

5. Ergebnisse

5.1. Generierung und Analyse von transgenen Mauslinien mit fluoreszenter Proteinexpression in neuronalen Zellen

Die gute Trennbarkeit der Spektren von ECFP oder AmCyan1 und EYFP lassen diese FPs hervorragend geeignet erscheinen, um doppeltransgene Tiere mit FP-Expression in Astrozyten und Neuronen zu züchten. Diese Tiere können eingesetzt werden, um morphologische Untersuchungen der Neuron-Glia-Interaktion im lebenden Hirnschnitt (Hirrlinger et al., 2004) wie auch in der lebenden Maus (Nimmerjahn et al., 2005) zu beobachten, da beide FPs auch gut durch 2-Photonen-Laser (Titan/Saphir-Laser) anregbar sind. Zur Generierung von transgenen Mauslinien mit zytosolischer Expression von fluoreszenten Proteinen in neuronalen Zellen wurden daher AmCyan1 (ANEMONIA MAJANO; Ex. 458 nm; Em. 489 nm) und ECFP (AEQUOREA VICTORIA; Ex. 453 nm; Em. 457 nm), aber auch AsRed2 (ANEMONIA SULCATA; Ex. 576 nm; Em. 592 nm) verwendet; letztere, um Mäuse mit rot-fluoreszenten Astrozyten herzustellen. Zur spezifischen Expression in Astrozyten und Oligodendrozyten wurden umfassend charakterisierte zelltypspezifische Promotoren verwendet: der humane GFAP-Promotor, bzw. der murine PLP-Promotor (Brenner et al., 1994; Fuss et al., 2000; Wight et al., 1993).

5.1.1. Voruntersuchungen zur Generierung transgener Mauslinien mit fluoreszenter Proteinexpression in neuronalen Zellen

Um zu untersuchen, ob die zu verwendenden FPs für die Expression in Astrozyten geeignet sind, wurde die Expression der fluoreszenten Proteine AmCyan1, AsRed2 und ECFP in astrogliareichen Primärkulturen und in Zelllinien getestet. Dazu wurden die Kulturen transient mit vom humanen CMV (Zytomegalievirus)-Promotor getriebenen Transfektionsvektoren transfiziert und die Expression am CLSM untersucht. Der CMV-Promotor ist ein Promotor viralen Ursprungs, der zu einer starken Expression in fast allen Säugerzellen führt. Es zeigte sich in allen verwendeten Zelllinien und in astrogliareichen Primärkulturen für alle FPs eine homogene, zytosolische Expression (Abb. 3). Die Zellen wurden 24 h nach Transfektion fixiert und im CLSM analysiert.

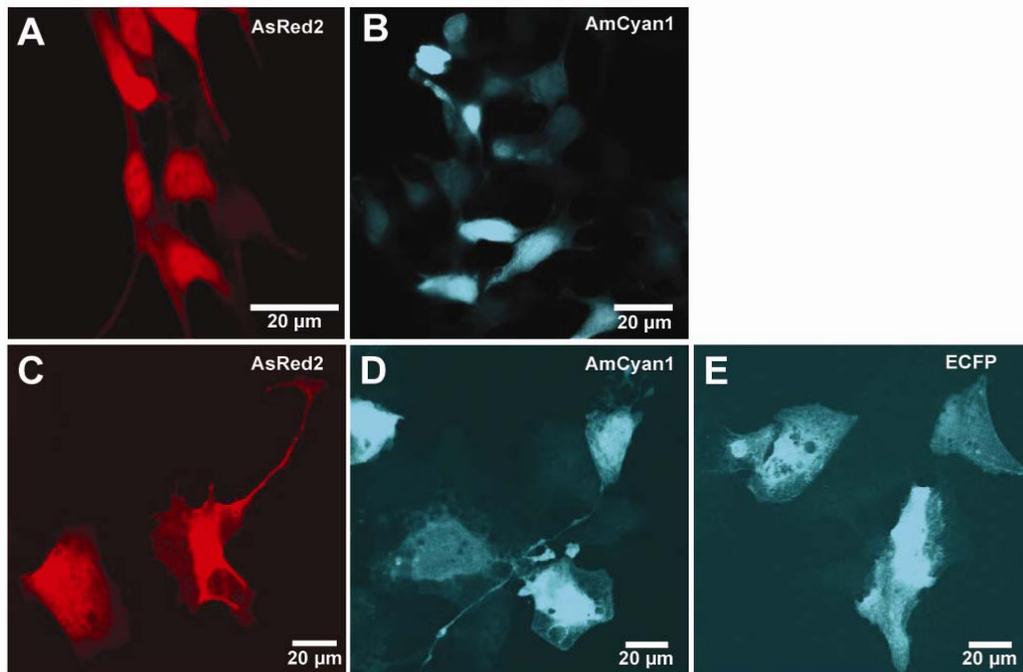


Abb. 3: Konfokale Laserscan-mikroskopische Analyse transient transfizierter HEK293-Zellen (A, B) und astrogliareicher Primärkulturen (C - E). Astrogliareiche Primärkulturen wurden an Tag 14 transfiziert und 24 h nach Transfektion fixiert. Es lässt sich in beiden Zelltypen eine homogene Verteilung der fluoreszenten Proteine sowohl aus der GFP-Familie (E: ECFP) wie auch aus riffbildenden Seeanemonen (A, C: AsRed2, B, D: AmCyan1) im Zytosol der Zellen nachweisen.

5.1.2. Klonierung und Pronukleusinjektion von DNA-Konstrukten zur Generierung transgener Mauslinien

Um eine Expression von Transgenen in Mäusen zu erreichen, wurden die entsprechenden DNA-Konstrukte kloniert. Der verwendete humane GFAP-Promotor ist eingehend analysiert worden (Besnard et al., 1991; Masood et al., 1993) und umfasst 2,3 kb genomische DNA-Sequenz von -2163 bis +47 des humanen GFAP-Gens (*gfa2*), wobei das Startkodon ATG an Position +15 zu TTG mutiert wurde ((Brenner et al., 1994), GenBank *Accession* Nummer M67446). Die Induktion von Reportergenen durch diesen Promotor erfolgt hochselektiv in Astrozyten in verschiedenen Säugetieren (Brenner und Messing, 1996). Zur Expression von fluoreszenten Proteinen in Astrozyten wurde der humane GFAP-Promotor aus pGFAP-EGFP (Nolte et al., 2001) über eine PCR mit den *Primern* 4128 und 4127 amplifiziert. Die *Primer* enthalten eine *Agel*-, bzw. eine *Asel*-Schnittstelle. Das erhaltene 2,3 kb grosse Fragment wurde in pGEM-T (Promega) subkloniert, amplifiziert und mit den *sense Primern*

T7, 4361-2, 4359, 4370, 4358-2 und 4360 sequenziert. Der erhaltene Vektor wurde mit pGEM-T-GFAP bezeichnet.

Die verschiedenen transgenen Mauslinien werden mit Vierbuchstabenkodes bezeichnet. Dabei bezeichnet der erste Buchstabe in der Regel den Promotor (G: humaner GFAP-Promotor; P: muriner PLP-Promotor), die nächsten beiden Buchstaben das Gen (z. B. CY für AmCyan1; CF für ECFP usw.) und der letzte Buchstabe oder bei mehr als 26 Linien eine Zahl die einzelne Linie. Bei potentiellen Stammtieren ist der letzte Buchstabe ein x (z. B. PCFx mit den Linien PCFP und PCFQ). Tiere der einzelnen Linien wurden zur Erhaltungszucht untereinander oder mit Wildtyptieren des entsprechenden Mausstammes verpaart.

5.1.2.1. Klonierung des pHGFAP-AsRed2-N1-Transgenvektors

Um eine Mauslinie herzustellen, die das rot fluoreszente Protein AsRed2 in Astrozyten exprimiert, wurde das kommerziell erhältliche AsRed2 verwendet. AsRed2 wurde aus der Seeanemone ANEMONIA SULCATA als AsFP595 isoliert und durch gerichtete Mutagenese verändert (Lukyanov et al., 2000). Zur zytosolischen Expression von AsRed2 in Astrozyten wurde das 2,3 kb grosse, den hGFAP-Promotor beinhaltende *Asel/Agel*-Fragment aus pGEM-T-GFAP in die korrespondierenden Schnittstellen von pAsRed2-N1 (Clontech) kloniert. Dabei wurde der CMV-Promotor und ein grosser Teil der MCS aus pAsRed2-N1 entfernt. Der Endvektor wurde mit pGFAP-AsRed2-N1 bezeichnet. Nach Überprüfung der Sequenz mit *Primer* 4369 und 4361-2 wurde der Vektor mit dem Restriktionsenzym *DrdI* präparativ verdaut (Abb. 3 A) und das 3,6 kb grosse DNA-Fragment mit dem Transgen (Abb. 3 B) zur Pronukleusinjektion verwendet. Nach zwei Pronukleusinjektionen konnten von insgesamt 29 geborenen Tieren 12 PCR-positive, potentielle Stammtiere nachgewiesen werden. Der Vierbuchstabenkode der Stammlinie ist GREx. Keine der Linien zeigte eine stabile Expression von AsRed2. Mit Stammtier #27, Weibchen, GREL, war nach einem Wurf, der nur nichttransgene Nachkommen enthielt, keine Zucht mehr möglich. Nach Tötung des Stammtieres GREL konnte in diesem eine Expression von AsRed2 nachgewiesen werden. Die Stammtier GREL war das einzige, AsRed2 exprimierende Tier, das gefunden werden konnte. Das weibliche Stammtier züchtete nach einem Wurf, der nur nichttransgene Nachkommen enthielt, nicht mehr. Daher wurde das adulte Stammtier selbst getötet und auf rote Fluoreszenz getestet. Es konnte keine transgene Linie etabliert werden.

5.1.2.2. Klonierung des pHGFAP-AmCyan1-C1-Transgenvektors

Es wurde eine Mauslinie hergestellt, die das zyan fluoreszente Protein AmCyan1 in Astrozyten exprimiert. Das zyanfarbene fluoreszente Protein amFP486 wurde aus der Seeanemone ANEMONIA MAJANO isoliert (Matz et al., 1999) und wird unter dem Handelsnamen AmCyan1 von Clontech vertrieben. Zur zytosolischen Expression von AmCyan1 in Astrozyten wurde das 2,3 kb grosse, den hGFAP-Promotor beinhaltende *Asel/Agel*-Fragment aus pGEM-T-GFAP in die korrespondierenden Schnittstellen von pAmCyan1-C1 (Clontech) kloniert. Dabei wurde der CMV-Promotor aus pAmCyan1-C1 entfernt. Der Endvektor wurde mit pHGFAP-AmCyan1-C1 bezeichnet, amplifiziert und mit Primer 4369 und 4361-2 (Tab. 5) sequenziert. Der Vektor wurde mit dem Restriktionsenzym *DrdI* präparativ verdaut und das 3,6 kb grosse DNA-Fragment mit dem Transgen (Abb. 3 B) aufgereinigt und in Mikroinjektionspuffer auf eine Konzentration von 30 ng/ml eingestellt (Abb. 3 B). Die linearisierte und aufgereinigte DNA wurde bis zur Mikroinjektion bei -20°C gelagert. Nach einer Pronukleusinjektion konnten von 32 geborenen Tieren 13 PCR-positive Stammtiere identifiziert werden. Der Vierbuchstabenkode der Stammlinie ist GCYx. Bei einer Linie (GCYM, Stammtier #30, Weibchen) konnte eine funktionelle Expression von AmCyan1 nachgewiesen werden. Der genetische Hintergrund der Linie ist C57/B6.

5.1.2.3. Klonierung des pHGFAP-ECFP-C1-Transgenvektors

Es wurde eine Mauslinie hergestellt, die das zyan fluoreszente Protein ECFP, eine spektrale GFP-Variante, in Astrozyten exprimiert. ECFP hat eine grössere Fluoreszenzintensität als AvGFP. Es enthält sechs substituierte Aminosäuren, wodurch das Emissionsspektrums von grün nach zyanfarben verschoben wird (Hadjantonakis und Nagy, 2001). ECFP hat gegenüber anderen blauen oder zyanfarbenen GFP-Varianten den Vorteil, dass es weniger schnell ausbleicht. Zur zytosolischen Expression von ECFP in Astrozyten wurde das 2,3 kb grosse, den hGFAP-Promotor beinhaltende *Asel/Agel*-Fragment aus pGEM-T-GFAP in die korrespondierenden Schnittstellen von pECFP-C1 (Clontech) kloniert. Dabei wurde der CMV-Promotor aus pECFP-C1 entfernt. Der Endvektor wurde amplifiziert und weiter behandelt wie in Abschnitt 3.1.2.2. beschrieben. In einer Pronukleusinjektion sind 11 Nachkommen geboren, von denen 5 Tiere PCR-positiv waren. Der Vierbuchstabenkode dieser Stammtiere ist

GCFx. Es konnte eine funktionell exprimierende transgene Linie GCFD (Stammtier Männchen #8) etabliert werden.

5.1.2.4. Klonierung des pmPLP-ECFP-Transgenvektors

Zur Herstellung einer Mauslinie mit blau fluoreszent markierten Oligodendrozyten, wurde ECFP in Oligodendrozyten exprimiert. Proteolipidprotein (PLP) ist ein Gen, dass im Gehirn spezifisch in sich differenzierenden und reifen Oligodendrozyten exprimiert ist. Ein Promotorkonstrukt, dass alle benötigten Informationen für eine Expression räumlich und zeitlich entsprechend der des PLPs enthält, sollte zur Expression des Transgens spezifisch in Oligodendrozyten führen. Es wurde bereits in transgenen Mäusen gezeigt, dass die verwendeten regulatorischen DNA-Elemente ausreichend sind, um eine spezifische Expression in Oligodendrozyten zu gewährleisten (Wight et al., 1993) (Fuss et al., 2000). Der verwendete Transgenvektor pPLP-PD-IaATX (Fuss et al., unpubliziert) basiert auf pBluescript (Stratagene) und enthält ca.12 kb genomische Sequenz des PLP-Locus 3' vor dem offenen Leseraster (ORF) für Proteolipid-Protein (Fuss et al., 2000). Die genomische Sequenz enthält Exon I, Intron I und die Hälfte von Exon II. Die Sequenz um das Startkodon ATG für das PLP-Protein ist in Exon I von GAC ATG zu CTC GAG (CAG AGT GCC AAA CCT **CGA** GGT GAG TTT C) mutiert worden. Diese Mutation erlaubt den Translationsstartpunkt im Startkodon ATG des eingefügten Transgens, wobei die für ein einwandfreies Spleissen notwendigen PLP Exon/Intron-Konsensussequenzen erhalten blieben (Abb. 3 A). Durch diese Mutation wurde zudem eine zusätzliche *Xho*I-Schnittstelle generiert. Ein weiteres Startkodon am Beginn von Exon II und die ersten 13 Aminosäuren von PLP wurde ebenfalls entfernt, stattdessen wurde ein Polylinker mit einzigartigen Restriktionsschnittstellen für *Sfi*I, *Sma*I, *EcoRV*, *Not*I, und *Sac*II inkloniert. Weitere einzigartige Schnittstellen sind *Asc*I und *Pac*I, die über das *Sma*I-*Hind*III-Fragment aus pNEB193 eingefügt wurden. Nach dem ORF des Transgens befindet sich eine Polyadenylierungssequenz. Das Transgenkonstrukt kann durch Restriktionsverdau mit *Apa*I/*Sac*II für die Pronukleusinjektion linearisiert werden (Fuss et al., 2000).

Zur transgenen Expression von ECFP in Oligodendrozyten wurde der ORF von ECFP aus pECFP-N1 mit den *Primern* 4784 und 4785 amplifiziert. Die *Primer* bringen die Schnittstellen für *Asc*I und *Pac*I in das

ca. 750 bp grosse Fragment ein. Das PCR-Produkt wurde in pGEM-T subkloniert, amplifiziert und mit den *Primern* T7 und SP6 sequenziert. Der erhaltene Vektor wurde mit pGEM-T-ECFP bezeichnet. Dieser Vektor wurde dann mit *Ascl* und *Pacl* geschnitten und das ca. 750 bp grosse Fragment in die korrespondierenden Schnittstellen des Vektors pPLP-PD-*laATX* (Fuss et al., unpubliziert) *Ascl/Pacl* kloniert. Dabei wurde der ursprüngliche ORF der Phosphodiesterase- α /Autaxin aus pPLP-PD-*laATX* entfernt. Der Endvektor wurde pPLP-ECFP bezeichnet, amplifiziert und mit Primer 4784 und 4785 sequenziert. Nach Überprüfung der Sequenz wurde der Vektor mit den Restriktionsenzymen *ApaI* und *SacII* präparativ verdaut, die 13,2 kb grosse Bande aufgereinigt und weiterhin behandelt wie in Abschnitt 5.2.1.2. beschrieben. Nach drei Pronukleusinjektion sind 125 Nachkommen geboren, von denen 21 Tiere PCR-positiv waren. Der Vierbuchstabenkode dieser Stammtiere ist PCFx. Bei drei Stammtieren konnte eine Expression von ECFP nachgewiesen werden. Die Expression von ECFP bei der Linie PCFB (Stammtier #6, Weibchen) war allerdings nicht zytosolisch, sondern ubiquitär im Gewebe verteilt. Die Linie wurde nicht weitergezüchtet. Es konnten zwei funktionell exprimierende transgene Linien PCFP (Stammtier #45, Weibchen) und PCFQ (Stammtier #26, Männchen) etabliert werden. PCFP ist eine Linie im FVB/N-Hintergrund und PCFQ im C57/B6-Hintergrund. Die Linien PCFP und PCFQ wurden eingehender charakterisiert.

Die DNAs (Abb. 4) wurden von Simone Schmidt (Tierhaus, Max-Planck-Institut für Experimentelle Medizin, Göttingen) in befruchtete Oozyten der Mausstämme C57Bl/6J und FVB/N injiziert. In Pronukleusinjektionen wurden jeweils unabhängige transgene Mauslinien generiert, die im Rahmen dieser Arbeit auf Funktionalität hin untersucht wurden. Die Nachkommen wurden durch eine PCR auf die Integration des Transgens getestet. Die potentiellen Stammtiere wurden mit Wildtypmäusen verpaart und die Nachkommen in einem Alter von bis zu drei Wochen auf Expression von fluoreszenten Proteinen getestet. In Tab. 7 ist dargestellt, wie viele Pronukleusinjektionen durchgeführt wurde, wieviele PCR-positive, potentielle Stammtiere daraus hervorgegangen sind und wieviele exprimierende transgene Linien pro DNA-Konstrukt etabliert werden konnten. Die Nachkommen aller Stammtiere, bis auf das Stammtier der Linie GREL, waren fertil und vererbten das Transgen in der Regel in der zu erwartenden Mendel-Verteilung. Einige Zuchtpaare hatten in jeweils drei aufeinanderfolgenden untersuchten Würfen keine PCR-positiven

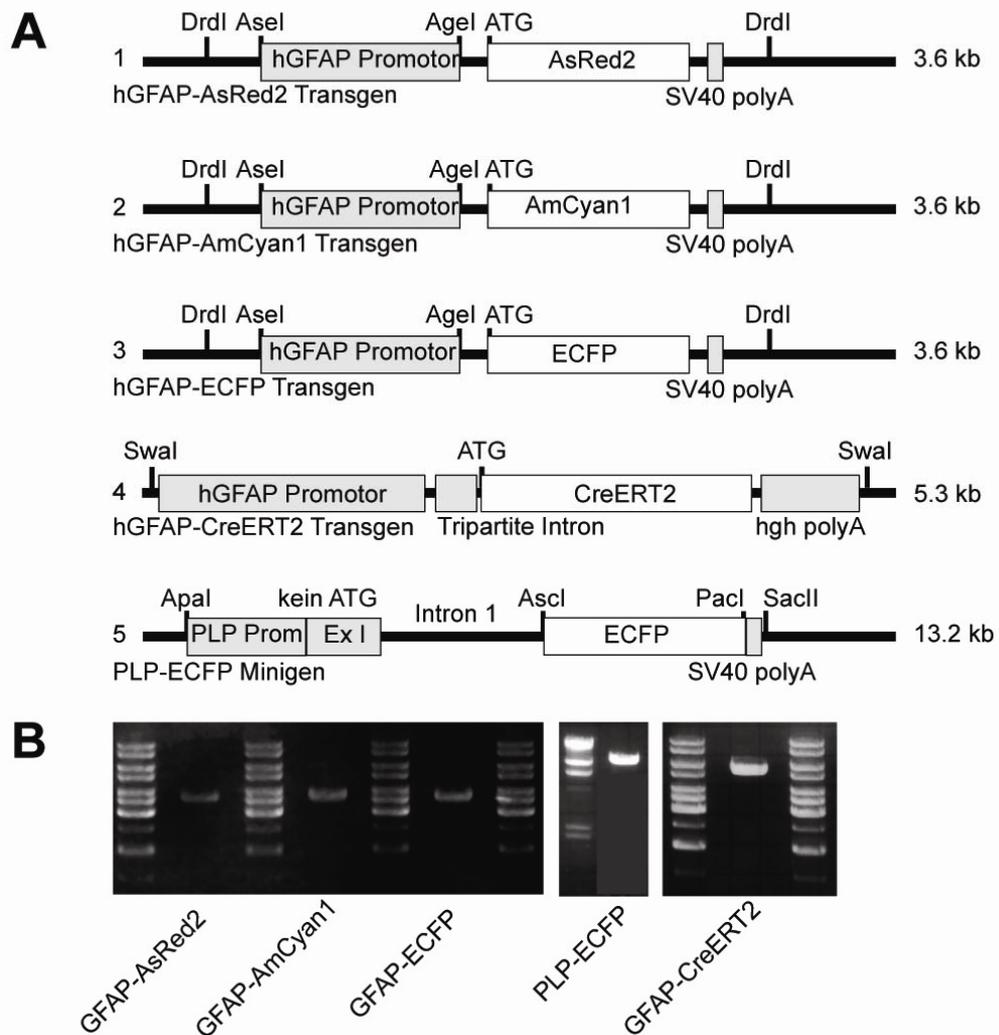


Abb. 4: DNA-Konstrukte zur Generierung transgener Mäuslinien. A: DNA-Konstrukte für die Pronukleusinjektion wurden durch Platzierung der Gene für fluoreszente Proteine (AsRed2, AmCyan1, ECFP) oder für CreERT2 hinter dem hGFAP-Promotor, bzw. in das PLP-Minigen. Nach Linearisierung und Aufreinigung wurde die Qualität der Konstrukte mit Hilfe einer Agarosegelelektrophorese überprüft (B).

Nachkommen. Es könnte sich bei diesen Mäusen um Mosaiktiere gehandelt haben. Bei diesen erfolgte der Einbau der DNA nicht in allen Körperzellen. So konnte die Transgen-DNA zwar in der Schwanzspitzen-Biopsie nachgewiesen werden, obwohl sie nicht in die Zellen der Keimbahn eingebaut war.

Da Männchen das Transgen nicht an alle Weibchen der Tochtergeneration weitergaben, erfolgte die Integration der Transgenkonstrukte in allen Linien auf Autosomen und nicht auf dem X-Chromosom. Heterozygote Mäuse zeigten keine phänotypischen Verhaltens-

auffälligkeiten. In Tab. 8 sind die Daten zur Pronukleusinjektion übersichtlich dargestellt.

Tab. 8: Übersicht über die mikroinjizierten DNA-Konstrukte und die daraus hervorgegangenen potentiellen und tatsächlichen Stamtiere.

DNA-Konstrukt	Grösse (kb)	Geborene Tiere	PCR-positiv	Linien
hGFAP-ECFP-C1	3,6	11	5 / 45,5 %	1 / 20 %
hGFAP-AmCyan1-C1	3,6	32	13 / 40,6 %	1 / 7,7 %
hGFAP-AsRed2-N1	3,6	65	24 / 36,9 %	(1) / 4,2 %
mPLP-ECFP	13,2	125	21 / 16,8 %	3 / 14,3 %
hGFAP-CreERT2	5,3	133	42 / 31,6 %	2 / 4,8 %

Die Zahl in Klammern bezeichnet ein Stamtier, mit dem keine transgene Linie etabliert werden konnte.

5.1.3. Charakterisierung transgener Mauslinien mit fluoreszenter Proteinexpression in neuronalen Zellen

Über fluoreszenzmikroskopische und immunhistochemische Analyse wurden die generierten fluoreszenten Mauslinien charakterisiert. Dazu wurden 100 µm dicke Vibratomschnitte hergestellt und mit Hilfe des konfokalen Laserscanmikroskops untersucht. Die zelltypspezifische Expression der fluoreszenten Proteine wurde mit Hilfe einer immunhistochemischen Färbung nachgewiesen, wobei Antikörper gegen Markerproteine und teilweise auch Antikörper gegen das fluoreszente Protein verwendet wurden. Alle Linien zeigten eine zelltypspezifische Expression.

