

Generierung und Charakterisierung  
neuer transgener Mausmodelle  
zur Untersuchung der  
Neuron-Glia-Interaktion

**Dissertation**

zur Erlangung des akademischen Grades  
Doctor rerum naturalium  
(Dr. rer. nat.)

vorgelegt von  
Petra G. Hirrlinger  
aus Schwerte

eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie  
der Freien Universität Berlin  
im März 2006

Die vorliegende Arbeit habe ich selbständig von Januar 2003 bis März 2006 in der Arbeitsgruppe Gliaphysiologie, Abteilung Neurogenetik, im Max-Planck-Institut für Experimentelle Medizin in Göttingen durchgeführt, wobei nur die angegebenen Hilfsmittel verwendet wurden.

1. Gutachter:

Prof. Dr. Gerd Multhaup  
Freie Universität Berlin  
Institut für Chemie und Biochemie  
Thielallee 63  
14195 Berlin

2. Gutachter:

PD Dr. Frank Kirchhoff  
Max-Planck-Institut für Experimentelle Medizin  
Abteilung Neurogenetik  
Hermann-Rein-Str. 3  
37075 Göttingen

Tag der Disputation: 08.05.2006

FÜR JOHANNES

# 1. Inhaltsverzeichnis

<b>1.</b>	<b>Inhaltsverzeichnis</b>	<b>4</b>
1.1.	Abkürzungsverzeichnis	6
<b>2.</b>	<b>Einleitung</b>	<b>8</b>
2.1.	Kommunikation zwischen Neuronen und Gliazellen	8
2.2.	Bergmann-Gliazellen des Cerebellums und deren Interaktion mit Neuronen	12
2.3.	Die Maus als genetisch einfach manipulierbarer Modellorganismus	15
2.4.	Fluoreszente Proteine als zelltypspezifische Marker im ZNS	17
2.5.	Die Cre-Rekombinase und deren induzierbare Variante CreERT2	21
<b>3.</b>	<b>Zielsetzung</b>	<b>28</b>
<b>4.</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>29</b>
4.1.	Material	29
4.1.1.	Chemikalien	29
4.1.2.	Gebrauchswaren	29
4.1.3.	Gebrauchsfertige Reaktionssysteme	29
4.1.4.	Sterilisation	29
4.1.5.	Enzyme	30
4.1.6.	Verwendete Mauslinien	30
4.1.7.	Verwendete Bakterienstämme und Zelllinien	32
4.1.8.	Plasmide	32
4.1.9.	Synthetische Oligonukleotide	32
4.1.10.	Antikörper	36
4.1.11.	Datenbanken/Software	36
4.1.12.	Puffer, Medien und Lösungen	36
4.2.	Methoden	38
4.2.1.	Molekularbiologische Methoden	38
4.2.2.	Manipulation und Zucht von Mäusen	45
4.2.3.	Histologische und immunhistochemische Methoden	47
4.2.4.	Western Blot-Analyse	50
4.2.5.	Zellkultur	53
4.2.6.	Herstellung lebender Hirnschnitte für 2-Photonen-Laserscan-Mikroskopie und Elektrophysiologie	57
4.2.7.	Elektrophysiologische Analyse	57
4.2.8.	Immunelektronenmikroskopische Analyse	58
<b>5.</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>60</b>
5.1.	Generierung und Analyse von transgenen Mauslinien mit fluoreszenter Proteinexpression in neuronalen Zellen	60
5.1.1.	Voruntersuchungen zur Generierung transgener Mauslinien mit fluoreszenter Proteinexpression in neuronalen Zellen	60
5.1.2.	Klonierung und Pronukleusinjektion von DNA-Konstrukten zur Generierung transgener Mauslinien	61
5.1.3.	Charakterisierung transgener Mauslinien mit fluoreszenter Proteinexpression in neuronalen Zellen	67

5.1.4.	Vergleich von neu generierten, astrozytenspezifisch RCFP-exprimierenden Mauslinien mit weiteren transgenen RCFP-exprimierenden Mauslinien in neuronalen Zellen	79
5.1.5.	Elektrophysiologische Untersuchung von transgenen Mäusen mit RCFP-Expression	86
5.2.	<b>Generierung und Analyse einer transgenen Mauslinie mit astroglialer induzierbarer Cre-Rekombinaseaktivität</b>	<b>89</b>
5.2.1.	Klonierung von pUniversal, einem universell verwendbaren Transgenvektor	89
5.2.2.	Klonierung des hGFAP-CreERT2-Transgenvektors	91
5.2.3.	Pronukleusinjektionen und Etablierung transgener Mauslinien mit Expression von CreERT2 in Astrozyten	92
5.2.4.	Charakterisierung der Mauslinie TgN(hGFAP-CreERT2)-GCTF	92
5.3.	<b>Anwendungen der im Rahmen dieser Arbeit generierten transgenen Mauslinien</b>	<b>105</b>
5.3.1.	Transgene Mauslinien mit Expression von FPs in neuronalen Zellen zur Analyse von Zell-Zell-Interaktionen	105
5.3.2.	Anwendungsmöglichkeiten der TgN(hGFAP-CreERT2)-Mauslinie	108
<b>6.</b>	<b>Diskussion</b>	<b>113</b>
6.1.	<b>Transgene Mauslinien mit zytosolischer Expression fluoreszenter Proteine</b>	<b>113</b>
6.1.1.	Das Expressionsmuster von FPs in neuronalen Zellen variiert	114
6.1.2.	RCFPs bilden Aggregate bei transgener Expression in neuronalen Zellen	117
6.2.	<b>Transgene Mauslinien mit CreERT2-Expression in Astrozyten</b>	<b>121</b>
6.2.1.	Die Problematik von Reporterlinien	124
6.2.2.	Vergleich des CreERT2-Systems mit anderen induzierbaren Systemen	127
<b>7.</b>	<b>Zusammenfassung / Summary</b>	<b>130</b>
<b>8.</b>	<b>Anhang</b>	<b>133</b>
8.1.	Lebenslauf	133
8.2.	Publikationsliste	134
8.3.	Danksagung	135
8.4.	Referenzen	136

