5 cm langes Schwanzstück mit einer Schere entfernt. Die Schwanzbiopsie wurde in einem Reaktionsgefäss bei –20°C gelagert.

4.2.2.3. Setzen einer corticalen Läsion

Die Mäuse wurden durch eine intraperitoneale Injektion von 3 % 2,2,2-Tribromethanol in H₂O (100 µl/10 g Körpergewicht i. p.) anästhesiert. Nach Fixierung der Tiere auf einem Stereotaxie-Instrument nach David Kopf (Fine Science Tools GmbH, Heidelberg) wurde die Kopfhaut median mit einem 10 mm langen Sagittalschnitt eröffnet. Die Wunde wurde mittels zweier scharfer Haken offen gehalten. Die Trepanation wurde mit einem 0,7 mm-Handbohrer durchgeführt. Mit Hilfe einer 0,6 x 25 mm messenden Kanüle wurden dann die Läsionen rechtshemisphärisch ungefähr nach folgenden Koordinaten angebracht: Bregma = 0; x (lateral) = 2 mm; Y (rostral) = 2 mm (bzw. 4 mm für die zweite Läsion) und z (ab Schädeloberfläche) = 3 mm. Die Kanüle wurde für 20 s intrakraniell belassen und dann langsam zurückgezogen. Die Trepanationswunde wurde offen gelassen, der Hautschnitt dagegen mit zwei Einzelknopfnähten verschlossen. Die Tiere wurden einzeln in ruhig gestellte Käfige zurückgesetzt, um sich von der Operation zu erholen. Alle Operationen wurden von cand. med. Christian Braun durchgeführt.

4.2.3. Histologische und immunhistochemische Methoden

4.2.3.1. Ganzkörperfixierung von Mäusen durch Perfusion

Nach Anästhesie mit 2,5% 2,2,2-Tribromethanol in H₂O (100 µl/10 g Körpergewicht i. p.) wurde der Brustkorb der Maus geöffnet, das Herz freigelegt, eine Kanüle in die linke Herzkammer eingeführt und ein Schnitt im rechten Vorhof gesetzt. Die Kanüle war mit einer Peristaltikpumpe verbunden (Heraeus SR70, Flussrate 0,2-0,5 ml/s, Heraeus, München). Nach dem Ausspülen des Blutes mit ca. 30 ml *Hank's Balanced Salt Solution* (HBSS) wurde mit 4% (w/v) Paraformaldehyd in 100 mM Natriumphosphatpuffer (PB; pH 7,4) fixiert, das Gehirn und weitere Gewebe präpariert und diese bei 4°C über Nacht in der Fixierungslösung nachfixiert. Eine kurzzeitige Lagerung erfolgte in phosphatgepufferter Salzlösung (PBS, 10 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7,4; 150 mM NaCl) mit 0,01% (w/v) NaN₃.

4.2.3.2. Schnellfixierung von Gehirnen

Die Mäuse wurden durch Dekapitation getötet und die Gehirne herauspräpariert. Die Gehirne wurden über Nacht in 4 % PFA in PB fixiert und anschliessend in PBS mit NaN₃ (0,01 % (w/v)) gelagert. Die Methode der Schnellfixierung wurde für Jungtiere bis zu einem Alter von 9 Tagen oder für die Suche nach exprimierenden Stammtieren verwendet.

4.2.3.3. Herstellung von Vibratomschnitten

Gehirne, die gewonnen wurden wie unter 4.2.3.2. beschrieben, wurden in kaltem PBS (pH 7,4) an einem Vibratom (VT1000s, Leica, Solms) geschnitten. Die frei flottierenden Schnitte in einer Dicke von 40-100 µm wurden in kaltem PBS (pH 7,4) mit 0,01 % (w/v) NaN₃ versetzt und in 24-well-Platten bis zu einer Woche bei 4°C zur weiteren Prozessierung durch eine immunhistochemische Analyse aufbewahrt.

4.2.3.4. Histochemische Analyse der β-Galaktosidaseaktivität auf Vibratomschnitten

Es wurden Gehirne und Rückenmarkspräparationen verwendet, die wie in 4.2.3.2. beschrieben, fixiert wurden und 300 µm frei flottierende Vibratomschnitte hergestellt. Die Schnitte wurden im Dunkeln bei 37°C für mind. 24 h in X-Gal-Färbelösung (5 mM Kaliumferrozyanid, 5 mM Kaliumferrizyanid, 2 mM MgCl₂, 333 µg/ml X-Gal in PBS) inkubiert,

dreimal in PBS gewaschen und anschliessend entweder für eine immunhistochemische Analyse eingesetzt oder direkt in Immu-Mount (Shandon, Pittsburgh, PA, USA) eingedeckt.