5.1.3.1. Analyse der Mauslinien TgN(mPLP-ECFP)

Die Linien TgN(mPLP-ECFP)-PCFP und -PCFQ zeigten eine ECFP-Expression in allen wichtigen Hirnarealen wie Cerebellum, Cortex und Hippocampus. Die Dichte der ECFP-exprimierenden Zellen variierte in den verschiedenen Hirnregionen. In einer einzelnen transgenen Zelle ist das ECFP homogen im Zytosol der gesamten Zelle verteilt. Aufgrund ihrer Lokalisation und ihrer charakteristischen Morphologie konnten die blau fluoreszenten Zellen eindeutig als Oligodendrozyten identifiziert werden. Die Fluoreszenz von ECFP wurde durch die Fixierung verringert und

reichte nicht aus, um fluoreszenzmikroskopisch erkannt zu werden. In beiden Linien PCFP und PCFQ war die Fluoreszenzintensität nach transcardialer Fixierung so schwach (Abb. 5), dass eine Verstärkung des Signals durch eine Immunhistochemie mit Antikörpern gegen ECFP notwendig war. Die Fluoreszenzintensität in der Linie PCFP (Abb. 5 A - D) war noch etwas stärker als bei PCFQ (Abb. 5 E - H). Es konnten sowohl bei der Linie PCFP (Abb. 5 A - D) wie auch bei der Linie PCFQ (Abb. 5 E - H) immunhistochemisch gefärbte Zellen in allen wichtigen Hirnarealen wie Cerebellum, Cortex und Hippocampus nachgewiesen werden. In der Linie PCFP waren jedoch Purkinje-Neuronen im Cerebellum ebenfalls gefärbt. Die Linie PCFP weist also eine ektopische Expression von ECFP in Neuronen auf.

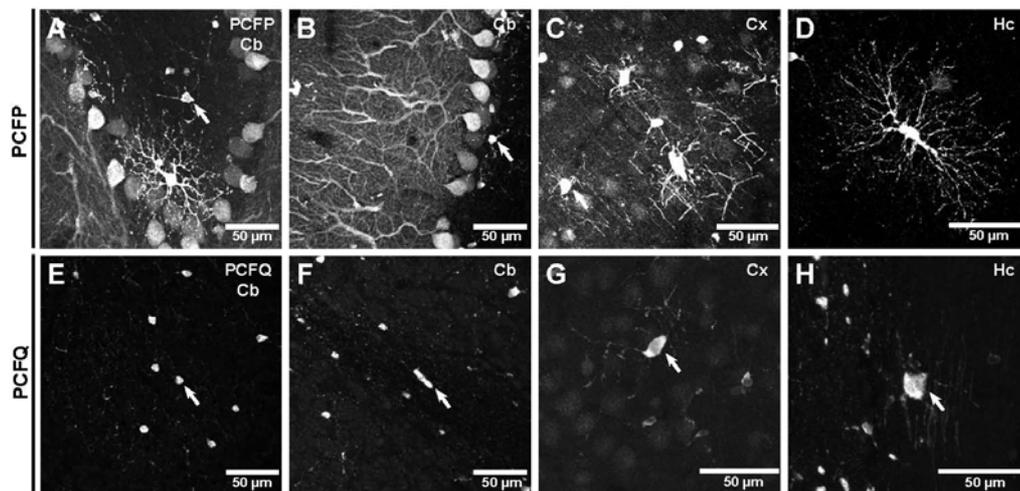


Abb. 5: Immunhistochemische Charakterisierung von ECFP-exprimierenden Zellen der Linie TgN(mPLP-ECFP)-PCFP (A – D) und -PCFQ (E – H). Es wurden 40 µm dicke Vibratomschnitte mit Antikörpern gegen GFP angefärbt und konfokale Bilder aufgenommen. Oligodendrozyten in wichtigen Hirnbereichen wie Cerebellum (Purkinjezellschicht A, E; weisse Substanz, B, F) Cortex (C, G) und Hippocampus (D, H) exprimieren ECFP (A – H, Pfeile). Bei der Linie PCFQ ist der Expressionsgrad wesentlich geringer als bei der Linie PCFP, die Fluoreszenz ist nur im Zellsoma. Bei der Linie PCFP können auch die feinen Fortsätze der Zellen nach Verstärkung durch Immunfluoreszenz visualisiert werden. In dieser Linie sind auch Purkinje-Neurone (A, B, Pfeilspitzen) ektopisch positiv für ECFP, die leicht durch ihre Morphologie, die grossen Zellkörper und die weit verzweigten Dendritenbäume, erkennbar sind.

Eine immunhistochemische Doppelfärbung der Linie PCFP mit Antikörpern gegen ECFP und dem oligodendroglialen Markerprotein 2'-3'-zyklische Nukleotidphosphodiesterase (CNPase) zeigte, dass die Zellen, die nicht als Purkinje-Neuronen (Abb. 6) identifiziert werden konnten, positiv für beide Antikörper waren (Abb. 5). CNPase ist ein myelin-assoziiertes Protein, das innerhalb des Nervensystems spezifisch in Oligodendrozyten und Schwannzellen, also den myelinisierenden Glia-

zellen, exprimiert wird (Lappe-Siefke et al., 2003; Nishizawa et al., 1985; Roussel et al., 1978; Roussel et al., 1983). Bei der Linie PCFQ wurden immunhistochemische Doppelanfärbungen mit Antikörpern gegen ECFP und myelinassoziierem Glykoprotein (MAG) als oligodendroglialem, bzw.

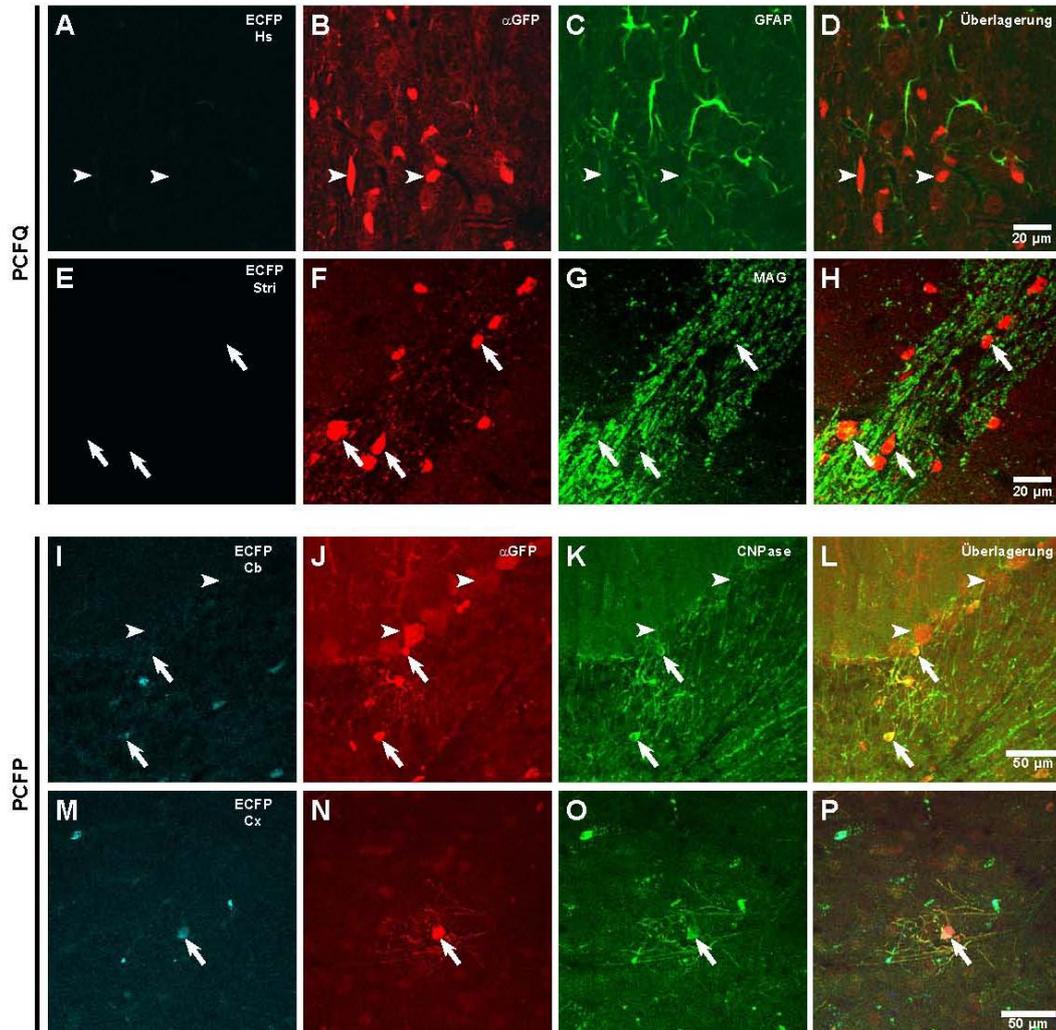


Abb. 6: Analyse der oligodendrozytenspezifischen Expression des Transgens in der Linie TgN(mPLP-ECFP)-PCFP (A – D) und -PCFQ (E – H) durch immunhistochemische Analyse mit Antikörpern gegen Markerproteine und ECFP-exprimierende Oligodendrozyten. Die Fluoreszenzintensität war nach Fixierung sehr schwach. Die ECFP-Fluoreszenz musste in beiden Linien PCFQ (5 Monate alte Maus, A – H) und PCFP (4 Wochen alte Maus, I – P) durch eine Antikörperfärbung verstärkt werden. Bei der Linie PCFQ wurden immunhistochemische Anfärbungen mit Antikörpern gegen GFAP (C, D) und MAG (G, H) durchgeführt. Es konnten keine GFAP-positiven (C, Pfeilspitzen) Astrozyten gefunden werden, die positiv für GFP waren (D, Pfeilspitzen). Blau fluoreszente (E, Pfeile), GFP-positive (F, Pfeile) Zellen in der weissen Substanz des Cerebellums waren positiv für MAG (H, Pfeile). In der Linie PCFP sind CNPase- und GFP-positive Zellen in der weissen Substanz des Cerebellums (L, P, Pfeile) zu erkennen. Auch Purkinje-Neurone, die anhand ihrer charakteristischen Morphologie leicht erkennbar sind, sind positiv für GFP (J, L, Pfeilspitzen), aber nicht für CNPase (K, L, Pfeilspitzen). Hs: Hirnstamm, Stri: Striatum, Cb: Cerebellum, Cx: Cortex

GFAP als astroglialem Marker durchgeführt. MAG ist spezifisch in myelinbildenden Zellen, den Oligodendrozyten des ZNS und den Schwannzellen des PNS, exprimiert (Poltorak et al., 1987). Es wurden doppelmarkierte Zellen gefunden, die positiv für ECFP und MAG waren (Abb. 5), jedoch keine doppelmarkierten Zellen, die positiv für ECFP und GFAP waren (Abb. 5). Die ECFP-positiven Zellen waren also Oligodendrozyten, aber keine Astrozyten.

Um zu überprüfen, ob die schwache ECFP-Fluoreszenz ausschliesslich auf die Fixierung des Gewebes zurückzuführen ist, wurden akute Hirnschnitte von Tieren der Linie PCFQ hergestellt und mit dem 2-Photonen-LSM untersucht. Es konnten blau fluoreszente Zellen im Cerebellum (Abb. 7 A), im Corpus callosum (Abb. 7 B) und auch im Cortex (Abb. 7 C) ohne Verstärkung durch immunhistochemische Fluoreszenzmarkierung detektiert werden.

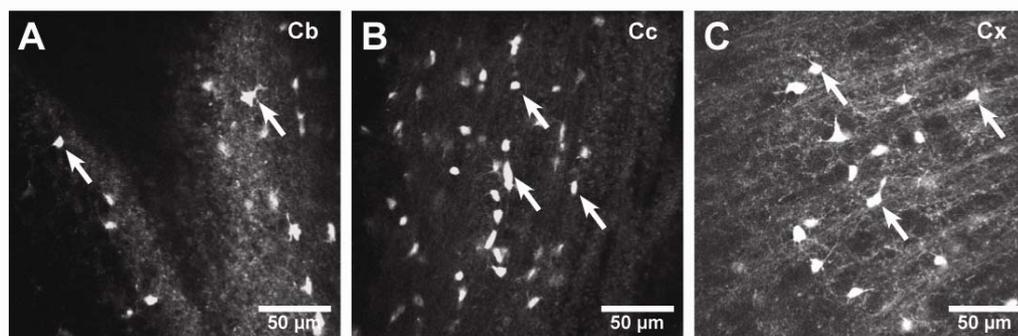


Abb. 7: ECFP-Fluoreszenz in lebendem Gewebe der Linie TgN(mPLP-ECFP)-PCFQ. Es wurden 300 µm dicke Vibratomschnitte von einer acht Wochen alten Maus hergestellt und mit 2-Photonenanregung untersucht. Sowohl in der cerebellaren weissen Substanz (A), wie auch im Corpus callosum (B) und Cortex (C) lassen sich blau fluoreszente Zellen erkennen, die eine oligodendrogliale Morphologie aufweisen (Pfeile).

5.1.3.2. Analyse der Mauslinie TgN(hGFAP-ECFP)

Die Linie TgN(hGFAP-ECFP)-GCFD zeigt eine stabile ECFP-Expression in allen wichtigen Hirnarealen wie Cerebellum, Cortex, Hippocampus, Striatum und Rückenmark. Die Dichte der ECFP-exprimierenden Zellen variierte in den verschiedenen Hirnregionen. In einer einzelnen transgenen Zelle ist das ECFP homogen im Zytosol der gesamten Zelle verteilt. Deutlich zu erkennen sind auch die feinsten Fortsätze der Zellen. Aufgrund ihrer Lokalisation und ihrer charakteristischen Morphologie konnten die zyanfarbenen fluoreszenten Zellen eindeutig als Astrozyten identifiziert werden. Die meisten transgenen Astrozyten befinden sich im

kaudalen Bereich des Gehirns (Abb. 8 A, B). Die stärkste Fluoreszenzintensität lässt sich in der Molekularschicht (Bergmann-Glia) des Cerebellums und im Hirnstamm nachweisen. Hier sind nahezu alle Astrozyten fluoreszent (Abb. 8 A, D). Blau fluoreszente Zellen sind auch in der Körnerschicht und der weissen Substanz detektierbar (Abb. 8, D). Aber auch im Hippocampus ist ein grosser Teil der Astrozyten markiert (Abb. 8, F, H). Im Cortex sind die fluoreszenten Zellen meistens in der Nähe der Blutgefässe (Abb. 8, E). Kapillaren werden vollständig von einzelnen Astrozytenfortsätzen umrundet (Daten nicht gezeigt). Ansonsten sind im Cortex nur vereinzelt blau fluoreszente Astrozyten vorhanden. Diese Zellen haben viele feine und weitverzweigte Fortsätze.

GFAP ist auch in bedeutenden Gruppen der peripheren Gliazellen exprimiert, so zum Beispiel auch in nicht-myelinisierenden Schwannzellen, enterischer Glia und einigen Satellitenzellen (Jessen et al., 1990; Jessen und Mirsky, 1985). Auch in den transgenen Mäusen der Linie GCFD können blau fluoreszente, spindelförmige Zellen in longitudinalen Schnitten von peripheren Nerven wie dem Ischiasnerven gefunden werden (Abb. 8, C).

Ein bemerkenswerter Unterschied in der ECFP-Fluoreszenz war auch in der Retina zu sehen. Es gibt zwei Typen von Gliazellen in der Retina, die retinalen Astrozyten und die Müllerzellen (Newman, 2001; Newman, 2004). Die retinalen Astrozyten sind auf die Ganglienzellschicht beschränkt, sie liegen an der Grenze zum Glaskörper. Diese Zellen exprimieren GFAP (Nolte et al., 2001). In 100 µm dicken, longitudinalen Vibratomschnitten der Retina von Mäusen der Linie GCFD können retinale Astrozyten der Ganglienzellschicht durch ihre blaue Fluoreszenz detektiert werden (Abb. 8 K). Die Müllerzellen, eine spezialisierte, retinale Form der radialen Glia, durchspannen die Retina von der Grenze zum Glaskörper bis zur Photorezeptorschicht. Diese Zellen exprimieren kein ECFP. Auch die Astrozyten im Rückenmark sind blau fluoreszent. In Transversalschnitten ist die graue Substanz, die die Zellkörper beinhaltet, stark fluoreszent (Abb. 8, G). Sie bildet schmetterlingsförmig das Innere des Rückenmarks. In der spinalen weissen Substanz, in der die Axone verlaufen, liegen die blau fluoreszenten Astrozyten in elongiert radialer Anordnung entlang der myelinisierten Fasern (Abb. 8, G).

Um zu untersuchen, ob weitere Zelltypen des Gehirns eine ektopische Expression von ECFP zeigen, wurden Koimmunfärbungen durchgeführt.

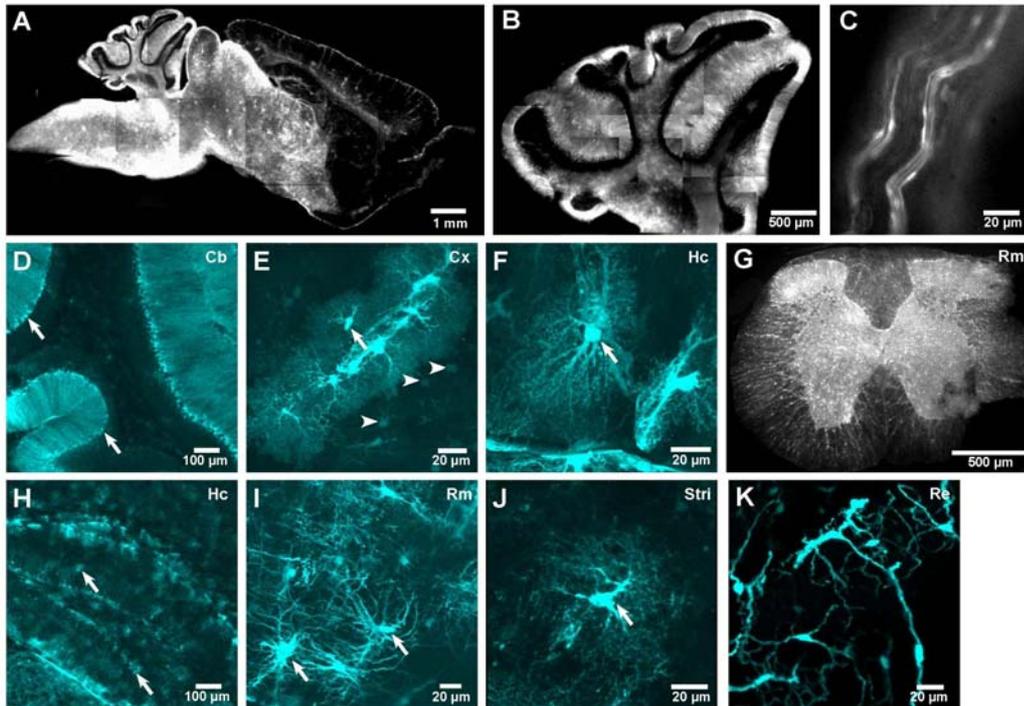


Abb. 8: Epifluoreszenz- und Laserscan-mikroskopische Analyse von ECFP-exprimierenden Astrozyten von adulten Tieren der Mauslinie TgN(hGFAP-ECFP)-GCFD. A, B, C, G: Übersichtsaufnahmen. A: 100 µm Sagittalschnitt durch das Gehirn einer transgenen Maus. Eine starke Fluoreszenz ist in caudalen Bereichen des Gehirns zu erkennen. B: Übersichtsaufnahme des Cerebellums. C: ECFP ist auch in nicht-myelinisierenden Schwanzzellen exprimiert. In longitudinalen epifluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen des Ischiasnervs kann die ECFP-Fluoreszenz entlang des gesamten Zytoplasmas der Zellen detektiert werden. G: Übersichtsaufnahme über einen transversalen Vibratomschnitt durch das Rückenmark. Eine starke Fluoreszenz lässt sich in allen Bereichen des Rückenmarks erkennen. D, E, F, H, I, J: Konfokale Aufnahmen vergrößerter Ausschnitte aus verschiedenen Hirnbereichen. Eine starke Fluoreszenz lässt sich sowohl in fast allen Bergmann-Gliazellen (D, Pfeile) wie auch in Astrozyten der weissen Substanz erkennen. D, E: Cortex, F, H: Hippocampus, I: Rückenmark, J: Striatum. Die ECFP-Fluoreszenz ist sowohl im Zellsoma wie auch in den Fortsätzen in allen Hirnbereichen homogen verteilt. Im Cortex (A, E) befinden sich die transgenen Astrozyten meist entlang von Blutgefäßen. Astrogliale Somata, feinste Fortsätze und Endfüßchen, die mit den Gefäßen in Kontakt stehen, sind hell fluoreszent. K: Longitudinalschnitt durch die Retina: Astrozyten der Ganglionzellschicht der Retina exprimieren ECFP.

Immunhistochemische Doppelfärbungen mit Antikörpern gegen zelltypspezifische Markerproteine (Abb. 9) zeigten eine Kolo-kalisation von ECFP mit GFAP (Abb. 9 C). Keine Koanfärbung konnte bei Markerproteinen gegen Oligodendrozyten (CNPase, Abb. 9 D-F) oder gegen Neuronen (NeuN, Abb. 9 G-I) nachgewiesen werden. NeuN (Antigen in neuronalen Nuklei) ist ein nukleäres Antigen, das nur in verschiedenen Neuronenpopulationen exprimiert wird (Mullen et al., 1992). Wie schon in der Einleitung erwähnt, gibt es eine heterogene Population von Astrozyten. Es konnten Astrozyten mit starker Expression des Reporters von Zellen mit schwacher Fluoreszenz unterschieden werden, wie für die Linie

TgN(hGFAP-EGFP) bereits beschrieben wurde (Grass et al., 2004; Matthias et al., 2003). Diese dunkleren Zellen zeigen keine Immunreaktivität für GFAP (Daten nicht gezeigt).

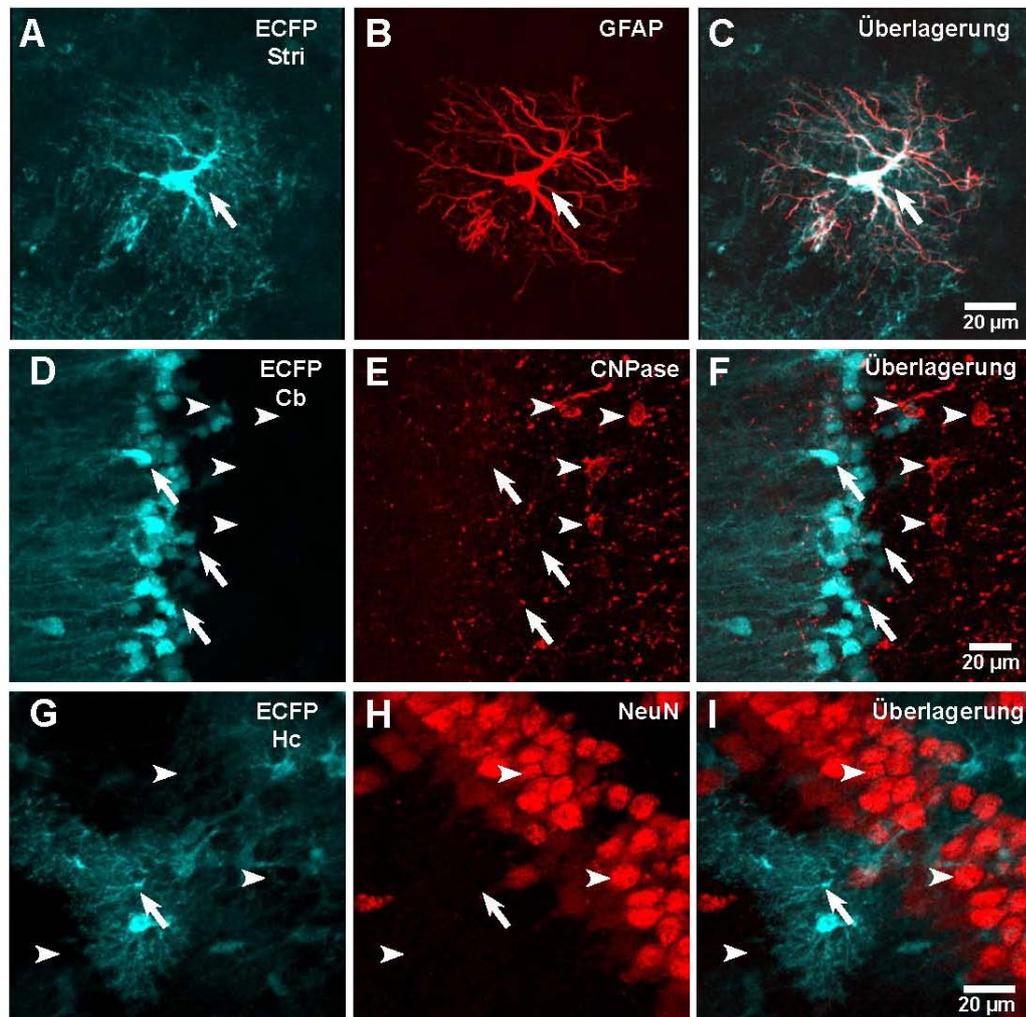


Abb. 9: Zelltypspezifische Expression von ECFP in Astrozyten der Linie TgN(hGFAP-EGFP)-GCFD. Es wurden konfokale Aufnahmen von immunhistochemischen Anfärbungen an 40 µm dicken Vibratomschnitten im Striatum (A – C), Cerebellum (D – F) und im Hippocampus (G – H) mit Antikörpern gegen Markerproteine aufgenommen. A – C: Das Markerprotein für Astrozyten GFAP (B, C) zeigt eine Überlappung mit ECFP (A). Keine Überlappung lässt sich für Markerproteine gegen Oligodendrozyten (CNPase; D – F) oder gegen Neuronen (NeuN; G – I) nachweisen.