## 1.1. Abkürzungsverzeichnis

AMPA	$\alpha$ -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolpropionat
AP	alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosintriphosphat
BAC	künstliches Bakterienchromosom ( <i>bacterial artificial chromosome</i> )
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin ( <i>bovine serum albumine</i> )
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CHO	Zelllinie aus Ovarien des chinesischen Hamsters
CLSM	konfokale Laserscan-Mikroskopie
CMV	humanes Zytomegalievirus
d	Tag(e)
DAPI	Diaminophenylindol
DMSO	Dimethylsulfoxid
DMEM	Dulbecco's Modifiziertes Eagle Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
CNPase	2'-3'-zyklische Nukleotidphosphodiesterase
DTT	Dithiotreitol
dNTP	Desoxyribonukleosid-Triphosphat
ECFP	zyanfarbenes fluoreszentes Protein ( <i>enhanced cyan fluorescent protein</i> )
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGFP	grünes fluoreszentes Protein ( <i>enhanced green fluorescent protein</i> )
Ella	Elongationsfaktor II $\alpha$
EYFP	gelb fluoreszentes Protein ( <i>enhanced yellow fluorescent protein</i> )
ER	Estrogenrezeptor
FKS	fetales Kälberserum
FP	fluoreszentes Protein
GABA	$\gamma$ -Aminobuttersäure
GFAP	saures Gliafaserprotein ( <i>glial fibrillary acidic protein</i> )
GFP	grün fluoreszentes Protein
GLAST	L-Glutamat-L-Aspartat-Transporter
GLT 1	glialer Glutamattransporter
HEK293	Zelllinie 293 aus humaner embryonaler Niere
HEPES	(N-[2-Hydroxyethyl]piperazinyl-N'-[2-ethansulfonsäure])
HRP	Meerrettich-Peroxidase ( <i>horse radish peroxidase</i> )
HSP90	Hitzeschockprotein, 90 kD
IPTG	Isopropyl-thiogalaktosid
kb	Kilobasenpaare
kD	Kilodalton
LacZ	$\beta$ -Galaktosidase-Gen in <i>ESCHERICHIA COLI</i>
LBD	Ligandenbindungsdomäne
LDS	Lithiumdodezylsulfat
LoxP	Locus of crossover aus dem Bakteriophagen P
M	Molar = mol/l
MAG	Myelinassoziertes Glykoprotein
MCS	Mehrfachklonierstelle ( <i>multiple cloning site</i> )
mGluR	metabotroper Glutamatrezeptor

mRFP1	monomeres rotfluoreszentes Protein 1
n	Anzahl
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
NeuN	Antigen in neuronalen Nuklei
OD	optische Dichte
OHT	4-Hydroxytamoxifen
ORF	Offenes Leseraster ( <i>open reading frame</i> )
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung ( <i>phosphate-buffered saline</i> )
PB	Natriumphosphatpuffer (100 mM)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion ( <i>polymerase chain reaction</i> )
PGK	Phosphoglyzeratkinase
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
PLP	Proteolipid-Protein
RCFP	Fluoreszentes Protein aus Riffkorallen ( <i>reef coral fluorescent protein</i> )
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RT	Reverse Transkriptase
RXR	Retinsäurerezeptor X ( <i>retinoic X receptor</i> )
SDS	Natriumdodezylsulfat
TAE	Tris/Acetat/EDTA-Puffer
Taq	THERMOPHILUS AQUATICUS
Tg/tg	Transgen
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-Aminoethansulfonsäure
U	Einheit der Enzymaktivität ( <i>unit</i> )
ü.N.	über Nacht
UV	ultraviolettes Licht
VpEcR	VP16-Transaktivierungsdomäne
WT	Wildtyp
X-Gal	5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl- $\beta$ -D-Galaktosid
ZS	Ziegenserum
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 Kennzeichnung als solche bezeichnet.