4.2.3.5. Immunhistochemische Analyse von Vibratomschnitten

Sagittale Serienschnitte (40-50 μm) perfusionsfixierter Gehirne von Mäusen verschiedenen Alters und Genotyps wurden für 30 min in PBS/0,4% Triton-X100 permeabilisiert und anschliessend für 30 min bei Raumtemperatur in Blockierungspuffer (0,4% Ziegenserum (ZS) in PBS/0,2% Triton-X100) inkubiert. Die Inkubation mit in 1 % ZS in PBS/0,05% Triton-X100 verdünnten Primärantikörpern erfolgte über Nacht bei 4°C. Nach zweimaligem Waschen für 5 min mit PBS wurde für 2 h mit dem in 1,5% ZS in PBS verdünnten Sekundärantikörper inkubiert und anschliessend wiederum 2 mal 5 min mit PBS gewaschen. Wahlweise folgte daraufhin eine Inkubation mit Diaminophenylindol (DAPI, 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (w/v)) in PBS, um die Zellkerne anzufärben und ein letzter Waschschrift mit PBS. Die Schnitte wurden in einer mit Leitungswasser gefüllten Glasschale auf Objektträger gezogen und mit Immu-Mount eingedeckt. Für epifluoreszenzmikroskopische Aufnahmen wurde ein Leica DMRXA verwendet und die Bilder mittels Openlab 2.0 (Improvision, Tübingen) aufgenommen. Für konfokale Fluoreszenzaufnahmen wurde ein Zeiss LSM 510NLO, Axiovert 200M (Zeiss, Oberkochen) verwendet. Alle Digitalfotos wurden mit Hilfe der Zeiss LSM Software oder Adobe Photoshop 7.0 gespeichert und bearbeitet.

4.2.3.6. Herstellung von Paraffinschnitten

Es wurden Gehirne von adulten Wildtyp-Mäusen wie in 4.2.3.1. beschrieben präpariert. Anschliessend wurden die Gehirne mit Hilfe eines Gewebe-Infiltrationsautomaten (HMP 110; Programm: 50 % Ethanol 1 h, 70 % Ethanol 2 h, 70 % Ethanol 2 h, 96 % Ethanol 1 h, 96 % Ethanol 1 h, 100 % Ethanol 1 h, 100 % Ethanol 1 h, Isopropanol 1 h, Xylol 2 h, Xylol 2 h, Paraffin 2 h, Paraffin 2 h, MICROM International GmbH, Walldorf) paraffiniert und dann an einer Paraffin-Ausgiessstation (AP 280, MICROM International GmbH) eingebettet. Paraffinschnitte wurden mittels eines Schlittenmikrotom (HM 400, MICROM International GmbH) in einer Dicke von 5 μm angefertigt.

4.2.3.7. Immunhistochemische Analyse von Paraffinschnitten (DAKO-LSAB2-System und Hämatoxylin-Gegenfärbung)

Es wurden 5 µm dicke Schnitte von in Paraffin eingebetteten Gehirnen angefertigt, auf beschichtete Objektträger (Histobond, Marienfeld, Lauda-Königshofen) aufgezogen und über Nacht bei 37°C getrocknet. Durch eine zehnmündige Inkubation bei 60°C und eine absteigende Alkoholreihe (je 2x 2 min in 100 %, 96 % und 70 % Ethanol) erfolgte zunächst die Entparaffinisierung der Schnitte, danach ein Inkubationsschritt in 10 mM Zitratpuffer, pH 6 (5 min). Anschliessend wurden die Schnitte 10 min in heissem 10 mM Zitratpuffer, pH 6 bei 650 Watt in der Mikrowelle gekocht und 20 min bei Raumtemperatur abgekühlt. Nach kurzer Inkubation in 50 mM Tris/HCl, pH 7,6 mit 2% Milchpulver wurden die Objektträger in das *Coverslip-System* (DAKO, Glostrup, Dänemark) eingesteckt und nochmals mit 50 mM Tris/HCl, pH 7,6 mit 2% Milchpulver gespült, um den Sitz der *Coverplates* zu überprüfen. Es folgte die Inaktivierung der endogenen Peroxidase durch fünfminütige Inkubation mit 100 µl 3% H₂O₂. Danach wurde mit 50 mM Tris/HCl, pH 7,6 mit 2 % Milchpulver gespült. Um unspezifische Hintergrundfärbung zu reduzieren, wurden die Schnitte bei Raumtemperatur 10 min mit 1 : 5 verdünntem ZS (jeweils 100 µl) inkubiert. Anschliessend wurde das ZS dekantiert und der primäre Antikörper in 1% BSA in PBS für eine Stunde bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C inkubiert. Danach wurde mit 50 mM Tris/HCl, pH 7,6 mit 2 % Milchpulver gewaschen und die Schnitte 30 min bei Raumtemperatur mit dem biotinylierten Sekundärantikörper inkubiert. Nach Spülen mit 50 mM Tris/HCl, pH 7,6 mit 2% Milchpulver wurde der Meerrettich-Peroxidase-Streptavidin-Komplex (Vector Elite ABC Kit) appliziert; die Inkubation erfolgte wiederum für 30 min bei Raumtemperatur. Nach erneutem Spülen mit 50 mM Tris/HCl, pH 7,6 wurden die Objektträger liegend weiterbehandelt. Zunächst wurde das Gewebe mit einem Fettstift (DAKO *Cytomation Pen*) umrandet, der eine hydrophobe Barriere bildet. Schliesslich erfolgte die enzymhistochemische Reaktion durch Auftragen von 100 µl Diaminobenzidin in DAKO-Substratpuffer. Nach 10 min wurde die Lösung dekantiert und die Schnitte zweimal mit H₂O gespült. Für die Hämatoxylin-Kerngegenfrbung wurden die Schnitte 30 s in saurem Hämalaun (0,1% (w/v) Hämatoxylin, 0,02% NaI (w/v), 5% (w/v) Kalialaun (K₂Al₂(SO₄)₄·24 H₂O), 5% (w/v) Chloralhydrat, 0,1% (w/v) Zitronensäure, frisch filtriert) gefärbt, kurz in HCl-Alkohol (0,25% (v/v) HCl konz., 70% (v/v) Ethanol in H₂O) differenziert und in Scotts-Lösung (0,2% (w/v) KHCO₃, 2%MgSO₄ (w/v in