Immunhistochemische Doppelfärbungen mit Antikörpern gegen GFP und GFAP zeigen häufig eine Kolo-kalisation (Abb. 10). Allerdings sind nicht alle GFAP-positiven Zellen auch positiv für ECFP, auch nicht nach Verstärkung des Signals mittels Immunhistochemie (Abb. 10 C). Durch eine Immunhistochemische Analyse mit Antikörpern gegen ECFP kann das fluoreszente Signal verstärkt werden. Kultivierte Astrogliazellen aus neugeborenen Tieren der Linie GCFD zeigen das gleiche Resultat. Es

sind viele, aber nicht alle GFAP-positiven Zellen transgen. Das ist kein Problem der ECFP-Detektion, wie immunhistochemische Doppelfärbungen zeigen. Die Zellen exprimieren kein ECFP. Auch eine Analyse der Ultrastruktur mittels Immuno-Elektronenmikroskopie dieser Zellkulturen konnte bestätigen, dass einige Fortsätze von Astrozyten mit gegen ECFP Protein A-gekoppelten Goldkugeln markiert sind, andere wiederum nicht (Abb. 10 I, J).

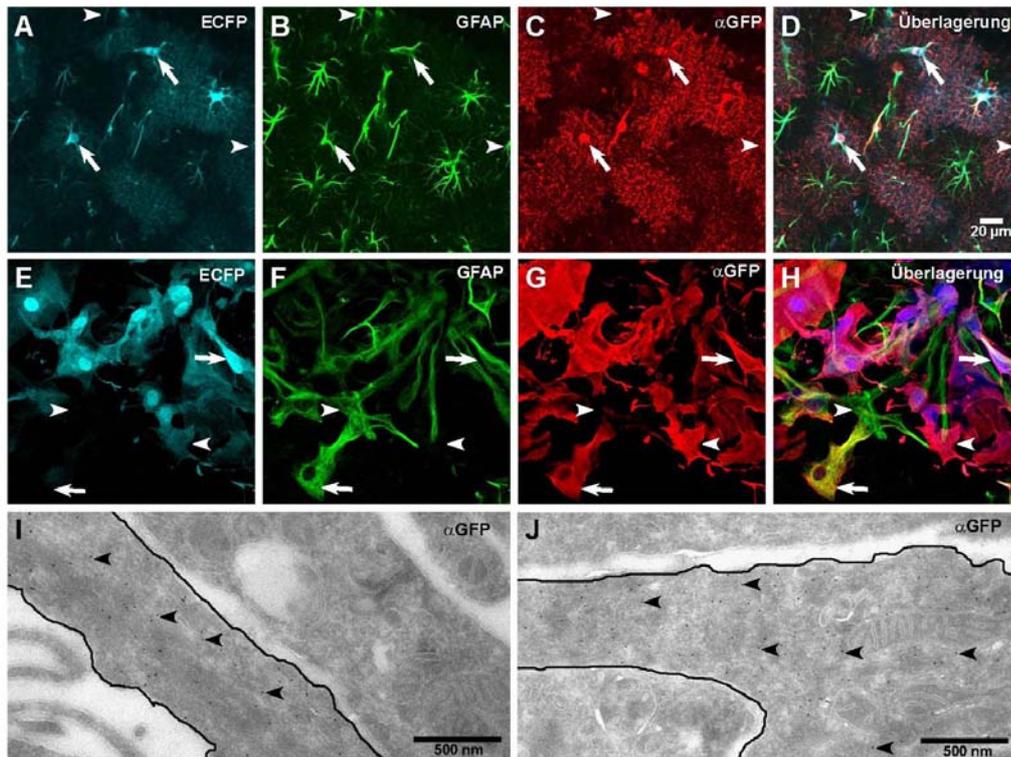


Abb. 10: Die Expression von ECFP und GFAP überlappt nicht in allen Astrozyten der Linie TgN(hGFAP-ECFP)-GCFD in Hirnschnitten wie auch in primären astroglia-reichen Primärkulturen. Die Abbildung zeigt konfokale Aufnahmen von immunhistochemischen Doppelfärbungen an 50 µm dicken Vibratomschnitten im Hippocampus (A – D) oder in astroglia-reichen Primärkulturen (E – H). Die ECFP-Fluoreszenz (A, E) kann durch eine Antikörperfärbung (C, G) verstärkt werden (E – H, Pfeil von rechts nach links). Nicht alle GFAP-positiven (B, F) Astrozyten sind auch positiv für ECFP (Pfeilspitzen nach rechts in A – H), aber auch nicht alle ECFP-positiven Zellen sind GFAP-positiv (E – H, Pfeilspitzen nach links). I, J: Immuno-elektronenmikroskopische Analyse von ECFP-positiven astroglia-reichen Primärkulturen. Einige Fortsätze sind positiv für GFP (Pfeilspitzen), andere nicht.

5.1.3.3. Analyse der Mauslinie TgN(hGFAP-AmCyan1)

Neue RCFPs aus riffbildenden Korallen und Seeanemonen sind unter anderem von (Lukyanov et al., 2000) kloniert worden und werden von Clontech vertrieben. Diese weisen häufig eine höhere Quantenausbeute und eine bessere Photostabilität auf als Varianten von GFP, insbesondere ECFP. Daher sollte im zyanfarbenen Spektralbereich zusätzlich zur

transgenen Expression von ECFP das ebenfalls zyanfarbene AmCyan1 transgen in Astrozyten exprimiert werden. Eine stabile, helle Fluoreszenz von AmCyan1 konnte in transgenen Tieren der Linie TgN(hGFAP-AmCyan1)-GCYM in allen wichtigen Hirnbereichen wie im Cerebellum, Cortex und Hippocampus nachgewiesen werden (Abb. 11 A). In caudalen Hirnbereichen wie im Hirnstamm, Thalamus, Hypothalamus und auch Cerebellum wurde die stärkste Fluoreszenzintensität festgestellt (Abb. 11 A, B). Es ist eine zelluläre Auflösung von Astrozyten möglich, AmCyan1

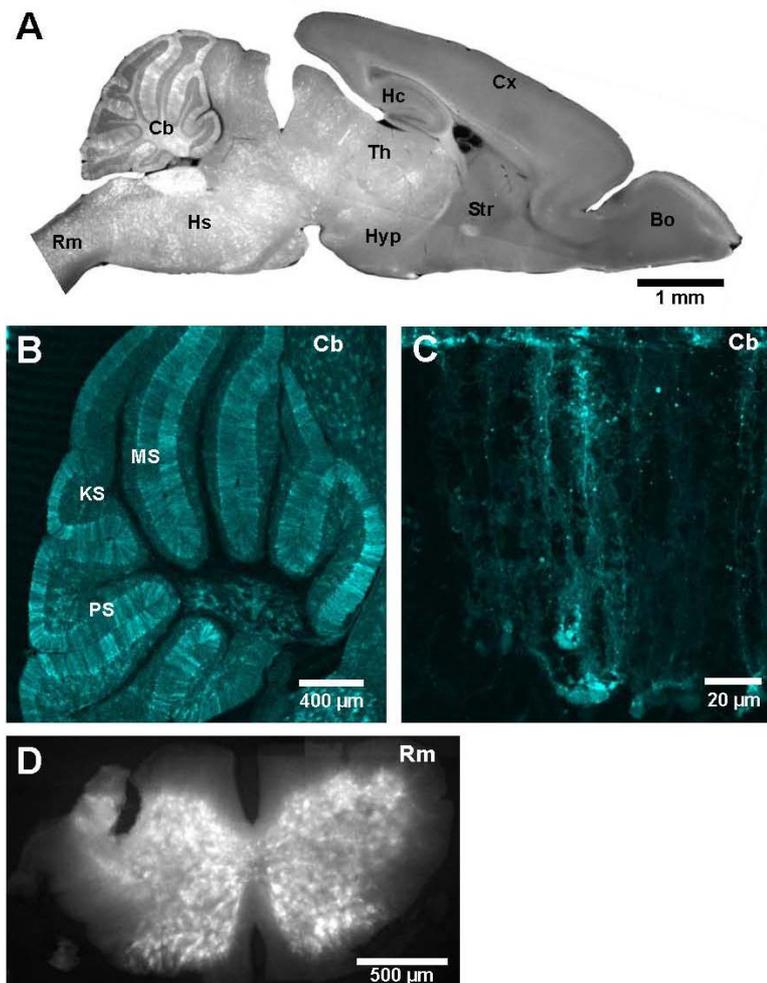


Abb. 11: Übersicht über die AmCyan1-Expression im Gehirn und Rückenmark adulter transgener Mäuse der Linie TgN(hGFAP-AmCyan1)-GCYM. A: Epi-fluoreszenzmikroskopische Aufnahme eines sagittalen Vibratomschnittes von 100 µm Dicke. Die Expression von AmCyan1 ist primär caudal (Übersichtsaufnahme: Cerebellum (Cb), Rückenmark (Rm), Hirnstamm (Hs), und Thalamus (Thal)). B: Die konfokale Aufnahme eines 100 µm dicken, translobulären Vibratomschnittes des Cerebellums zeigt eine starke Fluoreszenz in Bergmann-Glia in der Molekularschicht (MS) und cerebellären Astrozyten der Körnerschicht (KS) und der weissen Substanz. D: Eine vergrößerte konfokale Aufnahme der Molekularschicht des Cerebellums zeigt eine helle AmCyan1-Fluoreszenz in den feinen Fortsätzen und Endfüßen der Bergmann-Glia. D: Transversaler Vibratomschnitt (100 µm) durch das Rückenmark. Die Astrozyten in der grauen Substanz sind fluoreszent, in der weissen Substanz kann keine AmCyan1-Fluoreszenz detektiert werden.

verteilt sich ubiquitär in der Zelle, auch in den Endfüßen und feinen Fortsätzen (Abb. 11 C). Allerdings wurden im Gegensatz zur transgenen Expression von ECFP in Oligodendrozyten oder Astrozyten (5.1.3.1. und 5.1.3.2.) unerwartet fluoreszente Aggregate gefunden (Abb. 13).

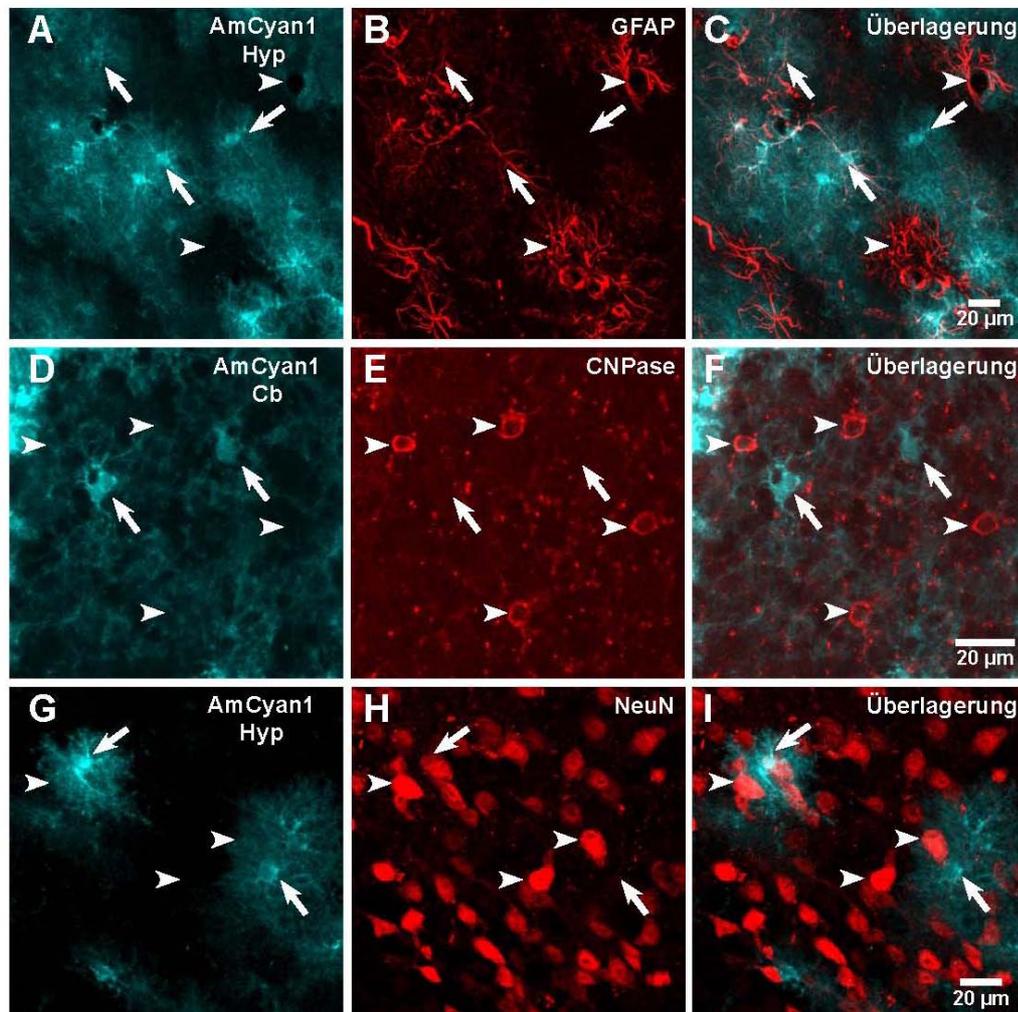


Abb. 12: Expressionsanalyse der Linie Tg(hGFAP-AmCyan1)-GCYM durch immunhistochemische Anfärbung von Zellen mit transgen exprimiertem AmCyan1 gegen Markerproteine. Sagittale Vibratomschnitte (40 µm) von adulten Mäusen wurden mit Antikörpern gegen zelltypspezifische Marker (GFAP, A – C; CNPase, D – F; NeuN, G - I) immungefärbt. Es zeigt sich keine Überlagerung der Signale für AmCyan1 (D – I, Pfeile) mit CNPase (E, F, Pfeilspitzen) und NeuN (H, I, Pfeilspitzen). GFAP-positive Astrozyten (A, C) zeigen eine Kolokalisation mit AmCyan1 (C, Pfeile). Es können auch GFAP-positive Zellen gefunden werden, die keine Expression von AmCyan1 aufweisen (A – C, Pfeilspitzen).

Immunhistochemische Anfärbungen mit Antikörpern gegen zelltypspezifische Markerproteine (Abb. 12) zeigten eine Kolokalisation von AmCyan1 mit GFAP (Abb. 12 C). Keine Koanfärbung konnte bei Markerproteinen gegen Oligodendrozyten (CNPase, Abb. 12 D-F) oder gegen Neuronen (NeuN, Abb. 12 G-I) nachgewiesen werden.

In den transgenen Astrozyten dieser Tiere wird die Bildung von fluoreszenten Aggregaten beobachtet. Es können fluoreszente Partikel im Soma wie auch in den Fortsätzen der fluoreszenten Astrozyten nachgewiesen werden (Abb. 13). Diese haben einen Durchmesser von ca. 2 μm . Die Menge der fluoreszenten Aggregate steigt mit dem Alter der Tiere. So sind nur sehr wenige Aggregate in den Bergmann-Gliazellen im Cerebellum in einem Alter von zehn Tagen nachzuweisen. Die Menge dieser Aggregate ist höher bei P21, noch höher bei P53 und die stärkste Aggregatbildung konnte im Cerebellum 600 Tage alter Mäuse nachgewiesen werden.

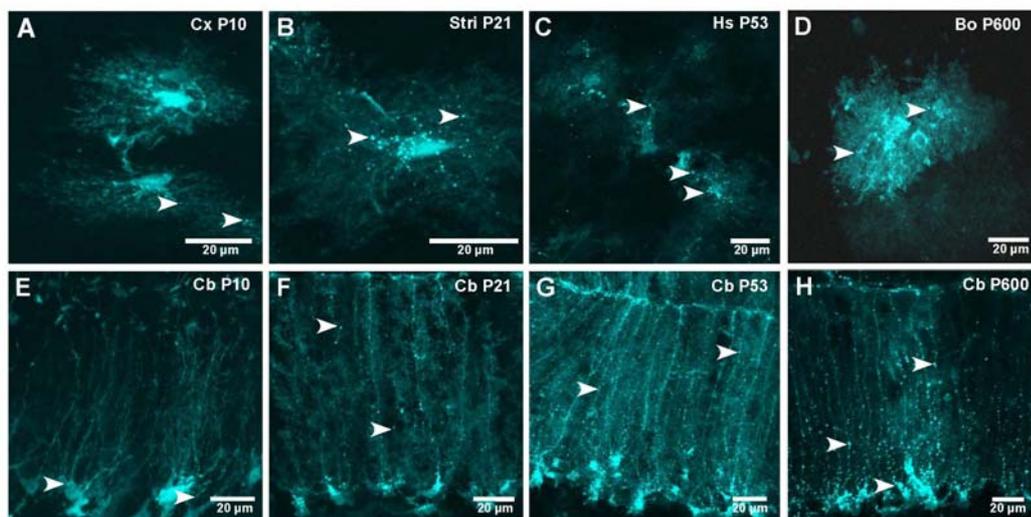


Abb. 13: Altersabhängige Bildung von fluoreszenten Partikeln in transgenen Astrozyten der Linie TgN(hGFAP-AmCyan1)-GCYM. Es wurden 100 μm dicke Vibratomschnitte von Tieren im Alter von 10 (A, E), 21 (B, F), 53 (C, G) und 600 (D, H) Tagen hergestellt und mit Hilfe von CLSM untersucht. Eine starke Bildung fluoreszenter Aggregate wurde in allen wichtigen Hirnbereichen wie Cortex (Cx, A), Striatum (Stri, B), Hirnstamm (Hs, C) und Bulbus olfactorius (Bo, D) und Cerebellum (Cb, E – H) gefunden. Die Anzahl und Dichte dieser unerwartet auftretenden fluoreszenten Partikel (A – H, Pfeilspitzen) steigt mit dem Alter der Tiere. In einem Alter von 10 Tagen (A, E) sind nur relativ wenige Aggregate zu sehen, bei einem Alter von P600 (D, H) ist fast die gesamte Fluoreszenz nur noch in den Aggregaten zu finden.

5.1.3.4. Generierung und Analyse der Mauslinie TgN(hGFAP-AsRed2)

Um den Spektralbereich der transgenen Linien um ein rot fluoreszentes FP zu erweitern, wurde eine Mauslinie generiert, die AsRed2 in Astrozyten exprimiert. Rot fluoreszente Proteine wurden zum Zeitpunkt der Generierung der transgenen Linien ausschliesslich aus Anthozoa verwendet. Das einzige funktionell exprimierende Stammtier GREL, das keine transgenen Nachkommen hatte, wies eine rote Fluoreszenz in

mehreren Hirnbereichen auf. Das fluoreszente Protein bildete allerdings starke Aggregate, die einen Durchmesser von ca. 2 µm hatten. Die rote Fluoreszenz beschränkte sich auf diese Partikel, es konnten keine Zellkörper erkannt werden. In der Purkinjezellschicht des Kleinhirns konnten zahlreiche dieser fluoreszenten Partikel nachgewiesen werden (Abb. 14 A, B), die aufgrund ihrer Lage den Bergmann-Gliazellen zugeordnet werden. Auch im Cortex konnten rot fluoreszente Partikel nachgewiesen werden (Abb. 14 C, D).

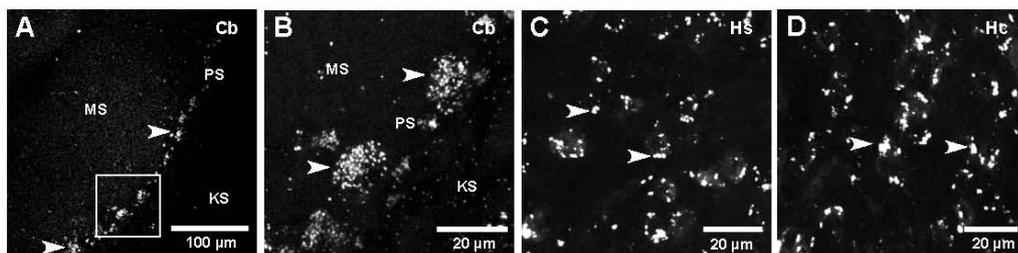


Abb. 14: Expression von AsRed2 im Gehirn eines transgenen Stammtiers der Linie TgN(hGFAP-AsRed2)-GREL. Der humane GFAP-Promoter induziert eine Expression von AsRed2 in der Purkinjezellschicht. AsRed2 liegt ausschliesslich als Aggregat (A – D, Pfeilspitzen) in den Somata der Bergmann-Glia des Cerebellums (A, B) und in Zellen des Cortex (C, D) vor. MS: Molekularschicht, PS: Purkinjezellschicht, KS: Körnerschicht.

5.1.3.5. Vergleich des Expressionsmusters der transgenen Linien mit astrozytärer Expression von FPs

Es zeigte sich auch eine deutliche Variabilität im Expressionsmuster der astroglialen transgenen Linien. Sie zeigen eine kräftige Expression von FP in caudalen Hirnarealen wie Cerebellum, Hirnstamm, Mittelhirn und Thalamus. Auch im Rückenmark sind reichlich fluoreszente Zellen zu erkennen. Die Areale im Vorderhirn wie Cortex, Hippocampus und Striatum sind schwach fluoreszent. Im Cortex sind ECFP-fluoreszente, aber kaum AmCyan1-exprimierende Astrozyten vornehmlich entlang der Blutgefässe zu finden. Bei der Linie TgN(hGFAP-ECFP)-GCFD konnte eine starke Expression auch in retinalen Astrozyten und in nichtmyelinisierenden Schwannzellen des Nervus Ischiaticus beobachtet werden, was bei der Linie TgN(hGFAP-AmCyan1)-GCYM nicht gefunden werden konnte. Hingegen sind in der etablierten TgN(hGFAP-EGFP)-Linie die Müllerzellen der Retina, jedoch nicht die retinalen Astrozyten markiert (Nolte et al., 2001). Die Expression der FPs ist beschränkt auf Astrozyten, wie durch immunhistochemische Analysen mit zelltypspezifischen Antikörpern gezeigt werden konnte. Jedoch exprimieren auch einige

GFAP-immunonegative Astrozyten das FP, was frühere Befunde bestätigt (Hirrlinger et al., 2005; Nolte et al., 2001).

In nicht allen GFAP-immunoreaktiven Astrozyten konnte ECFP-Fluoreszenz nachgewiesen werden. Dies scheint nicht durch eine zu geringe Proteinmenge bedingt zu sein, da sowohl in Analysen durch Immunfärbung mit Antikörpern gegen ECFP in Hirnschnitten (ungefähr 10-fache Verstärkung des Signal) wie auch in elektronenmikroskopischen Ultrastrukturuntersuchungen von immunmarkierten kultivierten Astrogliazellen ECFP-negative Zellen gefunden werden konnten. Eine nicht mit der GFAP-Immunhistochemie überlappende Expression der FP konnte ebenfalls bereits in anderen transgenen Mauslinien, in denen der hGFAP-Promotor verwendet wurde, beobachtet werden (Nolte et al., 2001).

