

7. Zusammenfassung / Summary

Welche Rolle spielen Neuron-Glia-Interaktionen bei der Informationsprozessierung, beim Lernen und Gedächtnis im Gehirn? Viele wichtige Fragen im Bereich der Neuron-Glia-Interaktion können mit Hilfe der im Rahmen dieser Arbeit generierten und charakterisierten Mauslinien beantwortet werden.

In dieser Arbeit konnte nachgewiesen werden, dass verschiedene fluoreszente Proteine in unterschiedlichen neuronalen Zelltypen des Nervensystems als transgene Marker verwendet werden können. Da Varianten fluoreszenter Proteine aus Riffkorallen (RCFPs) sowie aus Quallen (GFP-Varianten) einen weiten Spektralbereich umfassen, sind diese Tiere hilfreich bei der Analyse von spezifischen Zelltypen, da sie miteinander sowie mit einer grossen Auswahl an Farbstoffen für funktionelle Bildgebung wie fluoreszente Ca^{2+} - oder Cl^- -Indikatoren kombiniert werden können. Die morphologische und physiologische Analyse dieser transgenen Zellen legte nahe, dass wichtige zelluläre Eigenschaften nicht beeinträchtigt und daher vergleichbar mit Wildtypzellen sind. Im Gegensatz zu den GFP-Varianten bilden alle untersuchten RCFPs zeit- und milieuhängig fluoreszente Aggregate in transgenen Mäusen. Diese Aggregate sind nicht toxisch für die Zellen, verringern aber den Nutzen dieser Tiere für morphologische Untersuchungen.

Induzierbare Genmodifikationen mit Hilfe des Cre/LoxP-Systems stellen ein wertvolles Werkzeug für die Analyse von Genfunktionen im aktiven Tier dar. Eine konstitutive Cre-Expression unter der Kontrolle des GFAP-Promotors führt neben der erwünschten Rekombination in Astrozyten auch zur Rekombination in neurogenen Vorläuferzellen, den embryonalen radialen Gliazellen. Um eine temporale Kontrolle der Genrekombination ausschliesslich in Astrozyten zu ermöglichen, wurde eine transgene Mauslinie hergestellt, die CreERT2 getrieben vom GFAP-Promotor exprimiert. CreERT2 ist ein Fusionsprotein zwischen der Cre-Rekombinase und der mutierten Ligandenbindungsdomäne des Estrogenrezeptors. In transgenen Nachkommen von Verpaarungen zwischen diesen TgN(hGFAP-CreERT2)-Mäusen und verschiedenen Cre-Reporterlinien lösten bereits wenige tägliche intraperitoneale Injektionen von Tamoxifen eine genomische Rekombination ausschliesslich in Astrozyten fast aller Hirnregionen aus. In Bergmann-Glia, die die Hauptgruppe der

Astrozyten des Cerebellums darstellt, wurde mit ca. 90 % eine nahezu vollständige Rekombinationsquote erreicht. Nach einer corticalen Stichverletzung induzierte die simultane Gabe von Tamoxifen eine beachtliche Rekombination in reaktiver Glia im Bereich um die Läsionsstelle herum. Transgene TgN(hGFAP-CreERT2)-Mäuse erlauben die funktionelle Analyse von LoxP-flankierten Genen in Astrozyten des postnatalen und adulten Gehirns.

Erste Experimente, in denen die im Rahmen dieser Arbeit generierten und charakterisierten Mauslinien Verwendung finden, wurden erfolgreich durchgeführt. Doppeltransgene Mäuse mit fluoreszent markierten Astrozyten und Neuronen wurden zur Untersuchung von morphologischen Interaktionen dieser beiden Zelltypen verwendet. Daneben wurden die Untereinheiten GluRA oder GluRD des AMPA-Rezeptors astroglia-spezifisch ausgeschaltet, wie durch immunhistochemische Analyse gezeigt werden konnte. In weiteren Experimenten kann nun mit Hilfe dieses *Knock-outs* die Funktion dieser astroglialen AMPA-Rezeptoren bei der synaptischen Transmission an der *Tripartite*-Synapse untersucht werden.

Diese neuen Mauslinien stellen damit wichtige Werkzeuge für die Untersuchung von Neuron-Glia-Interaktionen dar.

Summary

Which role do interactions between neurons and glial cells play in information processing, learning and memory in the brain? Many important questions in the field of neuron-glia interaction can be addressed using the transgenic mouse lines generated and characterized in this work.

In this work it could be shown that different fluorescent proteins can be used as transgenic markers in different neural cell types of the nervous system. Since variants of reef coral fluorescent proteins (RCFPs) as well as variants of green fluorescent protein from jelly fish (GFP) cover a wide spectral range, these animals allow the analysis of specific cell types and can in addition be combined with each other as well as with a large variety of dyes for functional imaging like fluorescent Ca^{2+} - or Cl^- -indicators. The morphological and physiological analysis of these transgenic cells suggested that important cellular characteristics are not impaired and identical to wild type cells. In contrast to GFP variants all examined RCFPs formed fluorescent aggregates in transgenic mice in a time- and

environment-dependent fashion. These aggregates are not toxic for the cells, however, they reduce the usefulness of these animals for morphological investigations.

Inducible gene modification using the Cre/LoxP system represents a valuable tool for the analysis of gene functions in the active animal. Besides the desired recombination in astrocytes, a constitutive expression of Cre recombinase under the control of the GFAP promoter leads to recombination in neurogenic cells, the embryonic radial glial cells. In order to achieve a temporal control of recombination exclusively in astrocytes, a transgenic mouse line was generated, which expresses CreERT2 under the control of the GFAP promoter. CreERT2 is a fusion protein of Cre recombinase and the mutated ligand binding domain of the estrogen receptor. In transgenic offspring from these TgN(hGFAP-CreERT2) mice and different Cre reporter lines daily intraperitoneal injections of tamoxifen caused a genomic recombination exclusively in astrocytes of nearly all brain regions. In Bergmann glial cells, which represent the main group of astrocytes in the cerebellum, nearly all cells showed successful recombination. After cortical stab wound lesions and simultaneous application of tamoxifen, a considerable recombination in reactive glia was induced within the lesion site. Transgenic TgN(hGFAP-CreERT2) mice permit the functional analysis of LoxP flanked genes in astrocytes of the postnatal and adult brain.

Initial experiments using the mouse lines generated and characterized in the context of this work were performed successfully. Double transgenic mice with fluorescently labeled astrocytes and neurons have been used to investigate the morphological interaction of these two cell types. In addition, the subunits GluRA and GluRD of the AMPA-type glutamate receptor have been knocked out specifically in astrocytes, which was confirmed by immunohistochemical analysis. In future experiments the role of astroglial AMPA-type glutamate receptors in modulating synaptic transmission at the tripartite synapse will be studied with the help of these mice.

In summary, these newly generated mouse lines will be of great value for studying neuron-glia interaction.