H₂O) gebläut. Zuletzt wurden die Paraffinschnitte in H₂O gespült und 1 min in 50 %, 1 min in 70 %, 2x 1 min in 80 % und 2x 5 min in 100% Ethanol dehydriert. Um die Schnitte einzudecken, wurden sie für 3x 5 min in Xylol inkubiert und mit Immu-Mount eingedeckt.

4.2.3.8. Immunzytochemische Analyse von Zellkulturen

Für immunzytochemische Anfärbungen wurden astrogliareiche Primärkulturen auf Glas-Deckgläschen (12 mm Durchmesser, Menzel-Gläser) kultiviert. Die Zellen wurden bei Raumtemperatur mit 3,5% Paraformaldehyd in PBS 10 min fixiert. Nach zweimaligem 10-minütigen Waschen in PBS wurden die Zellen in 0,1% Glycin in PBS inkubiert, um überschüssige Bindungsstellen abzusättigen. Danach wurden die Zellen durch Inkubation mit 0,3% Triton-X-100, 0,1% Glycin in PBS 10 min lang permeabilisiert. Die Antikörper wurden in PBS mit 10% ZS verdünnt. Die fixierten und permeabilisierten Zellen wurden für 2 h mit den Primärantikörpern (Maus monoklonal anti-GFAP (1 : 1000, Novocastra, Newcastle upon Tyne, UK), Kaninchen polyklonal anti-GFP (1 : 1000, Abcam, Cambridge, UK), Kaninchen polyklonal anti-Cre (1 : 500, Babco, Richmond, CA, USA)) inkubiert. Danach erfolgte die Inkubation mit Fluoreszenzfarbstoff-markierten Sekundärantikörpern (Cy2-markierter anti-Maus-IgG (1:1000), Cy2-markierter anti-Kaninchen-IgG (1:1000), Cy3-markierter anti-Maus-IgG (1:1000) oder Cy3-markierter anti-Kaninchen-IgG (1:1000) Antikörper (Dianova, Hamburg) unter Lichtausschluss für 30 min. Nach jeder Inkubation mit Antikörpern wurden die Zellen zweimal mit PBS je 5 min lang gewaschen. Die Anfärbung der Zellkerne erfolgte mit DAPI (1 µg/ml (w/v)) in PBS, gefolgt von zwei Waschschritten mit PBS für jeweils 5 min. Digitale Fotos wurden mit Openlab 2.2.3 (Improvision) mit Hilfe des Fluoreszenzmikroskops DM RXA (Leica) aufgenommen.

4.2.4. Western Blot-Analyse

4.2.4.1. Herstellung von Proteinextrakten

Proteinextrakte von Organen sowohl von transgenen wie auch Wildtyp-Mäusen wurden hergestellt. Dazu wurden die Gewebe entnommen 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 (4.2.4.1.).