5.1.4. Vergleich von neu generierten, astrozytenspezifisch RCFP-exprimierenden Mauslinien mit weiteren transgenen RCFP-exprimierenden Mauslinien in neuronalen Zellen

Um zu überprüfen, ob die Bildung von fluoreszenten Aggregaten neben Astrozyten auch in anderen Zelltypen des Gehirns und bei Verwendung anderer RCFPs stattfindet, wurden weitere transgene Mäuse untersucht, die RCFPs exprimieren und im Labor parallel zu dieser Arbeit generiert wurden (Hirrlinger et al., 2005). Dazu wurden Mauslinien verwendet, die neuronal HcRed1 (HETEROACTOS CRISPA; Ext. 588 nm, Em. 618 nm) unter der Kontrolle des murinen Thy1.2-Promotors (Abb. 15 C), sowie Mauslinien, die oligodendroglial DsRed1 (DISCOSOMA SP.; Ex. 558 nm, Em. 583 nm) unter der Kontrolle des murinen PLP-Promotors exprimierten (Abb. 15 A, D). Weitere Mauslinien mit astrozytärer Expression von mRFP1 (Ext. 584, Em. 607 nm), einer monomeren Variante des DsRed1 (Campbell et al., 2002), wurden auf die Bildung fluoreszenter Aggregate untersucht (Abb. 15 A, B). Ähnlich wie Mauslinien mit transgener Expression von GFP-Varianten waren auch diese Tiere fertil, lebten länger als ein Jahr und zeigten keine auffälligen Zeichen von Entwicklungs- oder Verhaltensstörungen.

Alle Mauslinien exprimieren das jeweilige RCFP zelltypspezifisch (Abb. 15 B – D). In TgN(hGFAP-mRFP1) ist eine starke Fluoreszenz in der Bergmann-Glia des Kleinhirns zu erkennen (Abb. 15 B). TgN(mPLP-DsRed1) zeigen eine starke Fluoreszenz in der weissen Substanz des Cerebellums (Abb. 15 D). In der Linie TgN(mThy1.2-HcRed1) sind die corticalen Neuronenbänder von Schicht 2/3 und 5/6 eindeutig zu erkennen

(Abb. 15 C). Zusätzlich zur charakteristischen Zellmorphologie, detektiert durch Fluoreszenzmikroskopie, wurden immunhistochemische Doppel-färbungen mit den Markerproteinen GFAP, MAG, NeuN für Astrozyten, Oligodendrozyten und Neuronen (Abb. 16) durchgeführt, um eine zelltyp-spezifische Expression nachzuweisen.

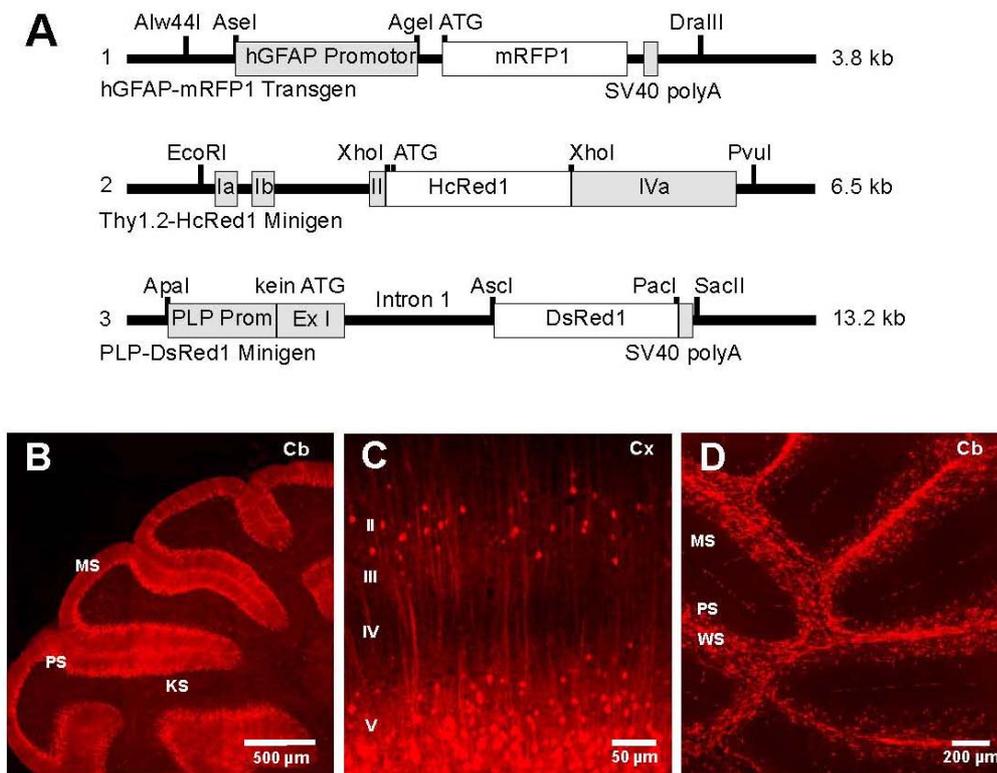


Abb. 15: Die transgene Expression von fluoreszenten Proteinen aus riffbildenden Korallen und Seeanemonen im Gehirn ist zelltypspezifisch in den Linien TgN(hGFAP-mRFP1), TgN(mThy1.2-HcRed1) und TgN(mPLP-DsRed1). A: DNA-Konstrukte für die Pronukleusinjektion wurden generiert, indem die Gene für fluoreszente Proteine (HcRed1, DsRed1, mRFP1) entweder in das murine Thy1.2- oder das murine PLP-Minigen oder hinter den humanen GFAP-Promotor plaziert wurden. B: Der humane GFAP-Promotor verursacht einen hohen Expressionsgrad von mRFP1 in der vorrangigen Astrogliapopulation des Cerebellums, der Bergmann-Glia. C: Das murine Thy1.2-HcRed1-Minigen induziert eine stark spezifische Expression von HcRed1 in Projektionsneuronen. Hier ist die rote Fluoreszenz der Pyramidenzellschichten II und V des Cortex gezeigt. D: Die Expression des murinen PLP-DsRed1-Minigen markiert Oligodendrozyten. Gezeigt ist die rote Fluoreszenz der Oligodendrozyten in der weissen Substanz. B – D sind CLSM-Aufnahmen von frontalen (C) und sagittalen (B, D) Vibratomschnitten (100 µm). MS: Molekularschicht, PS: Purkinjzellschicht, KS: Körnerschicht, WS: weisse Substanz.

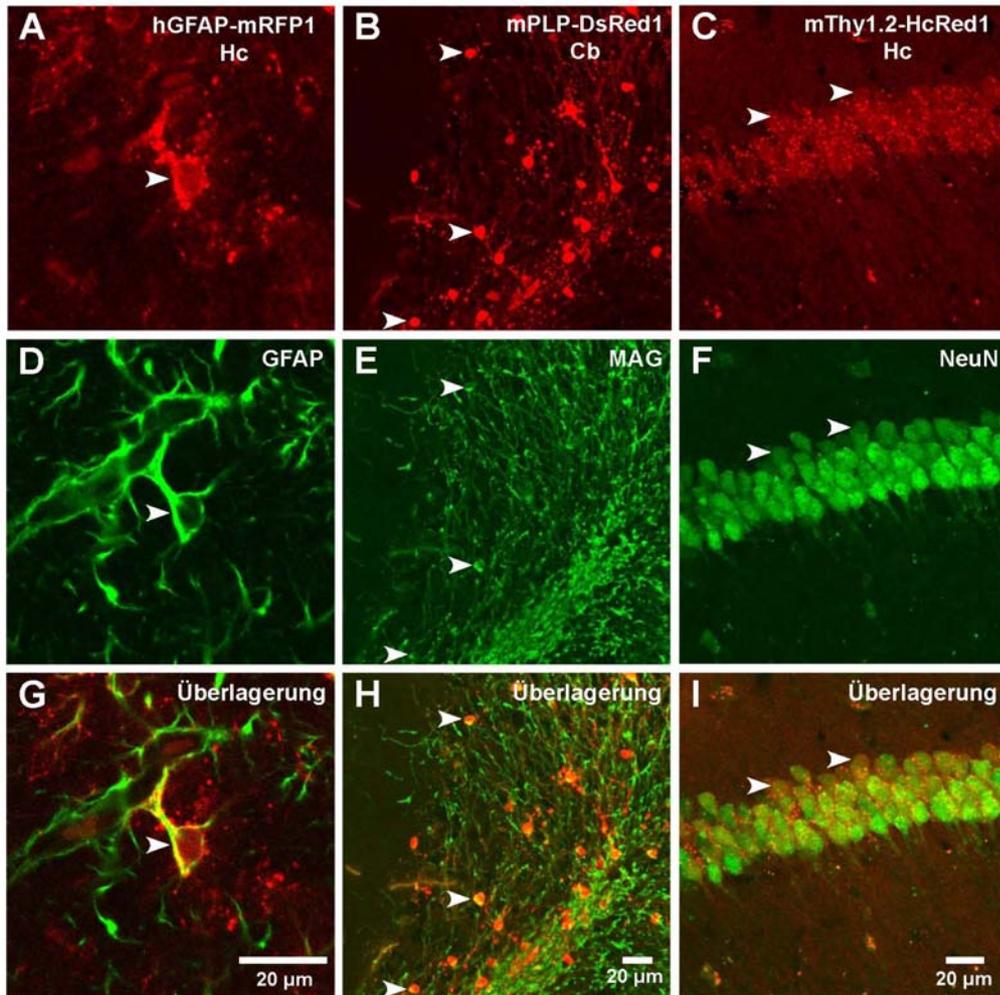


Abb. 16: Immunohistochemische Analyse von RCFP-exprimierenden transgenen Mäusen. Die zelltypspezifische Expression wurde durch eine Immunanfärbung gegen Zelltypmarker (GFAP, MAG und NeuN) überprüft. A - C: Expression von mRFP1 (Hippocampus) in Astrozyten, DsRed1 (Cerebellum) in Oligodendrozyten und HcRed1 (Hippocampus) in hippocampalen CA1-Neuronen. D – F: Immunfärbung gegen GFAP (D), MAG (E) und NeuN (F). G – H: Überlagerungen von RCFP-Expression und den korrespondierenden Immunfärbungen. Die Bilder wurden als Bildstapel mit einer Tiefe von 10 – 50 μm mit CLSM aufgenommen und werden als Maximalintensitätsprojektionen dargestellt (B, C, E, F, H, I). A, D, G: einzelne optische Ebenen. Die Pfeilspitzen bezeichnen Zellen mit einer Koexpression von RCFPs und der entsprechenden Immunmarkierung.

5.1.4.1. Aggregatbildung in transgenen Mäusen mit Expression von RCFPs in neuronalen Zellen

Expression des RCFP konnte in den TgN(mThy1.2-HcRed1) ab dem sechsten Postnataltag und bis ins hohe Alter festgestellt werden. Als letzter Zeitpunkt wurden Tiere im Alter von 300 Tagen analysiert. Es waren vornehmlich wichtige Projektionsneurone wie die Pyramidenneurone von Schicht 2/3 des Cortex oder die CA1-Neurone des Hippocampus fluoreszenzmarkiert. HcRed1 konnte in allen Teilen der Zelle detektiert werden, wie im Soma, im Axon und in den Dendriten.

Einige Neuronenpopulationen zeigten rot fluoreszente Präzipitate in einer Grösse von 1-2 μm . Diese Aggregate kamen verstärkt in älteren Tieren vor (Abb. 17, P200). Es zeigte sich, dass es eine grosse Variabilität zwischen den Neuronentypen gab. In corticalen Pyramidenneuronen konnten nur wenige (Abb. 17 B), hingegen in cerebellaren Purkinje-Neuronen reichlich Aggregate festgestellt werden (Abb. 17 A, D).

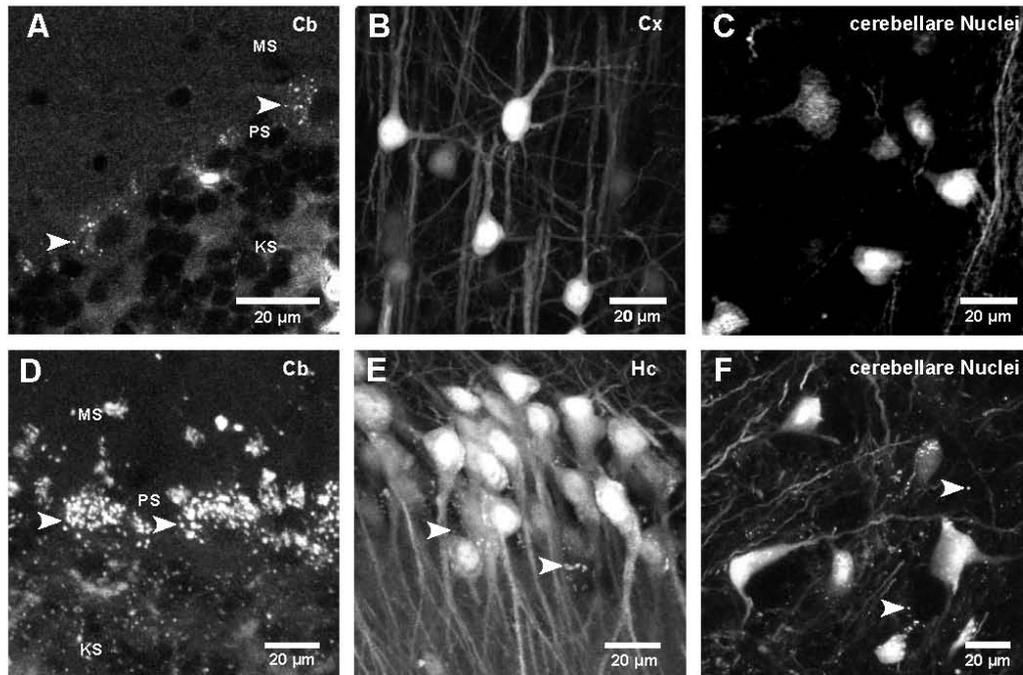


Abb. 17: Projektionen konfokaler Bilderstapel von HcRed1-exprimierenden Neuronen. HcRed1 bildet hauptsächlich in den Somata, aber auch in Fortsätzen von Projektionsneuronen in verschiedenen Hirnarealen fluoreszente Präzipitate (A – F, Pfeilköpfe). A, D: HcRed1 bildet fluoreszente Aggregate im Soma von Purkinje-Neuronen. Diese treten schon am Postnataltag 50 (A) auf, akkumulieren allerdings stark bis Postnataltag 200 (D). B, C: Neuronen im Cortex (B) oder in tiefen cerebellaren Kerne (C) von Tieren am Postnataltag 50 zeigen keine Anzeichen von Proteinaggregationen, im Gegensatz zu Neuronen von älteren Mäusen (Postnataltag 200, E, F).

In TgN(mPLP-DsRed1) konnte eine funktionelle Expression ab dem zweiten postnatalen Tag im Hirnstamm detektiert werden. Ab einem Alter von zehn Tagen kann eine Expression auch im Telencephalon, z. B. im Corpus callosum, nachgewiesen werden. In jung adulten Tieren von 21 Tagen konnte DsRed1 auch in den myelinbildenden Fortsätzen gefunden werden. Mit zunehmender Reife der Oligodendrozyten und Kompaktierung des Myelins konnte immer weniger DsRed1 in den Fortsätzen gefunden werden, es war vornehmlich im Zellsoma und in den distalen Fortätzen vorhanden. Ähnlich wie in den TgN(mThy1.2-HcRed1) bildete auch DsRed1 fluoreszente Aggregate, die sowohl im Zellsoma wie in den

Fortsätzen akkumulierten (Abb.18). Eine stärkere Akkumulation zeigte sich in älteren Tieren.

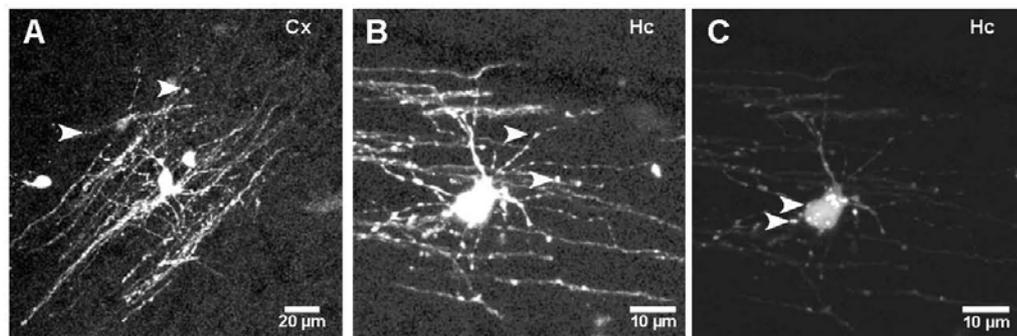


Abb. 18: Projektionen konfokaler Bildstapel von DsRed1-exprimierenden Oligodendrozyten im Gehirn transgener Mäuse. DsRed1 ist stark in Somata und Fortsätzen von Oligodendrozyten exprimiert, aber bildet fluoreszente Ablagerungen (A – C, Pfeilspitzen). A, B: Die Expression von DsRed1, aufgenommen mit CLSM von sagittalen 100 µm Vibratomschnitten transgener Mäuse, betont die dreidimensionale Struktur von Oligodendrozyten im Cortex (A) und Hippocampus (B). Bei einer Aufnahme mit einer geringeren Verstärkung des Detektors (C) werden auch fluoreszente Aggregate im Zellsoma sichtbar (C, gleiche Zelle wie in B). Diese Aggregate werden innerhalb der ersten Postnatalwochen detektierbar (Postnataltag 21, A – C) und akkumulieren mit zunehmendem Alter der Tiere.

Um zu untersuchen, ob die Aggregatbildung eine Folge der oligomeren Eigenschaft der RCFPs ist (AmCyan1, DsRed1 und AsRed2 bilden Tetramere (Lukyanov et al., 2000; Matz et al., 1999), während HcRed1 Dimere bildet (Gurskaya et al., 2001)), wurde das monomere mRFP1 in Astrozyten exprimiert (Hirrlinger et al., 2005). Dieses wurde über gerichtete Mutagenese aus DsRed gebildet (Campbell et al., 2002). Das mRFP1 reift bis zu 10mal schneller als DsRed1. Seine Exzitations- und Emissionsmaxima liegen bei 584 und 607 nm.

Die transgene Mauslinie TgN(hGFAP-mRFP1) wurde ebenfalls auf die Bildung von fluoreszenten Aggregaten untersucht. Die Tiere zeigten eine funktionale astrogliale Expression von mRFP1 in verschiedenen Hirnbereichen. Die Verteilung der fluoreszenzmarkierten Astrozyten war vergleichbar mit anderen transgenen Linien, die den humanen GFAP-Promotor verwendet haben (Hirrlinger et al., 2005; Nolte et al., 2001). Überraschenderweise konnten auch in diesen Tieren fluoreszente Aggregate nachgewiesen werden (Abb. 19). Sie befanden sich sowohl in den Fortsätzen wie auch in den Zellsomata. Auch hier war die Bildung altersabhängig. Sie konnten schon in der ersten postnatalen Woche nachgewiesen werden, in jüngeren Tieren bis P14 jedoch waren weniger fluoreszente Partikel zu erkennen als in älteren Tieren ab P21.

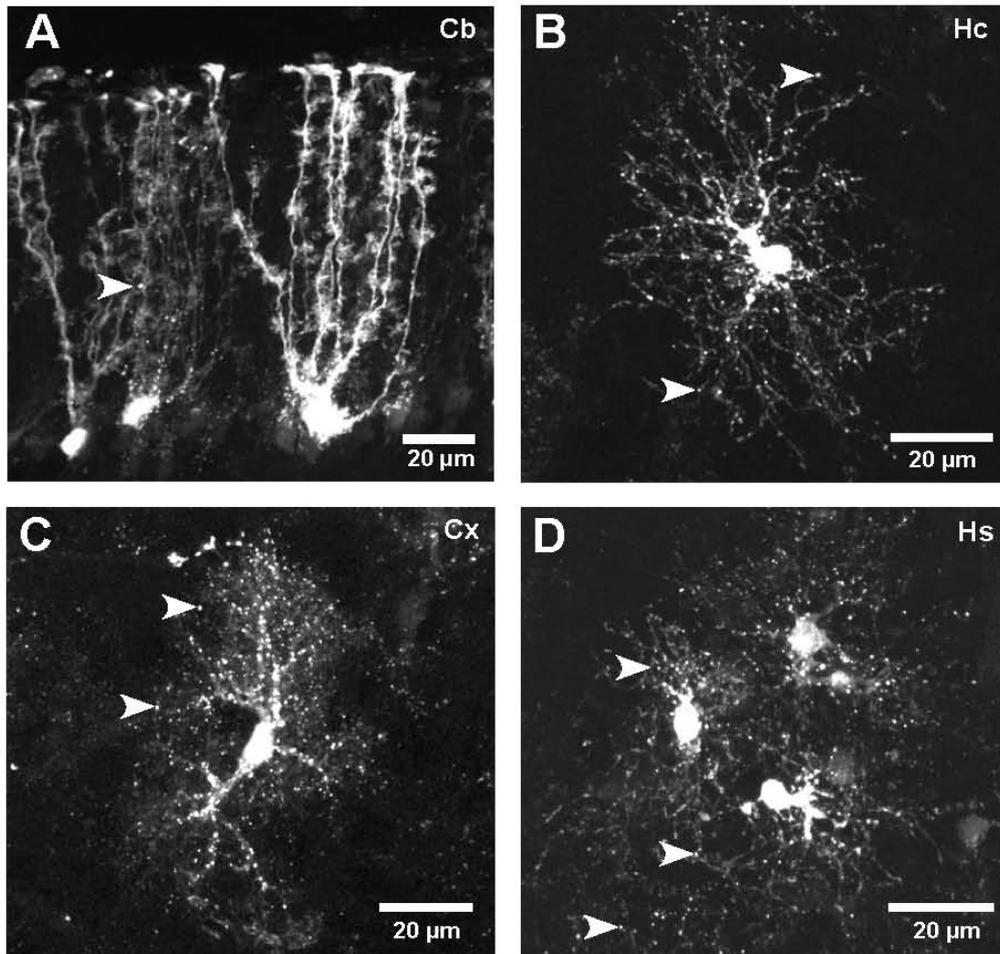


Abb. 19: Projektionen konfokaler Bilderstapel von 100 µm Vibratomschnitten aus Mäusen, die transgen mRFP1 exprimieren. Es bilden sich überraschenderweise auch in dieser Mauslinie fluoreszente Aggregate von mRFP1 (A – D, Pfeilspitzen). Das Transgen wird selektiv in Astrozyten exprimiert, wie zum Beispiel im Cerebellum (A), Hippocampus (B), Cortex (C) und Hirnstamm (D).

5.1.4.2. Analyse der Emissionsspektren von löslichem und aggregiertem RCFP

Um zu untersuchen, ob die Aggregatbildung durch eine Modifikation der Proteinkette ausgelöst wird, wurden die Emissionsspektren von löslichem und aggregiertem AmCyan1- und DsRed1-Protein verglichen (Abb. 20). Es konnte kein Unterschied festgestellt werden. Das Emissionsspektrum sowohl des löslichen wie auch des aggregierten Proteins entspricht dem der Firma Clontech (Webseite <http://www.clontech.com>) veröffentlichten Spektrum (Abb. 20).

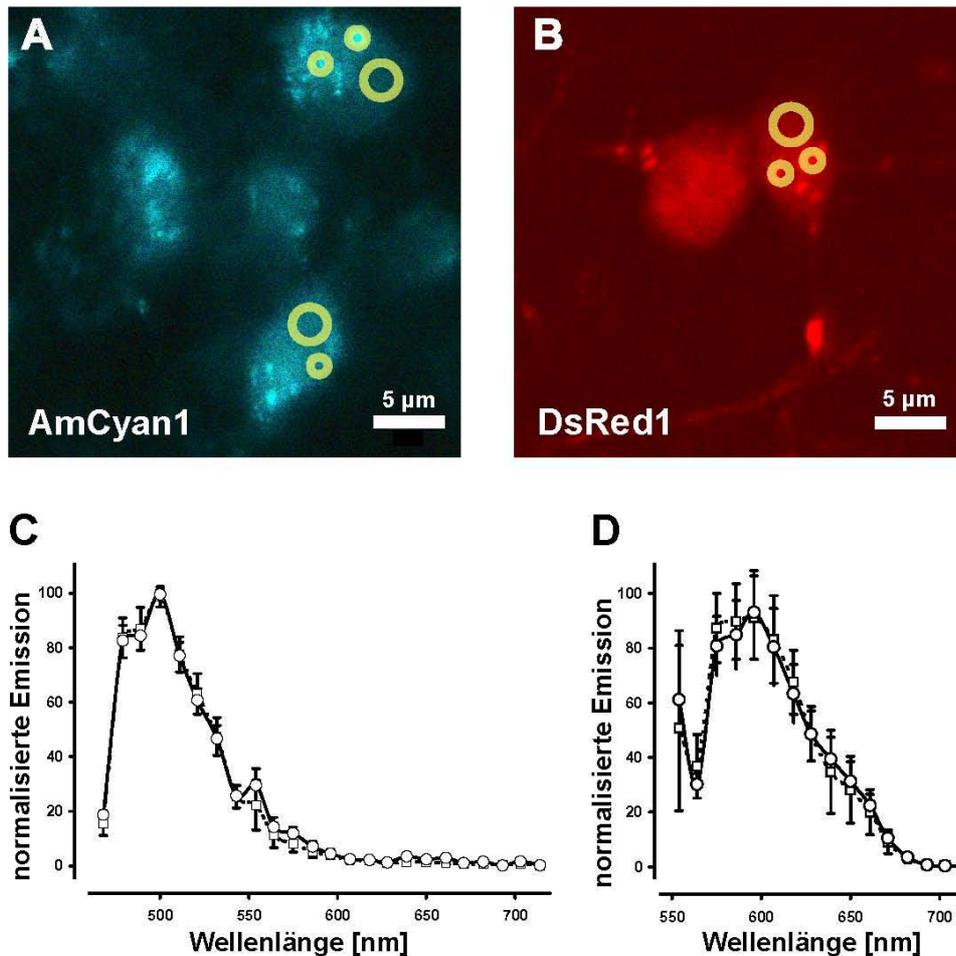


Abb. 20: Emissionsspektren von löslichem und aggregiertem AmCyan1 (A, C, Extinktion 458 nm) und DsRed1 (B, D, Extinktion 543 nm). C, D: Das Emissionsspektrum von fluoreszenten Präzipitaten (Quadrate) und löslichem (Kreise) zeigt keine signifikanten Unterschiede. Bei Verwendung des Multikanaldetektors des CLSM 510 Meta konnten die Emissionsspektren von aggregiertem (kleine gelbe Kreise in A, B) oder löslichem (grosse gelbe Kreise in A, B) in Hirnschnitten transgener Mäuse aufgenommen werden. Die Emissionsspektren zeigen Mittelwerte und Standardabweichungen von $n = 21$ (AmCyan1, aggregiert), $n = 21$ (AmCyan1, löslich), $n = 36$ (DsRed1, aggregiert) und $n = 14$ (DsRed, löslich) Messungen.

5.1.4.3. Vergleich von RCFPs mit Varianten von GFP aus *Hydrozoa* in transgenen Mäusen

Um zu untersuchen, ob die Bildung von fluoreszenten Ablagerungen ein allgemeines Phänomen der Überexpression von fluoreszenten Proteinen oder spezifisch für RCFPs ist, wurden mehrere Linien transgener Mäuse mit Expression von Varianten von GFP aus *Aequorea victoria* (ECFP, EGFP, EYFP) analysiert. Es wurden Tiere verwendet, die EGFP (TgN(hGFAP-EGFP), Nolte et al., 2001) oder ECFP in Astrozyten (TgN(hGFAP-ECFP), vorliegende Arbeit) oder EYFP in Neuronen (TgN(Ty1.2-EYFP), Hirrlinger et al., 2005) exprimieren. Die Tiere wurden

fixiert und sagittale Hirnschnitte am CLSM untersucht. In diesen Mäusen konnten keine fluoreszenten Aggregate nachgewiesen werden (Abb. 21), auch nicht in älteren Tieren.

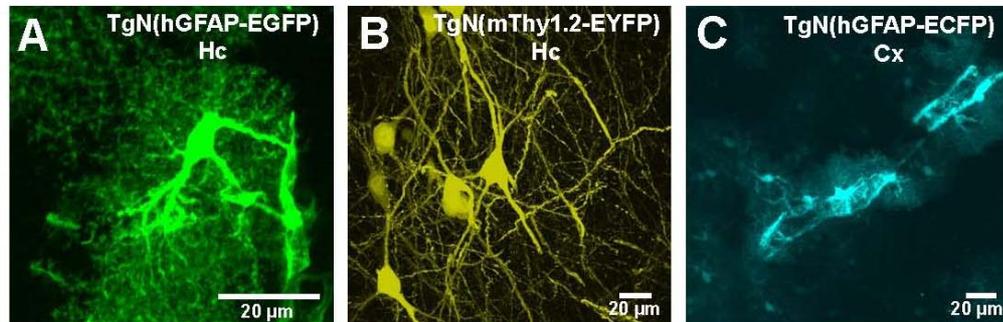


Abb. 21: Projektionen konfokaler Bildstapel von sagittalen Hirnschnitten (100 µm) aus transgenen Tieren der Linie TgN(hGFAP-EGFP) (A), TgN(mThy1.2-EYFP) (B) und TgN(hGFAP-ECFP) (C). Schnitte transgener Mäuse zeigen Expression von fluoreszenten Proteinen aus Hydrozoa (Varianten von GFP), die mit ähnlichen DNA-Konstrukten generiert wurden wie die Tiere, die transgen RCFPs exprimieren. Es ist eine homogene Verteilung des fluoreszenten Proteins in hippocampalen, protoplasmatischen Astrozyten (A), Pyramidenneuronen (B) wie auch corticalen Astrozyten, die Kapillaren umschliessen (C), zu erkennen. Es konnten in keinem Alter der transgenen Mäuse fluoreszente Aggregate nachgewiesen werden.

Um zu untersuchen, ob die Aggregatbildung eine Folge der zellulären Umgebung im Gehirn ist, wurden aus Tieren der RCFP-exprimierenden transgenen Mauslinien TgN(hGFAP-AmCyan1), TgN(hGFAP-mRFP1), TgN(mPLP-DsRed1) primäre Zellkulturen hergestellt und mit Zellkulturen aus Tieren verglichen, die GFP-Varianten exprimieren (TgN(hGFAP-EGFP), TgN(hGFAP-ECFP), TgN(mThy1.2-EYFP)). Astrogliareiche Primärkulturen (Hamprecht und Löffler, 1985) wurden aus neugeborenen Tieren und primäre gemischte neurale Zellkulturen (Lubetzki et al., 1993) aus Embryonen am Embryonaltag 15-16 isoliert. Alle transgenen Zellen mit RCFP Expression zeigten eine Aggregatbildung auch in Zellkulturen (Daten nicht gezeigt). Keine Aggregatbildung kann bei primären Zellen aus Mäusen gefunden werden, die transgen Varianten von GFP exprimieren (Daten nicht gezeigt).

5.1.5. Elektrophysiologische Untersuchung von transgenen Mäusen mit RCFP-Expression

Um zu untersuchen, ob die transgene Expression von RCFPs die zelluläre Physiologie beeinflusst, wurden *Whole-cell Patch-clamp* Messungen in frisch präparierten Hirnschnitten durchgeführt (Abb. 22).

Die Injektion von positiven Strömen während *Current-clamp*-Messungen in durch HcRed1-Fluoreszenz identifizierten corticalen Pyramidenzellen

(Ruhemembranpotential $V_{\text{mem}} = -62 \text{ mV} \pm 6 \text{ mV}$, $n = 15$, P4-P20) führten zu einer Serie von Aktionspotentialen, die denen aus Wildtypmäusen entsprachen (Larkum et al., 2001). Die untersuchten Zellen wurden gleichzeitig mit *Lucifer Yellow* gefüllt, um ihre Morphologie darzustellen. Daneben wurden DsRed1-markierte Oligodendrozyten der weissen Substanz des Kleinhirns sowie des Mittelhirns und corticale Astrozyten mit AmCyan1- oder mRFP1-Expression mit *Voltage-clamp*-Messungen untersucht. Sie zeigten ein Ruhemembranpotential von $-64 \text{ mV} \pm 10 \text{ mV}$ (Oligodendrozyten; $n = 20$, P6 - P25) bzw. $V_{\text{mem}} = -77 \text{ mV} \pm 12 \text{ mV}$ (Astrozyten; $n = 4$, P6). Das Strom-Spannungsprofil dieser Zellen zeigte eine Dominanz von symmetrischen, fast nicht gleichrichtenden, Ohm'schen Kaliumströmen (Berger et al., 1991; Fuss et al., 2000; Grass et al., 2004; Matthias et al., 2003) Jedoch zeigten beide Zelltypen eine etwas höhere Expression von einwärtsgerichteten Strömen unter hyperpolarisierenden Spannungssprüngen (Abb. 22). Dies ist eine typische Eigenschaft von reifen Gliazellen (Verkhratsky und Steinhauser, 2000). Bei grossen depolarisierenden Spannungssprüngen konnte in Oligodendrozyten eine leichte Inaktivierung der auswärtsgerichteten Ströme und grössere *Tail*-Ströme nachgewiesen werden. Dies ist typisch für Oligodendrozyten und wird durch eine Veränderung des K^+ -Gleichgewichtspotentials durch das sehr kleine extrazelluläre Volumen in myelinisiertem Gewebe verursacht (Berger et al., 1991). Es konnte kein Unterschied zu Wildtypzellen gefunden werden.

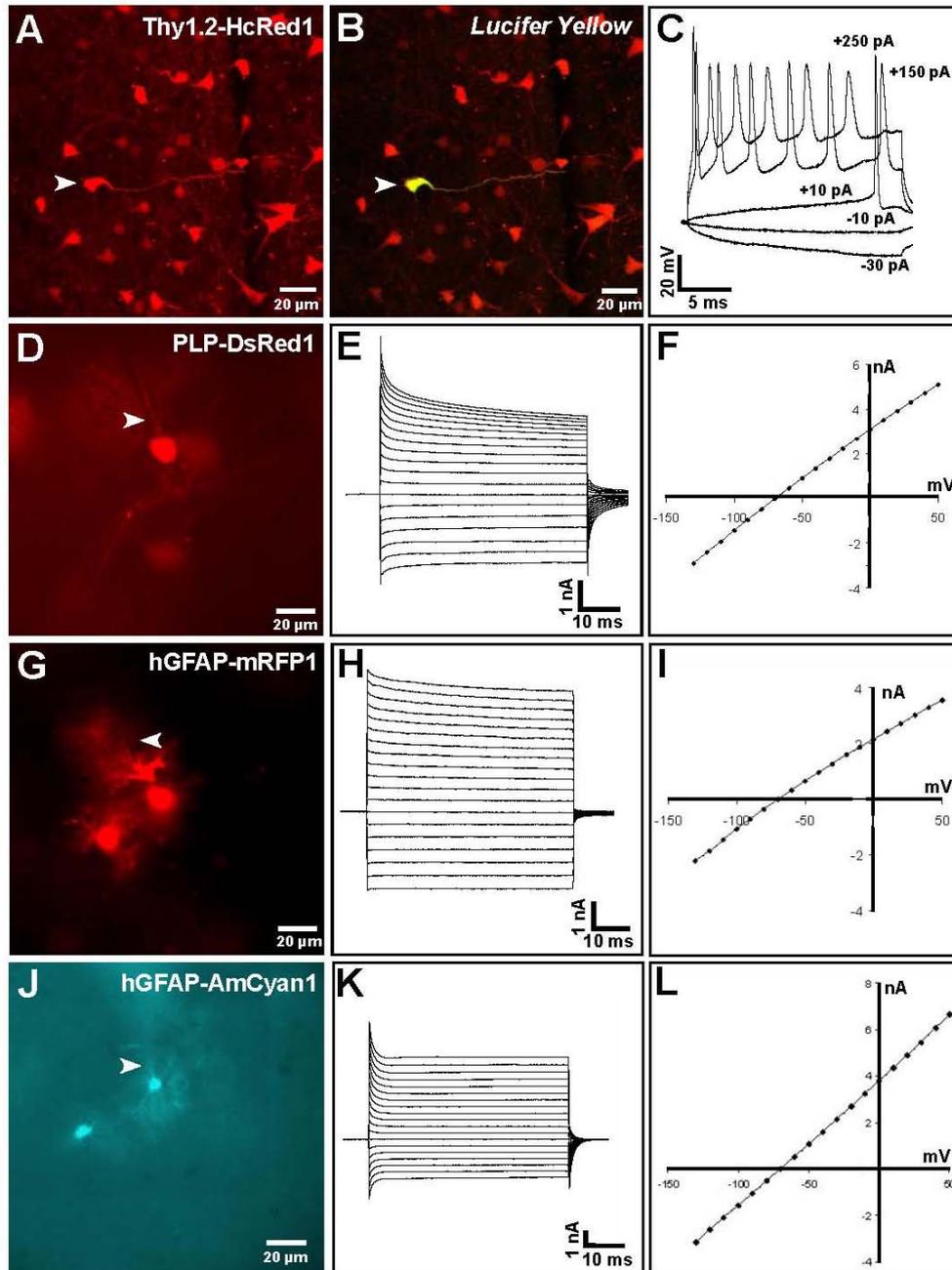


Abb. 22: Physiologische Untersuchungen von RCFP-exprimierenden Zellen. Die Expression von RCFPs führt nicht zu einer Änderung der physiologischen Eigenschaften der Zellen, wie *Patch-clamp*-Messungen zeigen. A – C: *Current-clamp*-Messung eines HcRed1-exprimierenden corticalen Pyramidenneurons (Postnataltag 16). A: Die CLSM-Aufnahme zeigt mehrere HcRed1-exprimierende Neurone. B: Eine Dialyse mit einer *Lucifer Yellow*-gefüllten Pipette hebt das untersuchte Neuron hervor (Pfeilspitze). Die Depolarisation des Neurons durch Injektionen von positiven Strömen induziert die Bildung von Aktionspotentialen. E, H, K: *Patch-clamp*-Analyse eines DsRed1-exprimierenden Oligodendrozyten am Postnataltag 6 (E) im *Voltage-clamp*-Modus. D, G, J: Aufnahme des epifluoreszenten Bildes mit Hilfe einer CCD-Kamera eines DsRed1-exprimierenden Oligodendrozyten (D), corticalen, mRFP1-exprimierenden Astrozyten (G) oder eines corticalen AmCyan1-exprimierenden Astrozyten (J). Die Pfeilspitze zeigt jeweils auf die *Patch*-Pipette. E, H, I: Eine Serie von hyper- und depolarisierenden Spannungssprüngen induziert ein symmetrisches Bild von fast nicht-rektifizierenden, Ein- und Auswärtsströmen. F, I, L: Die I/V-Kurve der hervorgerufenen Ströme zeigt, dass das Umkehrpotential sehr nahe am K^+ -Gleichgewichtspotential liegt und somit die Ruheleitfähigkeit der Membran hauptsächlich durch K^+ -Ionen verursacht wird.

5.2. Generierung und Analyse einer transgenen Mauslinie mit astroglialer induzierbarer Cre-Rekombinaseaktivität

Die Expression der Cre-Rekombinase unter der Kontrolle des GFAP-Promotors führt aufgrund der Aktivität dieses Promotors in embryonalen radialen Gliazellen neben einer Rekombination in Astrozyten ebenfalls zu einer Rekombination in Neuronen und in Oligodendrozyten (Casper und McCarthy, 2006; Garcia et al., 2004; Malatesta et al., 2003). Um die konstitutive Transgenaktivität der Cre-Rekombinase zu umgehen, wurde eine induzierbare Variante der Cre-Rekombinase verwendet. Diese wurde transgen in Astrozyten exprimiert. Im Falle der hier verwendeten Variante CreERT2 ist die Cre-Rekombinase fusioniert mit der mutierten Ligandenbindungsdomäne des humanen Estradiolrezeptors (ER, (Feil et al., 1997)). Dieses System wurde bereits erfolgreich eingesetzt, um eine induzierbare Cre-vermittelte Rekombination in Oligodendrozyten und Schwannzellen zu erreichen (Leone et al., 2003). Um eine astrogliale Tamoxifen-induzierbare Genrekombination zu erreichen, wurde eine transgene Mauslinie generiert, in der die Expression von CreERT2 unter der Kontrolle des humanen GFAP-Promotors (Brenner et al., 1994) steht. Dazu wurde die Stringenz des Systems zunächst in Zellkulturen untersucht. PC12-Zellen wurden mit einem Vektor, der für CreERT2 kodiert, und einem Reporterplasmid, das eine mit LoxP-Sequenzen flankierte STOP-Kassette vor dem ORF für EGFP beinhaltet, kotransfiziert. Es konnte nachgewiesen werden, dass eine Expression des Reportergens in vielen Zellen nur nach Inkubation mit OHT, aber nur in sehr wenigen Zellen nach einer Inkubation mit dem Lösungsmittel Ethanol erfolgte (Daten nicht gezeigt). Das verwendete CreERT2-System sollte daher auch *in vivo* stringent sein.

5.2.1. Klonierung von *pUniversal*, einem universell verwendbaren Transgenvektor

Um einen universell einsetzbaren, gut exprimierenden Transgenvektor verwenden zu können, bei dem ein schnelles Einbringen des Promotors und des ORFs des Interesses möglich ist, wurde ein Vektor konstruiert. Es wurde ein artifizielles Intron zur Stabilisierung der mRNA (bestehend aus einer adenoviralen *Splice*-Donor-Sequenz AGC TGT TGG G[^]GT GAG TAC TC, Position 472, und der *Splice*-Akzeptor-Sequenz CTC TCC ACA G[^]GT GTC CAC TC, Position 972, des Immunglobulin G (Choi et al., 1991; Huang und Gorman, 1990)) und eine eukaryontische

Polyadenylierungssequenz verwendet. Auf pBluescript SK⁺ basierend wurde dieser Transgenvektor kloniert, welcher zwei das Intron flankierende MCS enthält und von einer Polyadenylierungssequenz abgeschlossen wird (Abb. 23). Aus pBluescript SK⁺ wurde durch Restriktionsverdau in zwei Schritten die MCS entfernt. Dabei wurde der Vektor zunächst mit den Restriktionsenzymen *Bam*HI und *Sac*I geschnitten. In den geöffneten Vektor wurde die erste Hälfte der neuen MCS mit Hilfe der hybridisierten Oligonucleotide 4389 (5'-CAT TTA AAT CTA GAC TAG GAT ATC GCG GCC GCA CGC GTG GCG CGC CGC TAG CG-3') und 4390 (5'- GAT CCG CTA GCG GCG CGC CAC GCG TGC GGC CGC GAT ATC CTA GTC TAG ATT TAA ATG AGC T-3') eingebracht. Dieser Zwischenvektor pBS-*Sac*I-*Bam*HI wurde mit den Primern T7 und T3 sequenziert.

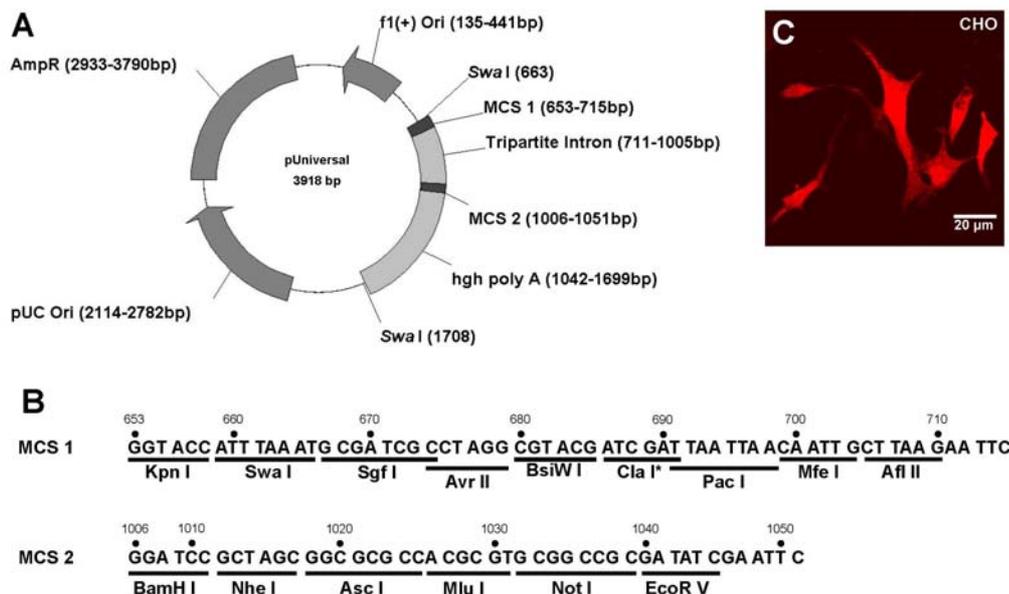


Abb. 23: Der neu generierte, universell einsetzbare Expressionsvektor pUniversal (A) enthält neben einem Intron und einer Polyadenylierungssequenz zwei MCS (B) zum schnellen Einbringen eines Promotors (MCS1) und eines ORFs (MCS2). C: Nach Klonierung des CMV-Promotors in MCS1 und AsRed2 in MCS2 und nachfolgender Transfektion in CHO-Zellen lässt sich eine starke rote Fluoreszenz im Zytoplasma der Zellen nachweisen.

Dieser Vektor wurde mit den Enzymen *Bam*HI und *Kpn*I geschnitten und mit den hybridisierten Oligonucleotiden 4391 (5'- GAT CCC GCC CGG AAT TCT TAA GCA ATT GTT AAT TAA TCG ATC GTA CGC CTA GGC GAT CGC ATT TAA ATG GTA C-3') und 4392 (5'- CAT TTA AAT GCG ATC GCC TAG GCG TAC GAT CGA TTA ATT AAC AAT TGC TTA AGA ATT CCG GGC GG-3') ligiert. Der Vektor wurde mit pBS-neueMCS bezeichnet. In diesen wurde über die Schnittstellen *Eco*RI und *Bam*HI das

300 bp grosse *Tripartite*-Intron eingebracht, welches über die korrespondierenden Schnittstellen aus pBS-Tripartite (Choi et al., 1991; Mayford et al., 1996) ausgeschnitten wurde. Dieser Vektor wurde als pBS-MCS-Intron bezeichnet. Nach Öffnen mit *EcoRV* und *XbaI* wurde die Polyadenylierungssequenz aus dem Gen des humanen Wachstumshormons (650 bp) mit den entsprechenden Schnittstellen aus dem Vektor pBS-hgh (Hirt et al., 1987) eingebracht. Der fertige Vektor wurde mit pUniversal (Abb. 23) bezeichnet. Die Kontrolle der Klonierung erfolgte durch Sequenzierung mit den Primern T7 und T3, sowie mit Primern 4670, 4671 und 4672.

5.2.1.1. Test auf Funktionalität von pUniversal

Zur Austestung der Funktionalität dieses neu generierten Vektors wurden der CMV-Promotor und der AsRed2-ORF in pUniversal kloniert und dieser Vektor in einem Transfektionsexperiment zur Expression gebracht. Dazu wurde der ORF von AsRed2 aus pAsRed2-N1 verwendet. Das 750 bp grosse *NheI/NotI*-Fragment aus pAsRed2-N1 wurde in die korrespondierenden Schnittstellen des pUniversal kloniert. Der entstandene Vektor wurde mit pUniv-AsRed bezeichnet. Der CMV-Promotor wurde aus pECFP-C1 über eine PCR mit den *Primern* 5635 und 5637 amplifiziert, wobei gleichzeitig über die *Primer* eine *AflI*- und eine *PacI*-Schnittstelle eingebracht wurden. Das PCR-Produkt wurde in pGEM-T subkloniert und mit *Primern* T7 und SP6 sequenziert. Der entstandene Vektor wurde mit pGEM T-CMV bezeichnet. Das 600 kb grosse *AflI/PacI*-Fragment aus pGEM T-CMV wurde in die korrespondierenden Schnittstellen von pUniv-AsRed2 eingebracht. Der entstandene Vektor wurde mit pCMV-AsRed bezeichnet und die Sequenz mit den *Primern* 4670, 4671 und 4672 überprüft. Der Vektor wurde in CHO-Zellen transfiziert und die Expression am konfokalen Mikroskop überprüft (Abb. 23 C). Es zeigte sich eine helle rote Fluoreszenz im Zytosol der transfizierten Zellen, der Vektor ist funktionell.

5.2.2. Klonierung des hGFAP-CreERT2-Transgenvektors

Zur Generierung des Transgenvektors zur astroglialen Expression von CreERT2, einem Fusionsprotein aus der mutierten Ligandenbindungsdomäne des humanen Estrogenrezeptors und der Cre-Rekombinase, wurde der Vektor pUniversal mit dem Restriktionsenzym *EcoRV* aufgeschnitten und die Enden dephosphoryliert. Der ORF von CreERT2 wurde über einen Restriktionsverdau mit *EcoRI* aus dem Vektor

pCreERT2 (Feil et al., 1997) erhalten, die Enden von Überhängen befreit und der erhaltene Vektor mit pUniv-CreERT2 bezeichnet. Das mit nicht-kohäsiven Enden versehene, den GFAP-Promoter enthaltene *Asel/Agel*-Fragment des pGEM-T-GFAP wurde in den ebenfalls mit nichtkohäsiven, dephosphorylierten Enden versehenen, *PacI*-geöffneten pUniv-CreERT2 kloniert. Der entstehende Vektor wurde mit pGFAP-CreERT2 bezeichnet, amplifiziert und mit den Primern T7 und T3, sowie mit Primern 4670, 4671 und 4672 sequenziert.