4.2.4.2. 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 H₂O in 200 µl verdünnt. 1 ml alkalische Kupferreagenz (frisch hergestellt aus: 100 ml 2% Na₂CO₃ in 0,1 M NaOH; 1 ml 2% Na/K-Tartrat in H₂O; 1 ml 1% CuSO₄ in H₂O) wurden zugegeben. Nach einer Inkubationszeit von 15 min wurden 100 µl Folin-Ciocalteus Phenolreagenz (Merck, 1:2 vorverdünnt in H₂O) zugegeben und sofort kräftig gemischt. Nach einer Inkubationszeit von mind. 45 min bei Raumtemperatur wurde die OD₅₉₅ in einem Mikrotiterplattenlesegerät (Dynex Technologies., Chantilly, Virginia, USA) gemessen und die Konzentration des Proteingehaltes mit Hilfe einer Eichgerade (BSA als Standard) bestimmt.

4.2.4.3. Western Blot-Analyse (Biorad)

Probenvorbereitung

Zur Durchführung der *Western Blot*-Analyse wurde für eine Spur 100 µg Proteinprobe in 20 µl Ladepuffer (250 mM Tris/HCl, 40% (w/v) Glycerin, 0,004% (w/v) Bromphenolblau, 5% (w/v) Natriumdodezylsulfat (SDS, (Laemmli, 1970)) vorbereitet. Zur Reduzierung der Disulfidbrücken in Proteinen wurde zu jeder Probe 1 µl β-Mercaptoethanol zugegeben. Zur vollständigen Denaturierung wurden die Proteinproben für 3 min bei 100°C inkubiert. Die Proben wurden auf Eis abgeschreckt, kurz zentrifugiert und vollständig in eine Tasche des Gels aufgetragen.

Gelelektrophorese und Elektrotransfer

Proteine können nach ihrer molaren Masse mit der Methode der SDS-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) aufgetrennt werden. Es wurden Polyacrylamid-Gele (Angaben für zwei Gele) mit einem 4,2 %igen Sammelgel (0,7 ml Acrylamid (30 % (w/v)), Bisacrylamid (0,8 % (w/v))-Mischung, 0,63 ml Sammelgelpuffer (0,5 M Tris/HCl pH 6,8), 3,6 ml H₂O, 50 µl SDS (10 % (w/v) in H₂O), 10 µl N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin und 20 µl Ammoniumperoxodisulfat (APS, 10 % (w/v) in H₂O) und einem

10 %igen Trenngel (5 ml Acrylamid; Bisacrylamid-Mischung; 1,875 ml Trenngelpuffer (3 M Tris/HCl pH 8,9), 7,9 ml H₂O, 150 µl SDS (10 % (w/v) in H₂O), 25 µl N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin und 50 µl APS (10 % (w/v) in H₂O_{dd}) verwendet. Als Protein-Größenmarker wurde der *SeeBluePlus2 prestained Standard Marker* (Invitrogen) verwendet. Die aufgetragenen Proben wurden elektrophoretisch (Laemmli, 1970) für 1 h bei 20 mA konstantem Strom pro Gel in Laufpuffer (25 mM Tris/HCl, 192 mM Glycin, 0,1 % (w/v) SDS, pH 8,5) aufgetrennt und dann bei 100 V während einer Stunde bei 4°C in Transferpuffer (25 mM Tris, 192 mM Glycin, pH 8,3 mit 20 % (v/v) Methanol) auf eine Nitrozellulosemembran transferiert (Towbin et al., 1979). Die Membranen wurden in 50 ml-Zentrifugationsröhrchen überführt und auf einem Taumelroller inkubiert. Das Blockieren unspezifischer Bindungsstellen erfolgte für 2 h in PBS mit Milchpulver (5 % (w/v)) und Tween-20 (0,05 % (w/v)). Der erste Antikörper wurde über Nacht bei 4°C mit 5 ml Antikörperlösung (polyklonaler anti-ER α Antikörper (1 : 2500, HC-20, Santa Cruz Biotechnologie) oder monoklonaler anti-GAPDH Antikörper (1 : 15000, 6C5, Advanced Immunochemical Inc., Long Beach, Ca, USA) in PBS mit Milchpulver (5 % (w/v)) und Tween-20 (0,05 % (w/v))) inkubiert. Nach viermaligem Waschen für 5 min mit 30 ml PBS, Tween-20 (0,05% (w/v)) wurden die Membranen für 1 h mit dem Sekundärantikörper (Merrettichperoxidasegekoppelter anti-Kaninchen-IgG Antikörper, 1 : 2500, sc-2004, Santa Cruz Technologies, Heidelberg) in 5 ml PBS auf dem Taumelroller bei 4°C inkubiert. Nach Waschen in PBS (4 x 5 min) wurden die Proteinbanden mit Hilfe des ECL-Systems (*Enhanced Chemiluminescent* Detektionssystem, Amersham Biosciences) nach Angaben des Herstellers auf einem Film visualisiert. Die Membranen wurden in Klarsichtfolie verpackt, und der Röntgenfilm (Hyperfilm ECL, Amersham Biosciences) wurde je nach Notwendigkeit bis zehn Minuten in einer Filmkassette belichtet.