5.2.3. Pronukleusinjektionen und Etablierung transgener Mauslinien mit Expression von CreERT2 in Astrozyten

Aus drei Pronukleusinjektionen entstanden von 133 Jungtieren 43 PCR-positive, potentielle Stammtiere. Diese wurden mit Wildtypmäusen verpaart, die F1-Nachkommen in einem Alter von 10-21 Tagen getötet und die Gehirne präpariert. Die Gehirne wurden in Vorderhirn und den Bereich caudal vom Bregma geteilt und bei -80°C gelagert. Nach erfolgter Genotypisierung wurden die hinteren Hirnstücke, die erfahrungsgemäss eine stärkere Expression des hGFAP-Promotor-getriebenen Transgens zeigen, der PCR-positiven F1-Nachkommen homogenisiert und mit Hilfe einer *Western Blot*-Analyse auf Expression des Transgens getestet. Zwei der so untersuchten Linien TgN(hGFAP-CreERT2) (GCTF, Stammtier #77, Weibchen, Abb. 24 A und GCT11, Stammtier #48, Weibchen, Abb. 24 B) weisen eine spezifische Proteinbande bei ca. 74 kD auf, die in Wildtypmäusen oder anderen Linien der TgN(hGFAP-CreERT2) nicht zu erkennen ist. Aus diesen Stammtieren wurden transgene Linien etabliert, die Linie GCTF wurde eingehend charakterisiert.

5.2.4. Charakterisierung der Mauslinie TgN(hGFAP-CreERT2)-GCTF

Zur Analyse der Effektivität und Spezifität der CreERT2-Expression wurden Tiere der Linie GCTF ausserdem mit Reportermausen verpaart, bei denen die Cre-vermittelte Rekombination zur Aktivierung von Reportergenen führt.

Zur Charakterisierung wurden transgene Tiere mit Reportermauslinien verpaart. Es wurden Tiere verwendet, die im ROSA26-Locus eine mit LoxP-Sequenzen flankierte STOP-Kassette 5' vor dem ORF des Reportergens LacZ (Soriano, 1999) oder EYFP (Srinivas et al., 2001) tragen.

5.2.4.1. Transkription des Transgens im Gehirn von Mäusen mit astrozytenspezifischer Expression von CreERT2

Der Nachweis der mRNA von CreERT2 in verschiedenen Hirnbereichen transgener Mäuse der Linie GCTF wurde über eine Reverse Transkriptase-PCR geführt. Dazu wurden adulte Mäuse der Linie GCTF und GCTF x R26-EYFP, TgN(mPLP-CreERT2) als Positivkontrolle sowie R26-EYFP und Wildtypmäuse als Negativkontrolle verwendet. Aus Organhomogenaten dieser Tiere wurde Gesamt-RNA isoliert. Die RNA der Kontrolltiere und der Linie GCTF wurde aus Gesamthirn isoliert, die RNA der doppeltransgenen Tiere GCTF x R26-EYFP wurde aus Cortex, Hippocampus, Cerebellum, Rückenmark, Bulbus Olfactorius und Mittelhirn sowie aus Leber gewonnen.



Abb. 24: Expressionsanalyse von CreERT2 im Gehirn von transgenen Mäusen der Linien TgN(hGFAP-CreERT2)-GCTF und -GCT11. A: Western Blot-Analyse von Gesamthirnhomogenaten zweier Tiere der Linie GCTF (H1 und H2). Die Bande läuft auf gleicher Höhe von 74 kD wie die CreERT2-Bande, die in als Positivkontrolle verwendeten TgN(mPLP-CreERT2)-Mäusen detektiert wird (+). In Hirnhomogenaten von Wildtypmäusen (WT) kann mit dem verwendeten Antikörper gegen humanen Estrogenrezeptor α keine Bande nachgewiesen werden. GAPDH dient als Ladekontrolle. B: Western Blot-Analyse von Gesamthirnhomogenaten zweier Tiere der Linie GCT11 (H1 und H2). Die CreERT2-Bande läuft ebenfalls auf gleicher Höhe von 74 kD wie die in TgN(mPLP-CreERT2)-Mäusen detektierte (+). In Hirnhomogenaten von Wildtypmäusen (WT) kann keine Bande nachgewiesen werden. C: Reverse-Transkriptase-PCR zur Analyse der CreERT2-Transkription. Es wurden cDNAs von RNA-Proben verschiedener Mausgewebe (RY: Gesamthirn R26-EYFP Reportermaus; WT: Gesamthirn Wildtypmaus; H1, H2: Gesamthirn CreERT2-positive Maus 1 oder 2) hergestellt und eine PCR mit spezifischen Primern für CreERT2 durchgeführt. Alle anderen Proben waren von doppeltransgenen Mäusen der Linie CreERT2 x R26-EYFP (Cx: Cortex; Hc: Hippocampus; Cb: Cerebellum; Rm: Rückenmark; Bo: Bulbus olfactorius; Mh: Mittelhirn; L: Leber). Die Amplifikation eines Aktin-Transkriptes (237 bp) diente als Positivkontrolle. Die drei rechten Spuren zeigen eine PCR mit genomischer DNA aus Schwanzbiopsiematerial einer Wildtypmaus (WT) oder einer transgenen CreERT2-positiven (+) Maus.

Die RNA von allen Proben wurde in cDNA umgeschrieben und als Matrize für eine PCR eingesetzt. In dieser PCR wurde über spezifische *Primer* CreERT2 nachgewiesen. Die Proben der Linie GCTF und alle Proben aus Hirn der Linie GCTF x R26-EYFP zeigen eine Bande bei 397 kb (Abb. 24

C). In der Leber von Tieren der Linie GCTF x R26-EYFP konnte keine mRNA für CreERT2 nachgewiesen werden. Die Negativkontrollen zeigen keine Bande bei 397 bp. Als Kontrolle für die RNA-Aufreinigung wurde eine PCR mit spezifischen *Primern* für Actin durchgeführt. In allen Proben ausser der Wasserkontrolle ist diese Bande bei 237 kb nachweisbar.

5.2.4.2. Rekombination von Reportergenen nach Administration von Tamoxifen

Die Bindung von Tamoxifen an das CreERT2-Fusionsprotein führt zu einer Translokation in den Zellkern, dem Ort der Rekombination. Reporterlinien tragen eine mit LoxP-Sequenzen flankierte STOP-Kassette vor einem Reportergen. Nach Rekombination kann das Reportergen exprimiert werden. Um zu untersuchen, ob die Administration von Tamoxifen in doppeltransgenen Tieren der Linie GCTF x R26-EYFP oder -LacZ zur Expression von Reportergenen führt, wurde eine PCR mit spezifischen *Primern* für das rekombinierte (900 bp, *Primer 7212*, 5'-GGT TGA GGA CAA ACT CTT CGC und *Primer 7210*, 5'-CTC GTT GGG GTC TTT GCT CAG) und das nichtrekombinierte (480 bp, *Primer 7212* und *7211*, 5'-CTA CCC GCT TCC ATT GCT CAG) Allel des ROSA26-Locus auf der Ebene genomischer DNA durchgeführt. Dazu wurden doppeltransgene Tiere (GCTF x R26-EYFP) für acht aufeinanderfolgende Tage mit Tamoxifen oder mit Lösungsmittel allein i. p. induziert. Die Tiere wurden drei Tage nach Abschluss der Injektionen getötet und die verwendeten Organe präpariert. Genomische DNA von GCTF x R26-EYFP wurde aus Cortex, Hippocampus, Cerebellum, Rückenmark, Bulbus Olfactorius und Mittelhirn sowie aus Leber gewonnen. Zudem wurde DNA aus Gesamthirn und Schwanzspitzen der Linie Elongationsfaktor II α (EII α)-Cre x R26-EYFP als Kontrolle für das rekombinierte Allel verwendet. In dieser Linie wird die Cre-Rekombinase unter der Kontrolle des ubiquitär aktiven Promotors EII α exprimiert (Lakso et al., 1992), es kommt daher in allen Zellen zur Rekombination des Reportergens. DNA aus Schwanzspitzen der einfach transgenen Repotermäuse R26-EYFP diente als Kontrolle für das nichtrekombinierte Allel. Es konnte in allen untersuchten Hirnregionen induzierter, doppeltransgener Mäuse GCTF x R26-EYFP sowie in Hirn- und Schwanzspitzen von EII α -Cre x R26-EYFP das rekombinierte Allel nachgewiesen werden. Keine Rekombination zeigte sich in der Leber dieser Tiere (Abb. 25 A). In nur mit Lösungsmittel injizierten Tieren konnte in keinem Organ eine Bande für

das rekombinierte Allel detektiert werden (Abb. 25 A), sondern nur für das nichtrekombinierte Allel (Abb. 25 A).

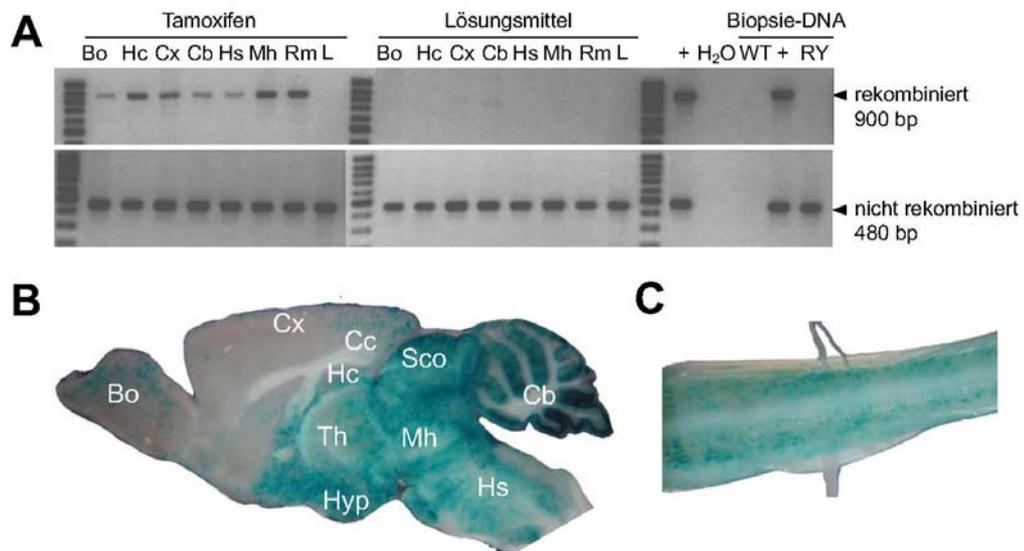


Abb. 25: CreERT2-vermittelte Rekombination von Reportergenen in doppeltransgenen Tieren der Linie TgN(hGFAP-CreERT2)-GCTF x R26-EYFP. A: Genomische DNA wurde aus verschiedenen Geweben von doppeltransgenen GCTF x R26-EYFP (Cx: Cortex; Hc: Hippocampus; Cb: Cerebellum; Rm: Rückenmark; Bo: Bulbus olfactorius; Mh: Mittelhirn; L: Leber) isoliert und mittels PCR auf die CreERT2-vermittelte Genrekombination getestet. Dabei wird die von LoxP-Sequenzen flankierte STOP-Kassette im ROSA26-Locus ausgeschnitten und die Rekombination des Reporterallels ermöglicht. Die Bande bei 900 bp im linken Teil der Abbildung zeigt eine Genrekombination in allen getesteten Hirnregionen von tamoxifenbehandelten Mäusen, nicht aber in der Leber. Das mittlere Teilstück zeigt, dass in nur mit Lösungsmittel injizierten Tieren keine Rekombination stattfindet. Das rechte Teilstück zeigt Kontrollen (+: PCR auf genomische DNA von Hirn oder Schwanzbiopsiematerial einer E11 α -Cre x R26-EYFP-Maus mit ubiquitärer Genrekombination; WT: Wildtyp; RY: R26-EYFP). B: Eine umfassende Genrekombination kann in doppeltransgenen GCTF x R26-LacZ-Mäusen detektiert werden. Die histochemische Analyse der β -Galaktosidaseaktivität eines 300 μ m dicken Sagittalschnittes einer adulten tamoxifeninduzierten Maus zeigt eine starke Blaufärbung in mehr kaudal gelegenen Hirnbereichen wie dem Cerebellum (Cb), Thalamus (Th), Hypothalamus (Hyp); Mittelhirn (Mh), Hirnstamm (Hs) oder Superior colliculus (Sco). Eine besonders geringe Blaufärbung kann im Cortex (Cx), Bulbus olfactorius (Bo), Hippocampus (Hc) oder Corpus callosum (Cc) beobachtet werden. C: Histochemische Analyse der β -Galaktosidaseaktivität eines 300 μ m dicken Vibratomschnittes eines lumbalen Segmentes des Rückenmarks. Es kann eine starke Blaufärbung beobachtet werden.

Der Umfang der tamoxifeninduzierten genetischen Rekombination kann mit Hilfe einer histochemischen Analyse der β -Galaktosidaseaktivität dargestellt werden. Dazu wurden doppeltransgene Tiere der Linie GCTF x R26-LacZ für fünf Tage zweimal täglich mit jeweils 1 mg Tamoxifen induziert, getötet und fixiert. Es wurden 300 μ m dicke Vibratomschnitte histochemisch auf β -Galaktosidaseaktivität analysiert. Es

kann in allen Hirnbereichen sowie im Rückenmark eine blaue Färbung nachgewiesen werden (Abb. 25 B). Die kaudalen Bereiche des Gehirns wie Cerebellum, Medulla, Pons, Mittelhirn, Thalamus, Hypothalamus sowie inferiorer und superiorer Colliculus zeigen eine deutlich stärkere Färbung als die frontalen Hirnbereiche. Im Cortex, Hippocampus und vor allem Striatum lässt sich nur eine geringe β -Galaktosidaseaktivität erkennen, wobei sich im Bulbus olfactorius die stärkste β -Galaktosidaseaktivität der frontalen Hirnbereiche befindet.

5.2.4.3. Zeitabhängigkeit der Rekombination nach Administration von Tamoxifen

Protokolle zur Administration von Tamoxifen wurden bereits beschrieben (Doerflinger et al., 2003; Leone et al., 2003). Um zu überprüfen, ob diese Protokolle auch für die astrozytär CreERT2-exprimierende Mauslinie GCTF eine vollständige Rekombination verursachen, wurden doppeltransgene Tiere der Linie GCTF x R26-EYFP und -LacZ mit jeweils 1 mg Tamoxifen pro Injektion injiziert. Ein Administrationsprotokoll von Tamoxifen, um eine vollständige Rekombination zu induzieren, ist in Abb. 26 dargestellt. Hier wurden Mäuse der Linie GCTF x R26-EYFP mit jeweils 1 mg Tamoxifen an acht aufeinanderfolgenden Tagen (Abb. 26 A, B) oder 100 μ l Lösungsmittel pro Tag injiziert. Die Tiere wurden 3 Tage nach Abschluss der Injektionen getötet und eine immunhistochemische Analyse der Gehirne vorgenommen. Es zeigt sich eine nahezu vollständige Anfärbung der Bergmann-Gliazellen (Abb. 26, A, B). Tiere, die nur mit Lösungsmittel injiziert wurden, wiesen nur sehr vereinzelt gefärbte Bergmann-Gliazellen (Abb. 26, C) auf. Es wurden doppeltransgene Mäuse der Linie GCTF x ROSA26-LacZ für drei oder fünf Tage zweimal täglich mit 1 mg Tamoxifen injiziert. Als Kontrolltier wurde eine weitere Maus für fünf Tage zweimal täglich mit 100 μ l Lösungsmittel injiziert. Die Tiere wurden drei Tage nach Abschluss der Injektionen getötet und LacZ-gefärbt. Es zeigte sich eine starke Blaufärbung bei fünf Injektionstagen, während die Blaufärbung bei drei Injektionstagen deutlich geringer war (Abb. 26 D). Im Gehirn von Tieren, die mit Lösungsmittel injiziert wurden, konnte keine Blaufärbung nachgewiesen werden. Es fand also in diesen keine mit dieser Methode nachweisbare Rekombination statt. Beide Injektionsprotokolle führen zu einer vollständigen Rekombination der CreERT2-exprimierenden Astrozyten.

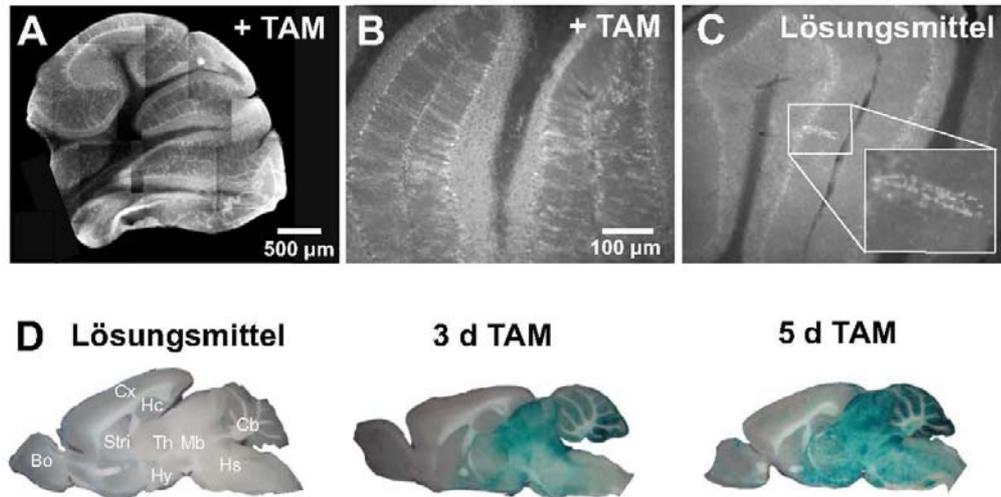


Abb. 26: Vergleich von Tamoxifen-Administrationsprotokollen bei adulten Mäusen der Linien TgN(hGFAP-CreERT2)-GCTF x R26-ECFP oder -LacZ. A, B: Die Behandlung von GCTF x ROSA26-EYFP doppeltransgenen Mäusen für acht Tage mit jeweils 1 mg Tamoxifen i. p. pro Tag führt zu einer nahezu vollständigen Rekombination in Bergmann-Glia, dem vorherrschenden astroglialen Zelltyp im Cerebellum. Das Reporterprotein EYFP wurde mit Hilfe einer immunhistochemischen Anfärbung mit Antikörpern gegen GFP detektiert. In Mäusen, die parallel nur mit dem Lösungsmittel injiziert wurden, können nur sehr wenige Zellen gefunden werden, die eine Rekombination durch eine Undichtigkeit des Systems zeigen. D: Schon nach drei Tagen mit zweimal täglichen Injektionen von je 1 mg Tamoxifen kann eine signifikante Genrekombination in GCTF x R26-LacZ doppeltransgenen Mäusen detektiert werden, wie eine histochemische Analyse der β -Galaktosidaseaktivität zeigt. Nach fünf Tagen mit diesem Behandlungsprotokoll wird eine vollständige Genrekombination beobachtet. Keine Genrekombination kann in Kontrollmäusen gezeigt werden, die nur mit dem Lösungsmittel injiziert wurden. TAM: Tamoxifen.

5.2.4.4. Immunhistochemische Analyse der rekombinierten Zellen im Gehirn von doppeltransgenen Mäusen TgN(hGFAP-CreERT2)-GCTF x R26-LacZ/EYFP

Um zu überprüfen, ob die Expression von CreERT2 spezifisch in Astrozyten erfolgt, wurden immunhistochemische Analysen durchgeführt. Dazu wurden doppeltransgene Tiere der Linie GCTF x R26-EYFP und -LacZ für fünf aufeinanderfolgende Tage zweimal täglich mit 1 mg Tamoxifen i. p. injiziert. Die Tiere wurden 3 – 21 Tage nach Ende der Injektionen transkardial fixiert und die Gehirne präpariert. Für die immunhistochemische Analyse wurden mit dem Vibratom 40 μ m Schnitte angefertigt und mit Primärantikörpern gegen zelltypspezifische Antigene und gegen die Reporterproteine EYFP und β -Galaktosidase doppelmarkiert.

Die Anfärbung von EYFP ist ubiquitär in der Zelle zu erkennen (Abb. 27 A, B, D, E), während β -Galaktosidase eine punktförmige Verteilung in der

Zelle aufweist (Abb. 27 C). Als spezifische Marker für Astrozyten wurden Antikörper gegen GFAP (Abb. 27 F) und gegen den von Astrozyten synthetisierten neurotrophen Faktor S100 β (Abb. 27 G, H), ein Protein der Ca²⁺-bindenden S100 Proteinfamilie (Donato, 2001), verwendet. Es konnten in allen Fällen doppeltgefärbte Zellen nachgewiesen werden. Nicht in allen Zellen, die eines der beiden Astrozytenmarkerproteine exprimieren, konnte jedoch das Reporterprotein nachgewiesen werden.

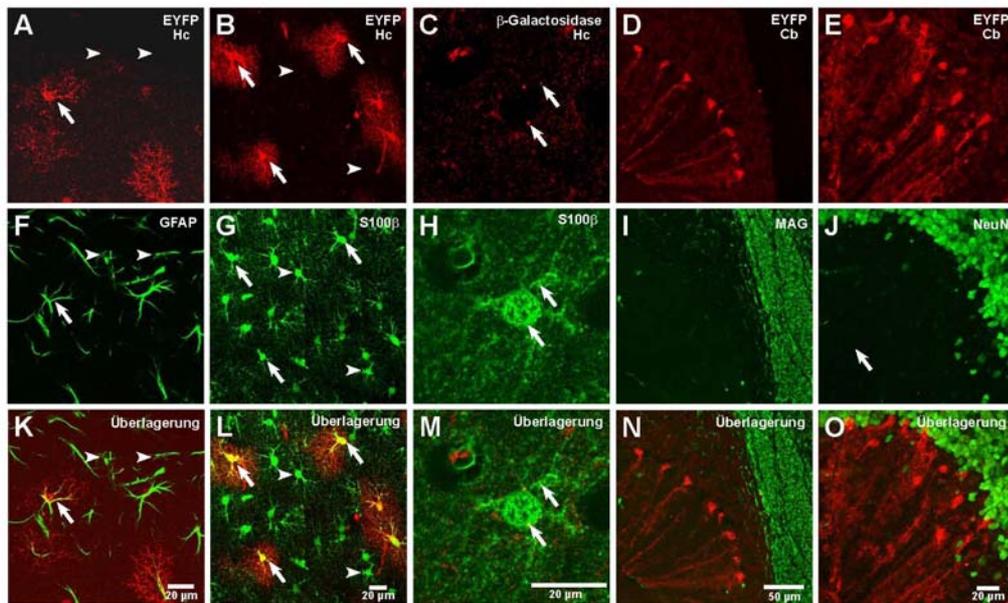


Abb. 27: Immunhistochemische Doppelanfärbung von rekombinierten Zellen mit Antikörpern gegen GFP und zelltypspezifische Marker. Nach Induktion der Genrekombination in GCTF x ROSA26-EYFP, bzw. -LacZ doppeltransgenen Mäusen wurde die Reporterexpression mittels Immunhistochemie analysiert. A, F, K: Im Hippocampus (Hc) kann der Reporter EYFP (visualisiert durch anti-GFP-Antikörper, A) nur in GFAP-positiven Zellen (F) nachgewiesen werden. B, G, L: Ungefähr ein Drittel der hippocampalen, S100 β -positiven Astrozyten (G) zeigen Genrekombination (Reporter EYFP, B). L: Überlagerung von B und G. C, H, M: Im Hippocampus (Hc) kann der Reporter LacZ (C. visualisiert durch anti- β -Galaktosidase-Antikörper, nur in S100 β -positiven Zellen (H) detektiert werden. D, I, N: Genrekombination kann nicht in Oligodendrozyten gezeigt werden. D: EYFP-exprimierende Bergmann-Glia. I: Expression des myelinassoziierten Glykoproteins (MAG). N: Überlagerung von D und I. E, J, O: Rekombination kann auch nicht in Neuronen gefunden werden. E: Expression des Reporterproteins EYFP in Bergmann-Glia. J: Expression des neuronalen Markerproteins NeuN in cerebellaren Körnerzellen. L: Überlagerung von E und J.

Um auszuschliessen, dass das Transgen noch in weiteren neuronalen Zellen ausser Astrozyten exprimiert wird, wurden immunhistochemische Doppelfärbungen mit Antikörpern gegen zelltypspezifische Markerproteine für Oligodendrozyten und Neurone sowie gegen das Reporterprotein EYFP (Abb. 27 D, E, I, J, N, O) durchgeführt. Als Markerprotein für Oligodendrozyten wurde myelinassoziiertes Glykoprotein (MAG, Abb. 27 I) und

für Neuronen der panneuronale Marker NeuN (Abb. 29 J) verwendet. Es konnten keine doppelgefärbten Zellen nachgewiesen werden (Abb. 27 N, O).

5.2.4.5. Quantifizierung der rekombinierten Astrozyten in verschiedenen Hirnbereichen von induzierten TgN(hGFAP-CreERT2)-GCTF x R26-EYFP

Um eine quantitative Aussage über die Anzahl der rekombinierten Astrozyten in verschiedenen Hirnbereichen der Linie GCTF x R26-EYFP zu treffen, wurden immunhistochemische Doppelmarkierungen von tamoxifeninduzierten Tieren durchgeführt. Es wurden Antikörper gegen das Reporterprotein EYFP sowie gegen das astrozytäre S100 β verwendet. Konfokale Bildstapel wurden aufgenommen und die S100 β -markierten sowie die doppelmarkierten Zellen in verschiedenen Hirnregionen ausgezählt (Abb. 28). Dabei wurden nur die S100 β -positiven

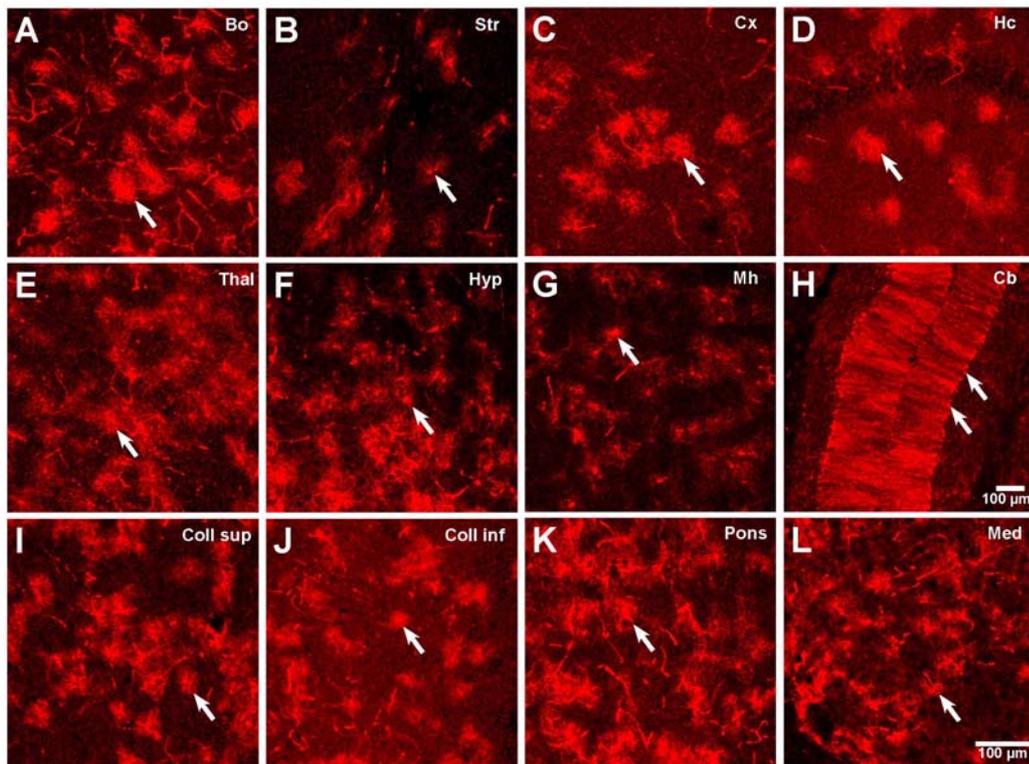


Abb. 28: Übersicht über die Expression des Reporterproteins EYFP nach CreERT2-vermittelter Genrekombination in verschiedenen Hirnbereichen doppeltransgener Mäuse der Linie TgN(hGFAP-CreERT2)-GCTF x R26-EYFP, visualisiert mit anti-GFP-Antikörpern. Die Zahl der rekombinierten Zellen variiert je nach Hirnareal (siehe auch Tab. 8). Eine sehr starke Rekombination kann im Cerebellum festgestellt werden. Hier sind nahezu alle Bergmann-Glia-Zellen rekombiniert. Bo: Bulbus olfactorius; Str: Striatum; Cx: Cortex; Hc: Hippocampus; Thal: Thalamus; Hyp: Hypothalamus; Mh: Mittelhirn; Cb: Cerebellum; Coll sup: Colliculus superior, Coll inf: Colliculus inferior; Med: Medulla.

Zellen als Astrozyten gewertet, die eine typisch astrogliale Morphologie aufwiesen. Da S100 β auch in Subpopulationen von Oligodendrozyten und Neuronen im Striatum und in der Medulla vorkommt (Hachem et al., 2005; Rickmann und Wolff, 1995a; Rickmann und Wolff, 1995b; Vives et al., 2003), kann es sein, dass die Zahl der rekombinierten Zellen leicht unterbewertet ist. Die Ergebnisse sind in Tabelle 9 zusammenfassend dargestellt. Dabei zeigte sich, dass die Rekombinationsrate in Bergmann-Gliazellen am höchsten ist (88%). Die geringste Rekombinationsrate wurde mit 12% im Striatum festgestellt. Einen Überblick über die Expression von EYFP in den verschiedenen Hirnbereichen nach Administration von Tamoxifen ist in Abb. 28 dargestellt.

Tab. 9: Quantifikation der Rekombinationsrate in Astrozyten verschiedener Hirnareale doppeltransgener Mäuse GCTF x R26-EYFP nach immunhistochemischer Doppelfärbung mit Antikörpern gegen EYFP und S100 β .

Hirnareal	analysierter Bereich [mm ²]	analysiertes Volumen [mm ³]	S100 β -positive Zellen	% EYFP-positive Zellen
Bulbus olfactorius	0,42	0,011	171	37
Striatum	0,42	0,008	196	12
Cortex	0,64	0,011	187	28
Hippocampus	0,85	0,017	483	32
Thalamus	0,42	0,008	171	49
Hypothalamus	0,42	0,007	196	52
superiorer Colliculus	0,42	0,007	148	43
inferiorer Colliculus	0,21	0,003	46	30
Mittelhirn	0,42	0,008	93	38
Pons	0,42	0,009	129	57
Medulla	0,21	0,004	49	41
Cerebellum (Bergmann-Glia)	2,55	0,086	391	88

5.2.4.6. Rekombination von Reportergenen nach Administration von Tamoxifen über die Muttermilch

Um zu überprüfen, ob eine Rekombination von Reportergenen auch in Jungtieren durch die Administration von Tamoxifen über die Muttermilch möglich ist, wurden weibliche Mäuse, angefangen am Tag des Wurfes, an acht aufeinanderfolgenden Tagen mit jeweils 1 mg Tamoxifen pro Tag injiziert.

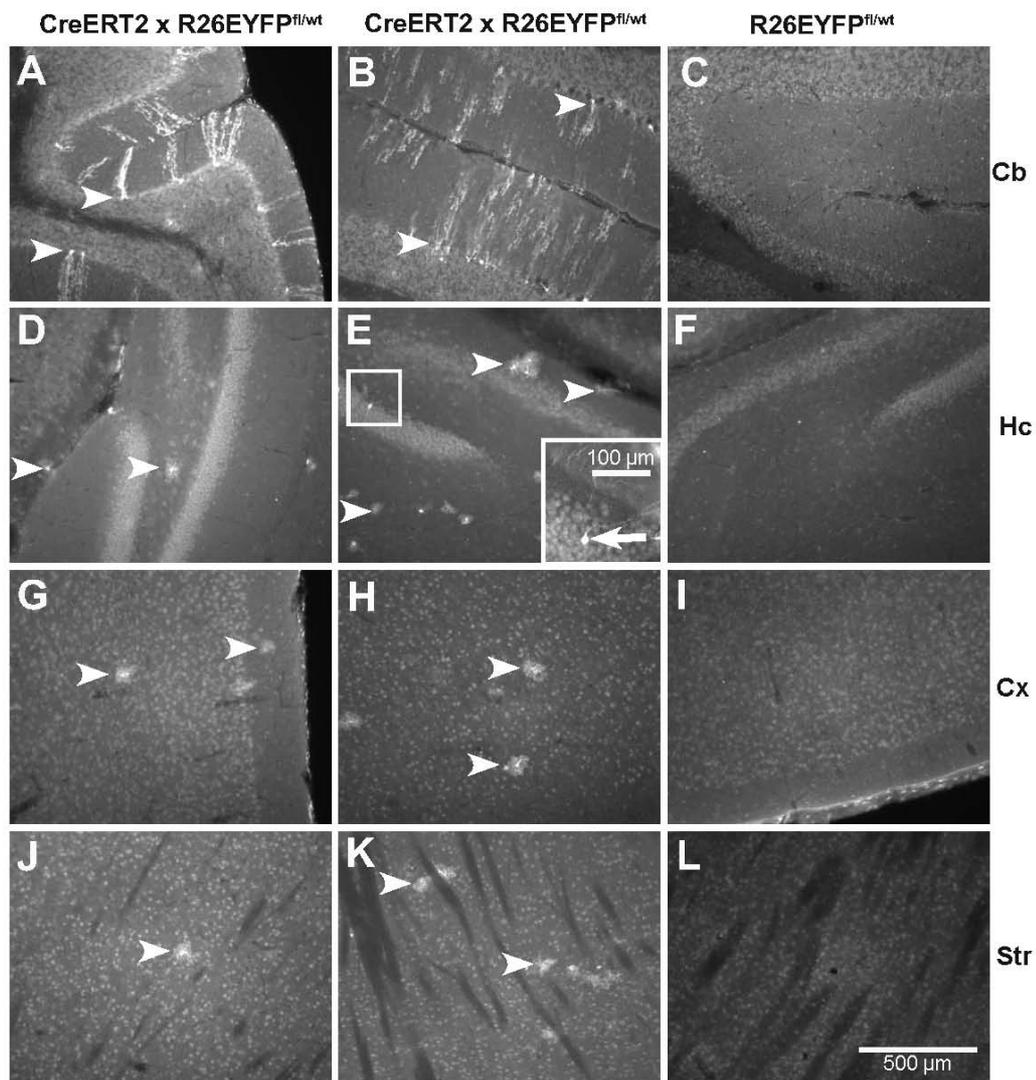


Abb. 29: Genrekombination in Tieren, die in der ersten postnatalen Woche Tamoxifen über die Muttermilch erhielten. Wenn die laktierende Mutter täglich mit 1 mg Tamoxifen i. p. pro Tag für acht Tage injiziert wurde, kann eine Genrekombination auch in Astrozyten der Jungtiere induziert werden. A, D, G, J: Jungtier #458, TgN(hGFAP-CreERT2)-GCTF x R26-EYFP; B, E, H, K: Jungtier #456, TgN(hGFAP-CreERT2)-GCTF x R26-EYFP. C, F, I: In TgN(hGFAP-CreERT2)-negativen, R26-EYFP Geschwistertieren kann keine CreERT2-vermittelte Reporter-genexpression nachgewiesen werden (Jungtier #457). A – C: Cerebellum; D – F: Hippocampus; G – I: Cortex; J – L: Striatum.

Die Nachkommen der injizierten Maus wurden nach dem Absetzen von der Mutter genotypisiert und für eine immunhistochemische Analyse vorbereitet. Es konnten mit Hilfe von Antikörpern gegen das Reporterprotein EYFP rekombinierte Zellen in allen wichtigen Hirnbereichen, wie Cerebellum, Hippocampus, Cortex und Striatum, nachgewiesen werden (Abb. 29). Dabei zeigte sich aber, dass im Vergleich zur intraperitonealen Administration von Tamoxifen eine deutlich geringere Anzahl von Astrozyten gefärbt war. Im Gyrus dentatus konnten einige rekombinierte Neuronen nachgewiesen werden (Einsatz in Abb. 29, F). Das ist nicht verwunderlich, da in diesem Areal zwischen Postnataltag 0 und 8 junge Neurone aus GFAP-positiven Vorläuferzellen geboren werden. Es konnten keine rekombinierten Zellen in Tieren nachgewiesen werden, die Wildtyp für CreERT2 waren (Abb. 29 C, F, I, L).

5.2.4.7. Analyse der Rekombination nach einer Stichverletzung im Cortex doppeltransgener Mäuse TgN(hGFAP-CreERT2)-GCTF x R26-LacZ

Um zu überprüfen, ob die Rekombination von Reportergenen im Bereich von Läsionen gesteigert wird, wurden doppeltransgenen Tieren der Linie GCTF x R26-LacZ corticale Stichverletzungen zugefügt. Astrozyten werden nach akuten Verletzungen des Gehirns aktiviert (Fawcett und Asher, 1999) und diese reaktiven Astrogliosen werden durch signifikante Erhöhung der Zellzahl und verstärkte Expression von GFAP nachgewiesen. Im rostralen Cortex gesunder Mäuse findet sich nur eine geringe CreERT2-mediierte Genrekombination, visualisiert durch eine schwache LacZ-Färbung dieser Region (Abb. 30). Es wurden gesunde, adulte Tiere GCTF x R26-LacZ anästhesiert und mit einer dünnen Nadel an zwei Positionen des Cortex (2 und 4 mm rostral des Bregmas) eine Stichverletzung platziert. Die Tiere wurden für fünf Tage zweimal täglich mit jeweils 1 mg Tamoxifen injiziert, beginnend einen Tag vor der Verletzung (Abb. 30 A). Entlang der Läsion konnte eine starke Steigerung der β -Galaktosidaseaktivität durch eine histochemische Analyse gezeigt werden (Abb. 30 B, C). Wie auch schon in Abb. 25 gezeigt, weisen mehr rostral gelegene corticale Regionen eine geringere Genrekombination auf als mehr caudal gelegene (Abb. 30 B, C). Allerdings scheint das Ausmass der Genrekombination aufgrund der Astrogliose in beiden Bereichen gleich zu sein (Abb. 30 B, C). Bei einer Applikation des Lösungsmittels kann keine Rekombination nachgewiesen werden (Abb. 30 D, E).

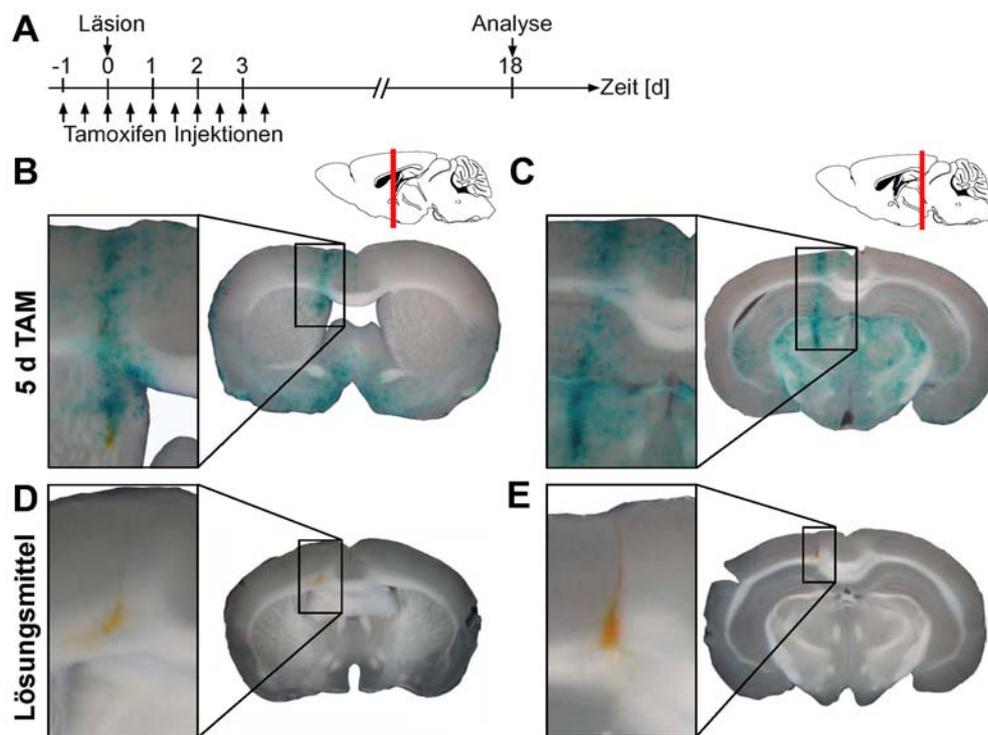


Abb. 30: Analyse der tamoxifeninduzierten Genrekombination in durch eine Stichverletzung aktivierten Astrozyten TgN(hGFAP-CreERT2)-GCTF x R26-LacZ doppeltransgener Mäuse, visualisiert durch histochemische Analyse der β -Galaktosidaseaktivität. A: Schema der Tamoxifeninjektionen und Analyse. Am Tag 0 wurde den Tieren eine corticale Stichverletzung durch eine dünne Nadel zugefügt. B, D: Frontale Vibratomschnitte ($300\ \mu\text{m}$) 4 mm frontal des Bregmas. Tamoxifen induziert eine starke Genrekombination entlang des Stichkanals. Man beachte die thalamischen und hypothalamischen Hirnregionen, in denen eine Genrekombination unabhängig von der Stichverletzung auftritt. D: Kontrolltiere, die nur mit dem Lösungsmittel injiziert wurden, zeigen keine Genrekombination. C, E: Wird die Läsion in einem mehr caudal gelegenen Bereich durchgeführt (2 mm frontal des Bregmas), kann nach Tamoxifenbehandlung ebenfalls ein starker Anstieg der Blaufärbung durch die Expression des Reportergens beobachtet werden. Man beachte, dass der Grad der läSIONSUNABHÄNGIGEN Genrekombination stärker ist als mehr rostral. E: Kontrolltiere, die nur mit dem Lösungsmittel induziert wurden, zeigen auch in mehr caudal gelegenen Hirnarealen keine Genrekombination.

5.2.4.8. Analyse der tamoxifeninduzierten Translokation von CreERT2 in astrogliareichen Primärkulturen aus TgN(hGFAP-CreERT2)-GCTF x R26-EYFP

Für manche Fragestellungen ist es wichtig, eine möglichst vollständige Genrekombination in Zellkultur nach Inkubation mit Tamoxifen zu erreichen. Zudem soll auch in Zellkultur die Rekombination nicht in Abwesenheit des Induktors stattfinden. Um zu überprüfen, in welchem Umfang tamoxifeninduzierbare Genrekombination *in vitro* verwendet werden kann, wurden astrogliareiche Primärkulturen aus doppeltransgenen Mäusen GCTF x R26-EYFP hergestellt. In diesen Kulturen sind ca.

ein Drittel (32,5 %) der Zellen transgen für CreERT2. Die Translokation von CreERT2 in den Nukleus kann direkt visualisiert werden (Abb. 31). In GFAP-positiven Astrogliazellen (Abb. 31 A, F, K, P), die mit Ethanol behandelt wurden, kann das transgene CreERT2-Protein hauptsächlich im Zytosol der Zellen gefunden werden (Abb. 31 B, D). Daraus folgend kann auch das Reporterprotein EYFP nur in wenigen Zellen (0,5 %) detektiert werden (Abb. 31 G, I). Wenn aber die Zellen für 48 h mit OHT inkubiert wurden, findet sich das CreERT2-Protein ausschliesslich in den Zellkernen (Abb. 31 L, N), der mit Hilfe von DAPI visualisiert wurde (Abb. 31 C, H, M, R). Die resultierende umfangreiche Genrekombination kann durch Immunfärbung der Zellen mit Antikörpern gegen EYFP nachgewiesen werden (Abb. 31 Q, S). Eine Inkubation mit OHT für 48 h führte nicht zu einer Änderung der Zellmorphologie oder der Zelldichte in astrogliareichen Primärkulturen (Abb. 31 E, J, O, T).

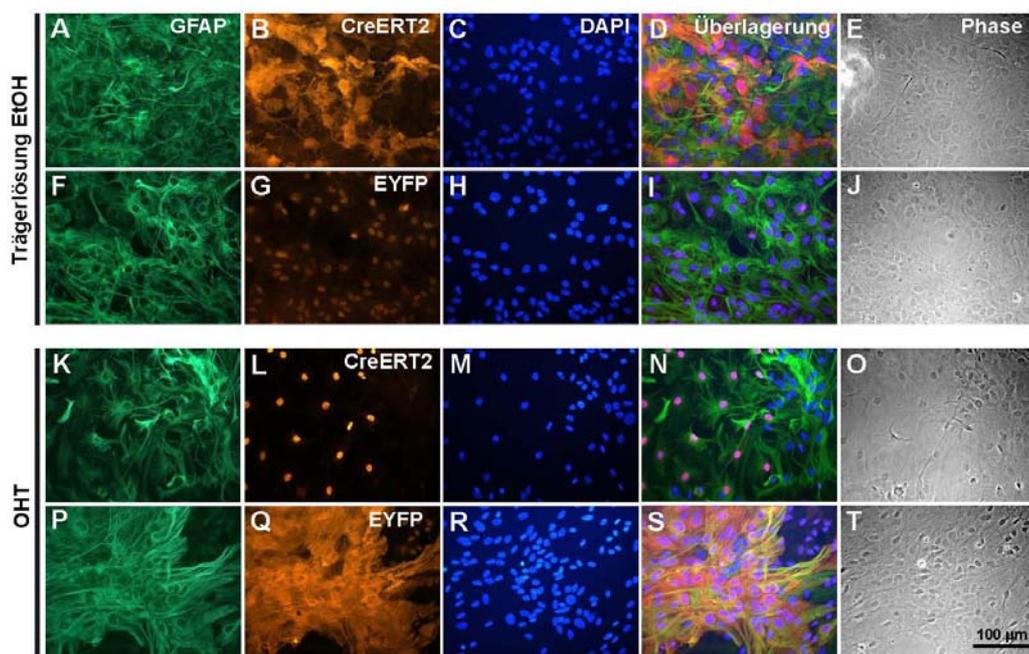


Abb. 31: Immunohistochemische Analyse der OHT-induzierten Genrekombination in astrogliareichen Primärkulturen von neugeborenen Mäusen GCTF x R26-EYFP. A – J: In ethanolbehandelten (Lösungsmittel) Astrogliazellen, identifiziert durch GFAP-Expression, A, F) ist das transgen exprimierte CreERT2, visualisiert durch anti-Cre-Antikörper (B), im Zytosol nachweisbar. Das Reporterprotein EYFP wird nicht exprimiert (detektiert durch anti-EYFP-Antikörper, G, I). Nach Inkubation der Zellen mit 1 µM OHT für 48 h (K - T) war das CreERT2-Protein in den Nukleus transloziert (L, N) und der Reporter EYFP stark induziert (Q). C, H, M und R: Korrespondierende DAPI-Färbungen zeigen die Gesamtzahl der Zellen innerhalb der analysierten Region sowie die Position der Nuklei an. E, J, O, T: Korrespondierende Phasenkontrastaufnahmen.

5.2.4.9. Vergleich der Rekombination mit dem Expressionsmuster von endogenem GFAP

Die Linie TgN(hGFAP-CreERT2)-GCTF zeigt eine kräftige Rekombination in caudalen Hirnarealen wie Cerebellum, Hirnstamm, Mittelhirn und Thalamus. Dieses Expressionsmuster spiegelt im Wesentlichen die endogene Expression von GFAP in adulten Tieren wider (Abb. 32). Die Areale im Vorderhirn wie Cortex, Hippocampus und Striatum sind nur wenig fluoreszent.

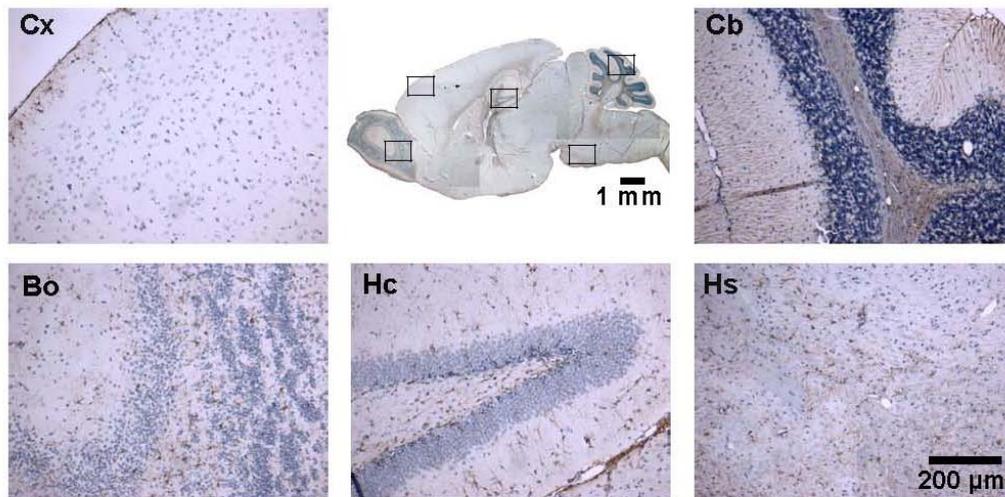


Abb. 32: Immunhistochemische Analyse der GFAP-Verteilung in Wildtypmäusen. Es wurden 5 µm dicke Paraffinschnitte immunhistochemisch mit Antikörpern gegen GFAP DAB-basiert gefärbt. Eine Braunfärbung weist auf positive Zellen hin. Zur besseren Übersichtlichkeit wurde eine Hämatoxylin-Gegenfärbung durchgeführt, die eine Blaufärbung der Kerne zur Folge hat. Eine starke Expression von GFAP im adulten Tier beschränkt sich vornehmlich auf die caudalen Hirnareale wie Cerebellum (Cb) oder Hirnstamm (Hs). Im Cortex (Cx) sind nur wenige GFAP-positive Astrozyten zu erkennen. Auch im Hippocampus (Hc) oder im Bulbus olfactorius (Bo) sind GFAP-positive Zellen zu sehen, allerdings deutlich weniger als im Hinterhirn.