4.2.4.4. Western Blot-System nach NuPAGE

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 Lithiumdodezylsulfat; 4 µM EDTA; 18,75 ‰ (w/v) Serva Blue G250 Lösung; 6 ‰ (w/v) Phenolrot Lösung, pH 8,5), dem jeweils 1 µl β -Mercaptoethanol zugesetzt wurde, verwendet und die Proben für 10 min bei 70°C inkubiert.

Gelelektrophorese und Elektrotransfer

Als Gelsystem wurde das *NuPage Bis-Tris-System* (Invitrogen) benutzt. Es wurden 4-12 %ige Gradientengele mit 12 Taschen eingesetzt und 15-20 µl Probe pro Tasche geladen. Das Gel wurde mit einer Spannung von 200 V für 2 h in Laufpuffer (50 mM MES (2-(N-Morpholino)-ethansulfonsäure); 50 mM Tris-Base; 3,5 mM SDS, 1,025 mM EDTA pH 7,3) gefahren (110 mA). Als Protein-Größenmarker wurde der SeeBluePlus2 *prestained* Standard Marker verwendet.

Der Elektrotransfer erfolgte im Feucht-Verfahren in einer Blotkammer (Invitrogen). Der Transfer wurde bei 30 V und 170 mA für 1 h durchgeführt. Die Antikörperdetektion erfolgte mit dem *Odyssey Imaging System* (Li-Cor Biosciences GmbH). Die Membran wurde 2 h bei Raumtemperatur mit *Odyssey Imaging System*-Blockierungspuffer und über Nacht bei 4°C mit den primären Antikörpern, die in *Odyssey Imaging System*-Blockierungspuffer verdünnt wurden, inkubiert. Nach vier Waschschritten (2x 15 min und 2x 5 min) mit Waschlösung (PBS; 0,05 % (w/v) Tween 20) wurde die Membran mit einem fluoreszenzgekoppelten Sekundärantikörper (*Anti-rabbit-IRDye 800*, Verdünnung 1:5000 in *Odyssey Imaging System*-Blockierungspuffer, Li-Cor Biosciences GmbH) für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgten die gleichen Waschschrritte wie nach der Inkubation mit den Primärantikörpern und ein abschliessender Waschschrtritt mit PBS. Für die Detektion wurde das *Odyssey Imaging System*-Fluoreszenzdetektionssystem verwendet.

4.2.5. Zellkultur

4.2.5.1. Allgemeine Techniken

Alle zur Zellkultur verwendeten Medien und Lösungen wurden routinemässig auf Sterilität (sterile Werkbank HERAsafe KS, Heraeus, Langenselbold) überprüft und auf Mykoplasmenfreiheit untersucht. Vor dem Ansäen wurde die Zellzahl und die Lebensfähigkeit der Zellen mit der Methode des Nigrosinausschlusses bestimmt (Kaltenbach et al., 1958). Alle Zellkulturen wurden in Zellkulturinkubatoren (Hera Cell 150, Heraeus) mit 5 % CO₂/95 % Luft und 100 % Luftfeuchtigkeit kultiviert. Für immunzytochemische Anfärbungen wurden Zellen auf sterile Deckgläschen (Durchmesser 12 mm) in 24-well Plastikzellkulturschalen (Nunc GmbH und Co, Wiesbaden) angesät.

4.2.5.2. Astrogliareiche Primärkulturen

Astrogliareiche Primärkulturen wurden aus den Gehirnen neugeborener Mäuse verschiedener transgener Mauslinien angelegt und kultiviert wie für Ratten beschrieben (Hamprecht und Löffler, 1985). Diese Kulturen enthalten neben 90 % GFAP-positiven Astrogliazellen zusätzlich noch zusammen 10 % Oligodendrogliazellen, Mikrogliazellen und Ependymzellen (Yang et al., 1996). Es wurden ca. 300 000 lebende Zellen pro *well* einer 24-*well*-Zellkulturplatte in 500 µl Kulturmedium (90 % DMEM (25 mM Glukose), 10 % FKS/20 U/ml Penicillin G/20 µg/ml Streptomycinsulfat), Kulturmedium angesät. Das Zellkulturmedium wurde alle sieben Tage erneuert. Für immunzytochemische Anfärbungen wurden Kulturen in einem Kulturalter von 8 bis 28 Tagen eingesetzt.

4.2.5.3. Induktion der Cre-vermittelten Rekombination in astrogliareichen Primärkulturen

Astrogliareiche Primärkulturen aus doppeltransgenen Mäusen (TgN(hGFAP-CreERT2)-GCTF x R26-EYFP) wurden an Tag 26 für 48 h mit 1 µM 4-Hydroxytamoxifen (Sigma-Aldrich) in Ethanol p. A. oder der entsprechenden Menge Ethanol p. A. als Kontrollinkubation inkubiert. Die Zellen wurden danach immunzytochemisch gefärbt wie in 4.2.3.8. beschrieben.

4.2.5.4. Herstellung gemischter neuraler Primärkulturen

Gemischte primäre Zellkulturen aus Mausgehirn wurden nach Lubetzki hergestellt (Lubetzki et al., 1993). Diese Kulturen enthalten neben Gliazellen auch Neuronen. Dazu wurde eine schwangere Maus am Embryonaltag 15-16 durch zervikale Dyslokation getötet und die Embryonen freigelegt. Die Vorderhirne der Mausembryonen wurden in 37°C temperiertem HBSS präpariert und von den Hirnhäuten befreit. Die Hirne wurden mit 0,5 % Trypsin-EDTA für 10 min bei 37°C inkubiert, zweimal mit HBSS gewaschen und in 10 ml Sato-Medium überführt. Die Zellen wurden durch Auf- und Abziehen zunächst mit einer 10 ml Glaspipette und danach mit ausgezogenen Glaspasteurpipetten dissoziiert, bis eine homogene Zellsuspension entstanden ist. Es wurden 300.000 Zellen auf mit Poly-L-Lysin beschichteten Deckgläsern (12 mm Durchmesser) in 24-*well*-Zellkulturplatten (Nunc GmbH und Co, Wiesbaden) ausgesät. Die Zellen wurden nach 3 - 4 Tagen verwendet.

Zur Kultur von gemischten neuralen Primärkulturen müssen Deckgläser und Zellkulturschalen mit Poly-L-Lysin beschichtet werden. Dazu wurden die Deckgläser über Nacht in 65 % HNO₃ auf einem Schüttler inkubiert, dreimal mit autoklaviertem H₂O gewaschen und für 5 min mit Methanol inkubiert. Nach weiterem dreimaligen Waschen mit H₂O wurden die Deckgläser in der Sterilbank in Zellkulturschalen einzeln getrocknet und für 6 h bei 180°C inkubiert. Die Deckgläser und die verwendeten Zellkulturschalen über Nacht im Zellkulturinkubator mit 0,01 % Poly-L-Lysin inkubiert, zweimal mit autoklaviertem PBS gewaschen und dann mit Sato-Medium bis zur Ansaat der Zellen im Zellinkubator gelagert.

4.2.5.5. Zelllinien

Es wurden die Zelllinien CHO (Ovarien-Zelllinie des chinesischen Hamsters, *chinese hamster ovarian*); COS 7 (Zelllinie aus Nierengewebe der afrikanischen grünen Meerkatze) und HEK293 (humane Zelllinie aus embryonalem Nierengewebe, *human embryonic kidney*) verwendet. Die Zelllinien wurden in den folgenden Zellkulturmedien kultiviert: CHO: *Nutrient mixture* F12 Ham/10% FKS, HEK293: DMEM (25 mM Glukose)/5% FKS, COS: DMEM (25 mM Glukose)/10% FKS.

4.2.5.6. Kryokonservierung und Auftauen von Zelllinien

Ein Aliquot der bei -80°C kryokonservierten Zellen wurde schnell auf 37°C erwärmt. Die Zellen wurden in 10 ml Zellkulturmedium aufgenommen und bei 800 min⁻¹ für 5 min bei 4°C zentrifugiert, um die Zellen zu waschen. Im Anschluss wurde das Zellsediment in 25 ml des jeweiligen Zellkulturmediums resuspendiert und in einem 25 ml Zellkulturkolben ausgesät. Zur Kryokonservierung wurden die zu konservierenden Zellen in einen 25 ml Zellkulturkolben bis zur Konfluenz wachsen gelassen. Nach Absaugen des Zellkulturmediums wurden die Zellen mit 4 ml Trypsin/EDTA bei 37°C im Zellkulturinkubator inkubiert. Nach 5 min bei 37°C wurde die Reaktion mit 6 ml des jeweiligen Zellkulturmediums abgestoppt und die Zellsuspension mit 800 min⁻¹ für 5 min bei 4°C zentrifugiert. Das Zellsediment wurde in 10 ml 95 % FKS/5 % DMSO resuspendiert, aliquotiert und über einen Zeitraum von mind. 24 h auf -80°C abgekühlt. Die längerfristige Lagerung erfolgte in flüssigem Stickstoff.