5.3. Anwendungen der im Rahmen dieser Arbeit generierten transgenen Mauslinien

5.3.1. *Transgene Mauslinien mit Expression von FPs in neuronalen Zellen zur Analyse von Zell-Zell-Interaktionen*

Im Gehirn sind die verschiedenen Typen von Zellen räumlich kaum getrennt, zusätzlich bilden alle Zellen mehr oder weniger lange und feine Fortsätze aus, die eng zwischen Fortsätze anderer Zellen eingebettet sind. Dies erschwert häufig die Zuordnung einer Zelle zu einem bestimmten Zelltyp und macht die Zuordnung der feinen Fortsätze zu bestimmten Zellen fast unmöglich. In den hier generierten und

charakterisierten transgenen Mäusen können die unterschiedlichen Zelltypen des Gehirns aufgrund ihrer zelltypspezifischen Fluoreszenz leicht und eindeutig identifiziert werden. Diese Markierung kann dazu genutzt werden, um nach Identifizierung einer Zelle physiologische Untersuchungen wie *Patch-clamp*- oder Ca^{2+} -Messungen durchzuführen. Die weite spektrale Variabilität, die die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Mäuse aufweisen (vom blauen (ECFP, AmCyan1) bis zum roten Spektralbereich (mRFP1, HcRed1)) ermöglichen die Verwendung fast aller weiterer Fluoreszenzindikatoren wie z. B. grüner Ca^{2+} -Indikatoren (Oregon Green 488 Bapta oder Fura2), deren Fluoreszenz aufgrund der ähnlichen Emissionsspektren kaum von EGFP zu trennen ist.

Die nun vorhandene spektrale Vielfalt von fluoreszenzmarkierten Zellen im Gehirn lässt sich zur Markierung von verschiedenen Zellpopulationen und somit zur Analyse der strukturellen Interaktion dieser Zellen nutzen. Durch die gute Trennbarkeit der Spektren von ECFP und EYFP sind die im Rahmen dieser Arbeit generierten transgenen Linien hervorragend geeignet, um doppeltransgene Tiere mit FP-Expression in Astrozyten und Neuronen zu züchten. Diese Tiere können eingesetzt werden, um morphologische Untersuchungen der Neuron-Glia-Interaktion im lebenden Hirnschnitt (Hirrlinger et al., 2004) wie auch in der lebenden Maus (Nimmerjahn et al., 2005) zu beobachten, da beide FPs auch gut durch 2-Photonen-Laser (Titan/Saphir-Laser) anregbar sind. Erste Experimente wurden bereits durchgeführt und zeigten deutlich die enge Interaktion von Astrozyten mit benachbarten Neuronen (Abb. 33). Einige der hier untersuchten Mauslinien zeigen Expressionsmuster, die sie für spezielle Experimente sehr geeignet erscheinen lassen. So sind in der Linie TgN(hGFAP-ECFP)-GCFD im Cortex vor allem Astrozyten entlang von Kapillaren stark fluoreszent markiert. Die Endfüßchen der Astrozyten stehen in engem Kontakt mit Blutkapillaren. Es ist bekannt, dass Astrozyten benachbarte Neurone mit Nährstoffen versorgen, wobei Astrozyten wichtige Vermittler zwischen Neuronen und dem Blutkreislauf in den Hirnkapillaren sind. Astrozyten detektieren die Höhe der glutamatabhängigen synaptischen Aktivität und setzen ein Signal zur Gefässerweiterung der cerebralen Kapillaren frei (Takano et al., 2006; Zonta et al., 2003). Die TgN(hGFAP-ECFP)-Mäuse können daher ein ideales System darstellen, um die Verbindung der Astrozyten zu den Blutkapillaren weiter zu untersuchen. Daneben werden die in der vorliegenden Arbeit generierten fluoreszenten Mäuse bereits in einem

Kollaborationsprojekt mit Herrn Prof. Dr. Reichenbach, Leipzig, eingesetzt, um Gliazellen der Retina zu visualisieren.

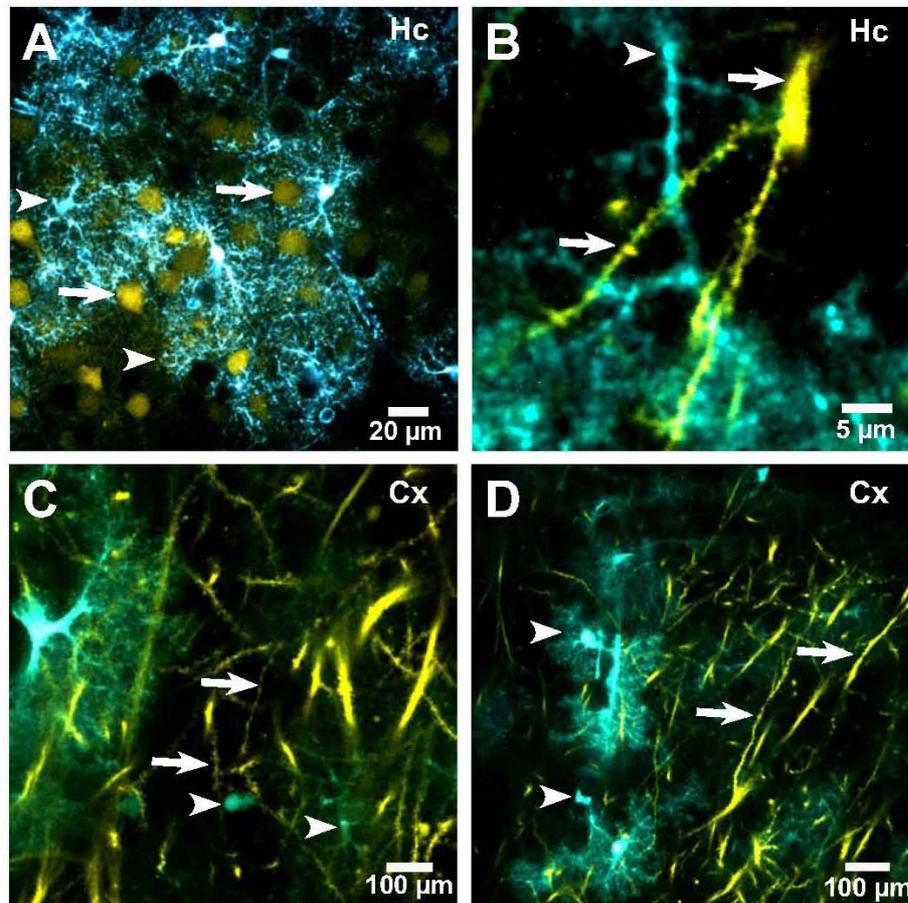


Abb. 33: 2-Photonen-Laserscan-Aufnahmen aus akut isolierten Hirnschnitten von doppeltransgenen Mäusen TgN(Thy1.2-EYFP) x TgN(hGFAP-ECFP). Die Neurone dieser Tiere sind gelb fluoreszent markiert (Pfeile), die Astrozyten blau fluoreszent (Pfeilspitzen). In der hippocampalen CA1-Region (A, B) wie auch im Cortex (C, D) lassen sich sowohl gelb fluoreszente Neurone wie blau fluoreszente Astrozyten erkennen.

Der Fokus der Analyse in der vorliegenden Arbeit wurde auf die ZNS-Expression des Transgens gelegt. Endogenes GFAP ist auch in Kupffer'schen Sternzellen der Leber und in enterischer Glia (Buniatian et al., 2001; Jessen und Mirsky, 1985), endogenes PLP ist auch in den Sertoli-Zellen der Testes vorhanden (Fuss et al., 2000). Weitere Untersuchungen müssen zeigen, ob auch diese Zellen in den generierten Mauslinien fluoreszenzmarkiert sind. Dann können die im Rahmen dieser Arbeit hergestellten transgenen Mauslinien neben der Untersuchung der Neuron-Glia-Interaktion auch in anderen Bereichen der Biologie von Interesse sein.

5.3.2. Anwendungsmöglichkeiten der TgN(hGFAP-CreERT2)-Mauslinie

Die Mauslinie TgN(hGFAP-CreERT2) erlaubt eine induzierbare, astroglia-spezifische Rekombination von Genen. In doppeltransgenen Nachkommen dieser Tiere, die mit Mauslinien mit LoxP-flankierten Genen verpaart wurden, können Genmodifikationen wie Deletionen und auch ektopische Induktionen zu jedem Zeitpunkt im Leben einer Maus spezifisch in Astrozyten induziert werden. Diese neue Mauslinie ist daher ein hervorragend geeignetes Werkzeug, um die Bedeutung eines in Astrozyten exprimierten Gens für die Hirnfunktion zu untersuchen. Durch die Induzierbarkeit der Rekombination kann die genetische Veränderung im adulten Tier eingeführt werden, so dass entwicklungsbedingte Defekte umgangen werden können. Daher kann insbesondere die Rolle der Zielgene für das Verhalten und die Physiologie der adulten Maus untersucht werden. In Kombination mit geeigneten Mauslinien mit LoxP-flankierten Transgenen können diese auch induzierbar exprimiert werden. So kann die adulte Funktion eines in Astrozyten überexprimierten Proteins analysiert werden. Die in der vorliegenden Arbeit generierte TgN(hGFAP-CreERT2) wird bereits in einer Reihe von Kollaborationsprojekten von anderen Arbeitsgruppen verwendet. Diese sind in Tab. 10 zusammengestellt.

Während Läsionen des Gehirns werden Astrozyten aktiviert (Fawcett und Asher, 1999), ebenso der hier verwendete hGFAP-Promotor (vorliegende Arbeit und Nolte et al., 2001). Die Mauslinie TgN(hGFAP-CreERT2) kann daher verwendet werden, um den funktionellen Beitrag von astroglialen Genen für Regenerationsprozesse im Gehirn zu untersuchen, in dem spezifisch zum Zeitpunkt der Läsion das LoxP-flankierte Zielgen in aktivierten Astrozyten im Bereich der Läsion ausgeschaltet wird. Erste Analysen wurden für die Glutamatrezeptoren GluRA und GluRD, sowie für die kleine GTPase Cdc42 durchgeführt.

AMPA-Rezeptoren vermitteln den Hauptteil der schnellen synaptischen Transmission im ZNS. Diese Rezeptoren werden durch Kombination von den Glutamatrezeptor-Untereinheiten GluRA bis GluRD gebildet (Borges und Dingledine, 1998). Das Expressionsmuster dieser Rezeptoren wird in der Literatur uneinheitlich beschrieben. Die Untereinheiten GluRA und GluRD des AMPA-Rezeptors sind in Bergmann-Gliazellen (Ripellino et al., 1998) nachgewiesen worden. In Purkinje-Neuronen und Körnerzellen

Tab. 10: Kollaborationen, in denen die hier generierten Mäuse der Linie TgN(hGFAP-CreERT2)-GCTF eingesetzt werden.

Labor / Ort	Zielgen / Zielprozess
Gesine Saher, Klaus-Armin Nave, Göttingen	Squalensynthase
Volker Eulenburg, Heinrich Betz, Frankfurt	Glycintransporter 1
Howard J. Federoff, Rochester, New York	Hypoxieinduzierbarer Faktor-1 α
Stan Krajewski, La Jolla, Kalifornien	CSS1/Calpain 1, 2; Caspase 8;- Survivin; β -Catenin; SHP2
Axel Nimmerjahn, Stanford, Kalifornien	Connexin 43; 30; 29
Andreas Reichenbach, Leipzig	EYFP; β -Galaktosidase
Melitta Schachner, Hamburg	Tenascin C
Peter Seeburg, Heidelberg	RNA-Editing

konnte eine Forschergruppe die mRNA der Untereinheiten GluRA und GluRB, nicht aber die von GluRC oder GluRD finden (Day et al., 1995). GluRA-D in Purkinje-Neuronen (Lambolez et al., 1992). Die AMPA-Rezeptoren der Bergmann-Gliazellen sind Ca²⁺-permeabel, da ihnen die GluRB-Untereinheit fehlt (Burnashev et al., 1992; Hollmann et al., 1991; Muller et al., 1992). Entfernung der Ca²⁺-Permeabilität durch Expression der GluRB-Untereinheit mit Hilfe von adenoviralen Vektoren führte zum Zurückziehen der glialen Fortsätze von der Synapse des Purkinje-Neurons (Iino et al., 2001) und damit zu einer Verzögerung der synaptischen Transmission und der Reinnervation von Purkinje-Neuronen mit weiteren Kletterfasern. AMPA-Rezeptoren sind auch wichtig für die Feinabstimmung der verstärkenden präsynaptischen Mechanismen, die für die Modulation der Glutamatausschüttung verantwortlich sind (Oliet et al., 2001). In Bergmann-Gliazellen ist eine aktivitätsabhängige Langzeitplastizität (*long term depression, LTD*) während der Stimulation der Parallelfasern nachgewiesen worden, die durch AMPA-Rezeptoren und Glutamattransporter vermittelt ist (Bellamy und Ogden, 2006). Dies

impliziert, dass ein korrekter Signalweg zwischen Neuron und Gliazelle für die Aufrechterhaltung der synaptischen Verbindung unabdingbar ist.

Es konnte gezeigt werden, dass GluRA (Abb. 34) und GluRD (Abb.35) nach Induktion der Cre-Rekombinase in Bergmann-Gliazellen nicht mehr oder nur noch zu einem sehr geringen Grad exprimiert wird, wenn das jeweilige Gen mit LoxP-Sequenzen flankiert ist. Beide Proteine werden aber weiterhin in Purkinje-Neuronen exprimiert. Dazu wurden doppel-, bzw. tripeltransgene Tiere und Kontrolltiere der Linie $\text{GluRD}^{\text{flox/flox}} \times \text{TgN(hGFAP-CreERT2)}$, bzw. $\text{GluRA}^{\text{flox/flox}} \times \text{TgN(hGFAP-CreERT2)} \times \text{R26-EYFP}$ mit Tamoxifen oder Öl/Ethanol injiziert. Weitere Untersuchungen sollen nun den physiologischen Effekt dieses astroglia-spezifischen *Knock-outs* zeigen.

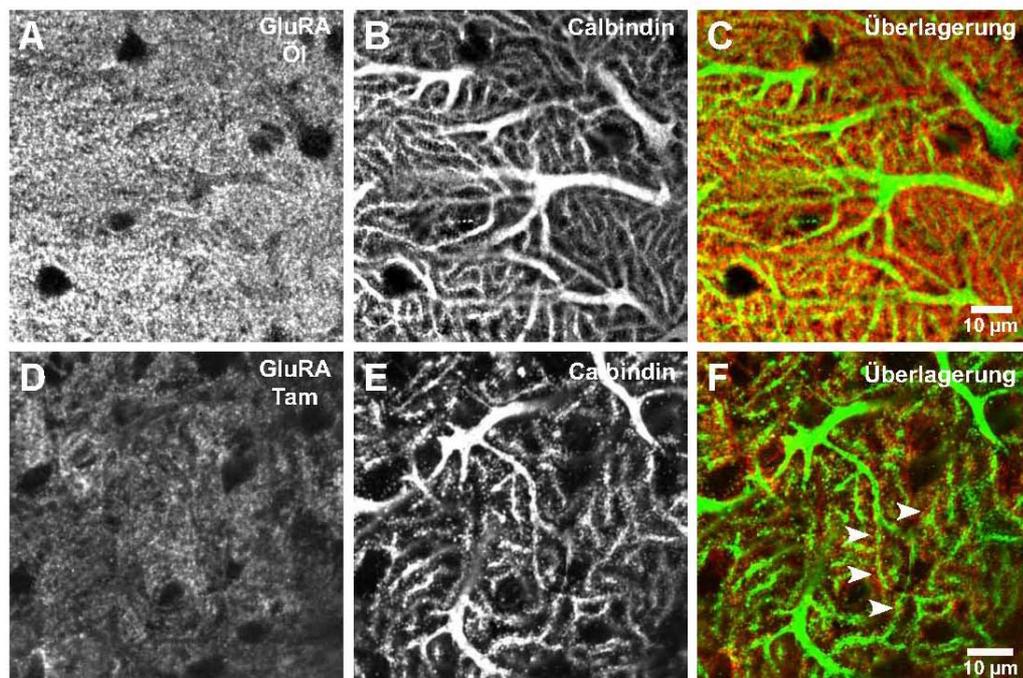


Abb. 34: Immunhistochemische Analyse von doppeltransgenen Tieren der Linie $\text{TgN(hGFAP-CreERT2)-GCTF}^+ \times \text{GluRA}^{\text{flox/flox}}$. Es wurden Tiere für fünf Tage mit Tamoxifen (D – F) sowie Kontrolltiere mit Öl/Ethanol (A – C) injiziert. Die Tiere wurden 14 Tage nach der letzten Injektion getötet. Die Expression von GluRA in der Molekularschicht nimmt nach Tamoxifeninduktion (D, F) im Vergleich zur Kontrolle (A, C) deutlich ab. Das verbleibende Signal (F, Pfeilspitzen) liegt direkt um die Calbindin-positiven Fortsätze (B, E) der Purkinje-Neuronen herum, vornehmlich auf den dendritischen *Spines*. Es kann davon ausgegangen werden, dass das Protein in Bergmann-Gliazellen nicht oder nur noch zu einem geringen Grad vorhanden ist. Gezeigt sind konfokale Laserscan-Aufnahmen einzelner optischer Ebenen (A – F).

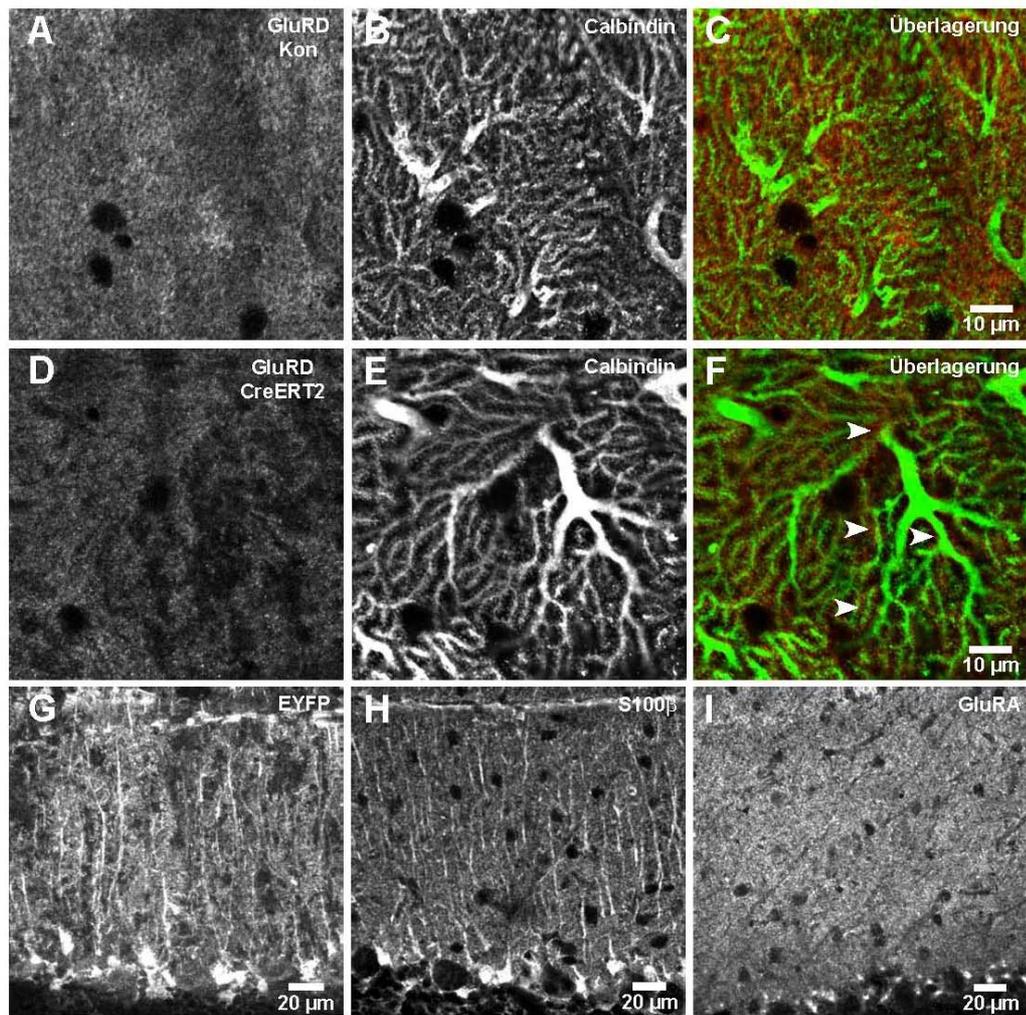


Abb. 35: Immunohistochemische Analyse von doppeltransgenen Tieren der Linie TgN(hGFAP-CreERT2)-GCTF⁺ x GluRD^{fllox/fllox} x R26EYFP^{+/-}. Es wurden homozygot geflochte, CreERT2-positive Tiere für fünf Tage (D – I) sowie homozygot geflochte, CreERT2-negative Kontrolltiere mit Tamoxifen (A – C) injiziert. Die Tiere wurden 14 Tage nach der letzten Injektion getötet. Es zeigt sich eine starke Reporterexpression in der Molekularschicht, die Bergmann-Gliazellen zugeordnet werden kann (EYFP, G), aber keine Änderung der Expression von S100β (H) und GluRA (I). Die Expression von GluRD in der Molekularschicht nimmt nach Tamoxifeninduktion (D, F) im Vergleich zur Kontrolle (A, C) deutlich ab. Das verbleibende Signal (F, Pfeilspitzen) liegt direkt um die Calbindin-positiven Fortsätze (B, E) der Purkinje-Neuronen herum. Es kann davon ausgegangen werden, dass das Protein in Bergmann-Gliazellen nicht oder nur noch zu einem geringen Grad vorhanden ist. Gezeigt sind Laserscan-Aufnahmen einzelner optischer Ebenen (A – F) oder Maximumintensitätsprojektionen von konfokalen Bildstapeln (G – I).

Der humane GFAP-Promotor ist auch in den radialen Gliazellen aktiv, sodass bei einer konstitutiven Expression der Cre-Rekombinase auch Neuronen und Oligodendrozyten rekombiniert sind (Casper und McCarthy, 2006; Malatesta et al., 2003). Daher muss der Zeitpunkt der Cre-Aktivität bestimmbar sein. Die schnelle Induktion der Genrekombination in TgN(hGFAP-CreERT2) innerhalb weniger Tage erlaubt die Analyse von

behandelten und Kontrolltieren mit einem sehr geringen Altersunterschied. Das ist besonders bei verschiedenen Lernparadigmen wichtig. In den letzten Jahren wurde der Beitrag von Astrozyten zur Modulation der synaptischen Transmission in verschiedenen Arbeiten gezeigt. Astrozyten exprimieren beispielsweise viele Neurotransmitterrezeptoren wie AMPA-Glutamatrezeptoren oder auch GABA-A-Rezeptoren. Die gleichen Rezeptoren sind auch in benachbarten Neuronen exprimiert. Daher war es mit der konventionellen *Knock-out*-Strategie nicht möglich, die Rolle der astroglialen Transmitterrezeptoren zu untersuchen. Die konstitutive genetische Inaktivierung solcher Rezeptoren führt oft zur Letalität im Embryonal-, bzw. im früh postnatalen Entwicklungsstadium. Tsien und Kollegen (Tsien et al., 1996) umgingen dieses Problem, indem sie die Strategie des konditionalen, also zum Beispiel den zelltypspezifischen und entwicklungsregulierten, *Knock-out* anwendeten. In ihrer Studie wurde die essentielle Untereinheit des NMDA-Rezeptors in Pyramidenneuronen der hippocampalen CA1-Region bei Beginn der dritten Postnatalwoche deletiert. Die Tiere waren lebensfähig, zeigten aber kein hippocampales LTP an Synapsen zwischen der CA3- und CA1-Region (Tsien et al., 1996). Mit der in dieser Arbeit generierten TgN(hGFAP-CreERT2)-Mauslinie ist jetzt ein Werkzeug verfügbar, mit dem die Deletion von astroglialen Transmitterrezeptoren, die ebenfalls in Neuronen gefunden werden, zeitlich kontrolliert werden kann. Die Analyse solcher Mäuse mit einer Kombination von Verhaltens-, elektrophysiologischen, bildgebenden und immunhistochemischen Methoden kann neue Erkenntnisse zum Beitrag von Astrozyten zur Hirnfunktion liefern.