4.2.5.7. Passagieren der Zelllinien

Nach dem Aussäen der Zellen wurden die Zellen kultiviert, bis sich ein konfluenter Zellrasen gebildet hatte. Zum Passagieren wurde das Medium vollständig abgesaugt und die Zellen mit 4 ml Trypsin/EDTA (0,5 g Trypsin, 0,7 mM EDTA in PBS, Gibco-Invitrogen, Karlsruhe) bei 37°C im Zellkulturinkubator inkubiert. Nach 5 min bei 37°C wurde die Reaktion mit 6 ml des jeweiligen Zellkulturmediums abgestoppt und die Zellsuspension mit 800 min^{-1} für 5 min bei 4°C zentrifugiert. Das Zellsediment wurde in Zellkulturmedium aufgenommen und 1:20 verdünnt ausgesät. Nach ca. 4-7 d, abhängig von der Zelllinie, mussten die Zellen erneut passagiert werden.

4.2.5.8. Transfektion eukaryontischer Zellen mit Lipofectamin

Bei dieser Methode wird die DNA in Liposomen verpackt und über Endozytose in die Zelle geschleust. Es wurde nach Angaben des Herstellers (Gibco-Invitrogen) gearbeitet. Die Zellen wurden in 24-*well*-Zellkulturschalen mit Deckgläschen ausgesät und die Transfektion wurde durchgeführt, nachdem sich ein halbkonfluenter Rasen gebildet hat. Es wurde 1 µg DNA in 50 µl Opti-MEM I Zellkulturmedium (Gibco-Invitrogen, ohne Serum) verdünnt. Danach werden 2 µl Lipofectamin in 50 µl Opti-MEM I gelöst und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss wurden die beiden Lösungen vereint. Nach gutem Schütteln wurde die Lösung für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert, damit sich die DNA-Lipofectamin-Komplexe formen können. Diese Komplexe sind für 6 h bei Raumtemperatur stabil. Es wurden 100 µl der DNA-Lipofectaminlösung zu jedem *well* mit Zellen und Medium gegeben. Die Platten wurden dann 24 h bei 37°C im Inkubator (unter 5% CO₂-Begasung) kultiviert. Nach dieser Zeit sollte die Proteinexpression erfolgt sein.

4.2.5.9. Fixierung von Zellen in Kultur

Die Zellen sowohl von primären Zellkulturen als auch von Zelllinien wurden einmal mit PBS bei Raumtemperatur gewaschen. Im Anschluss werden die Zellen in 4 % PFA in PB für 10 min fixiert. Die Deckgläschen wurden zweimal mit PBS gewaschen und evtl. immunzytochemisch gefärbt, bevor sie auf einen Objektträger mit der bewachsenen Seite nach unten mit Immu-Mount eingedeckt wurden.

4.2.6. Herstellung lebender Hirnschnitte für 2-Photonen-Laserscan-Mikroskopie und Elektrophysiologie

Die Mäuse wurden mit Diethylether betäubt und dann durch zervikale Dyslokation getötet. Das Gehirn wurde schnell herauspräpariert und sofort in mit Karbogen (95 % Sauerstoff; 5 % Kohlendioxid) begaste, eiskalte Präparierlösung (87 mM NaCl; 25 mM NaHCO₃; 2,5 mM KCl; 1,25 mM NaH₂PO₄; 7 mM MgCl₂; 0,5 mM CaCl₂; 25 mM Glukose; 75 mM Saccharose, gepuffert auf pH 7,4 mit Karbogen) überführt und Vibratomschnitte (Mikrotom VT1000S, Leica, Wetzlar) der gewünschten Bereiche in einer Stärke von 200 µm angefertigt. Zur Lagerung wurden die einzelnen Schnitte vorsichtig mit einem Pinsel in ein Vorratsgefäß mit Nylonnetzboden mit auf 35°C erwärmter, karbogenbegaster Präparierlösung überführt, danach auf Raumtemperatur abgekühlt. Die Schnitte wurden dann in karbogenbegaste Ringer-Lösung (125 mM NaCl; 25 mM NaHCO₃; 2,5 mM KCl; 1,25 mM NaH₂PO₄; 1 mM MgCl₂; 0,2 mM CaCl₂; 2,5 mM Glukose) überführt und konnten so bis zu 6 h am Leben erhalten werden. Die Schnitte wurden für elektrophysiologische Untersuchungen (4.2.7.) oder für 2-Photonen-LSM (Zeiss LSM 510NLO, Axioskop FS2M MIRA Titan/Saphir-Infrarotlaser mit 10 Watt VERDI Festphasenlaser als Pumplaser, Coherent, Dieburg) verwendet.

4.2.7. Elektrophysiologische Analyse

Es wurden TgN(PLP-DsRed1)-, TgN(hGFAP-mRFP1)-, TgN(hGFAP-AmCyan1)- und TgN(Thy1.2-HcRed1)-Mäuse im Alter von 5-25 Tagen untersucht. Alle Experimente wurden im *Whole-Cell*-Modus durchgeführt. Es wurden Neurone, Astrozyten und Oligodendrozyten in akut isolierten Hirnschnitten (siehe 4.2.6.) untersucht. Die Zellen wurden auf ihr Ruhepotential geklemmt (Neurone = -60 mV; Astrozyten = -70 mV; Oligodendrozyten = -80 mV) und die einzelnen Messungen durchgeführt. Durch Verwendung einer Elektrodenlösung (125 mM Kaliumglukonat; 1 mM CaCl₂; 10 mM Ethylenglykoltetraacetat (EGTA); 2 mM MgCl₂; 4 mM Na₂ATP, 10 mM N-[2-Hydroxyethyl]-piperazinyl-N'-[2-ethansulfonsäure] (HEPES) mit KOH auf pH 7,2 eingestellt) mit *Lucifer Yellow* (1-3 mM, Molecular Probes, Karlsruhe) konnten die elektrophysiologisch untersuchten Zellen mit dem Farbstoff befüllt werden. Dies wurde mit Hilfe einer Videokamera (CCD-Kamera VX-45, Optronis, Kehl) überprüft. Nach Beendigung der Messung wurden die Schnitte für 30 min in 4% PFA in PB fixiert und nach zwei Waschschrinen mit PBS mit Immu-Mount eingedeckt.

Die Kapillaren wurden aus Borosilikatglas (Hilgenberg) mit einem horizontalem Elektrodenziehgerät (Quarzglaspuller mit Laserstrahlheizung, Modell P-2000, Sutter Instrument Co., Novato, CA, USA) gezogen. Für die Ganzzelleableitungen wurden Pipetten mit einem Aussendurchmesser von 1,5 mm und einer Wanddicke von 0,315 mm benutzt. Die erreichten Pipettenwiderstände lagen zwischen 6 und 9 M Ω . Für die Messungen wurde eine Messapparatur bestehend aus aufrechtem Mikroskop (Axioskop 2 FS MOT, Zeiss, Oberkochen), Mikromanipulatoren (Luigs & Neumann, Ratingen) mit *Patch-Clamp*-Verstärker (EPC9, Heka, Lambrecht/Pfalz) und Videokamera (CCD-Kamera VX-45) benutzt. Die Schnittpräparate wurden in einer Messkammer mit 40x-Wasserimmersionsobjektiv beobachtet. Um die Schnitte in der Messkammer zu fixieren, wurde ein mit Nylonfäden bespannter U-förmig-gebogener Platindraht verwendet. Die Messkammer selbst wurde mit Hilfe einer Absaugpumpe (Vacusafe Comfort, Integra Biosciences, Fernwald) ständig mit karbogenbegaster Ringerlösung durchspült. Die Aufnahme und Auswertung der Daten erfolgte mit dem Programm Patchmaster 9.0 (Heka) sowie Igor Pro Version 4.0 (WaveMetrics Inc., Portland, OR, USA). Es wurden Mittelwert und Standardabweichungen der Membranpotentiale V_{mem} bestimmt. Die elektrophysiologischen Messungen wurden von Dipl-Biochem. Anja Scheller durchgeführt.

4.2.8. Immunelektronenmikroskopische Analyse

Astrogliareiche Primärkulturen von neugeborenen TgN(hGFAP-ECFP) wurden hergestellt wie in 4.2.5.2. beschrieben. Die Zellen wurden in 4 % Paraformaldehyd, 2 % Glutaraldehyd in PB, pH 7,4 für 10 min fixiert. Nach drei Waschschritten mit PBS wurden die Zellen in PB, 1 % Gelatine pH 7,4 von der Zellkulturplatte abgeschabt, kurz abzentrifugiert und in 10 % Gelatine in PB, pH 7,4 resuspendiert. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt wurden die Präzipitate auf Eis abgekühlt, aus den Reaktionsgefäßen genommen und in kleine Blöcke geschnitten. Diese Blöcke wurden in 2,3 M Saccharose in in PB absinken lassen und für die Ultramikrotomie auf Aluminiumträger aufgesetzt und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Ultradünnschnitte wurden in einer 1 : 1-Mischung aus 2 % Methylzellulose in H₂O und 2,3 M Saccharose in PB hergestellt (Liou et al., 1996). Für die Immunfärbung wurden die Schnitte mit Primärantikörpern gegen GFP (1 : 100, Kaninchen polyklonal, Abcam, Cambridge, UK) und mit ProteinA-Gold-Konjugaten (10 nm, Cell Microscopy Center, Department of Cell Biology, University Medical Center

Utrecht, Niederlande) inkubiert. Die Präparate wurden mit einem LEO EM912 Omega (Zeiss, Oberkochen) analysiert und digitale Bilder wurden mit Hilfe einer on-axis 2048 x 2048-CCD Kamera (Proscan, Scheuring) aufgenommen. Die immunelektronenmikroskopische Analyse wurde von Dr. Wiebke Moebius durchgeführt.