

Aus der Abteilung Neurogenetik
(Prof. Dr. rer. nat. K.-A. Nave)
des Max-Planck-Institutes für Experimentelle Medizin
in Göttingen

**Analyse transgener Mauslinien mit zelltypspezifischer Expression
fluoreszenter Proteine als Modelle für akute Hirntraumata**

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades

der Medizinischen Fakultät
der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

Christian Braun

aus Illingen

Göttingen 2010

DEKAN: Prof. Dr. med. C. Frömmel

I. Berichterstatter: PD Dr. med. S. Hülsmann

II. Berichterstatter/in: Flügel, Alexander, Prof.Dr.

III. Berichterstatter/in: Oppermann, Martin, Prof.Dr.

Tag der mündlichen Prüfung: 23.11.2010

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	1
1.1 Akute und chronische Hirnschädigung	1
1.1.1 Das akute Schädelhirntrauma (SHT) und seine Folgen.....	1
1.1.2 Chronische Läsionen des ZNS	2
1.2 Transgene Mausmodelle	5
1.2.1 Das transgene Mausmodell mit grün-fluoreszenten Astrozyten.....	5
1.2.2 Das transgene Mausmodell mit rot-fluoreszenten Oligodendrozyten	9
1.2.3 Das hGFAP-EGFP/PLP-DRed-doppeltransgene Mausmodell	11
1.3 Zielsetzung der Arbeit.....	12
2 Material und Methoden	13
2.1 Material	13
2.1.1 Chemikalien.....	13
2.1.2 Gebrauchswaren	13
2.1.3 Sterilisation	13
2.1.4 Enzyme.....	13
2.1.5 Verwendete Mauslinien	13
2.1.6 Antikörper	15
2.1.7 Wachstumsfaktoren.....	16
2.1.8 Zellkultur-Supplements	16
2.2 Methoden.....	16
2.2.1 Ganzkörperfixierung von Mäusen durch Perfusion.....	16
2.2.2 Herstellung von Vibratomschnitten	16
2.2.3 Standardprotokoll für die immunhistochemische Analyse von Vibratomschnitten (IHC).....	17
2.2.4 Abweichungen vom IHC-Standardprotokoll	17
2.2.5 Genotypisierung	18
2.2.6 Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	19
2.2.7 Konfokale Laserscan-Mikroskopie.....	19
2.2.8 Elektrophysiologie	20
2.2.9 Protokoll für Neurosphärenkultur	23
3 Resultate	25
3.1 Charakterisierung der PLP-DsRed-Maus	25
3.1.1 Analyse des zeitlichen Expressionsmusters	26

3.1.2 Analyse des Expressionsmusters auf zellulärer Ebene	28
3.1.3 Analyse des räumlichen Expressionsmusters	30
3.1.4 DsRed-exprimierende Oligodendrozyten exprimieren keine Marker anderer Zelllinien, jedoch den Oligodendrozytenmarker „zyklische Nukleotidphosphatase“	36
3.1.5 DsRed – Expression erlaubt die Darstellung der Fortsatzaus- sprossung	41
3.1.6 Patch-Clamp-Analyse in PLP-DsRed-exprimierenden Oligodendrozyten.....	42
3.2 Läsionsmodell in einer hGFAP-EGFP/PLP-DsRed-doppeltransgenen Maus..	43
3.2.1 Stichwunden führen zu einer verstärkten EGFP-Expression	43
3.2.2 Stichwunden führen zu einer verstärkten Expression von DsRed in Oligodendrozyten.....	45
3.2.3 Nach Induzierung von Stichläsionen treten hGFAP-EGFP/PLP- DsRed-doppeltransgene Zellen auf	47
3.2.3.1 Auftreten	47
3.2.3.2 Morphologie der hGFAP-EGFP/PLP-DsRed-doppeltransgenen Zellen.....	47
3.2.3.3 Immunhistochemische Charakterisierung.....	50
3.2.3.3.1 cD11b- (Mac-1)-Immunhistochemie schließt Phagozytose fluoreszenter Proteine durch Makrophagen aus	50
3.2.3.3.2 GFAP-Immunhistochemie zeigt Aktivierung endogenen GFAP's, jedoch nur geringe Kolo-kalisation mit dem hGFAP/EGFP-Transgen.....	52
3.2.3.3.3 Immunhistochemische Analyse der Expression von NG2 in hGFAP- EGFP/PLP-DsRed-doppeltransgenen Mäusen.....	54
3.2.3.3.4 Immunhistochemische Analyse zur Detektion von TUC4b	56
3.2.3.3.5 Analyse der Proliferationsrate mit Hilfe des Mitosemarkers Phosphohiston 3	57
3.2.3.3.6 Analyse der Proliferation mit Hilfe von Bromodesoxyuridin	59
3.2.3.4 Elektrophysiologische Analysen	61
3.2.3.5 Analyse der Expression des hGFAP-EGFP- und PLP-DsRed- Transgens in Neurosphärenkulturen.....	62
4 Diskussion	64
4.1 Charakterisierung der PLP-DsRed-Maus	64

4.2	Aktivierung einer distinkten Gliazellpopulation in einer PLP-DsRed/GFAP-EGFP-doppeltransgenen Maus	66
5	Zusammenfassung	71
6	Verzeichnisse	73
6.1	Abbildungen	73
6.2	Abkürzungen	74
6.3	Literaturverzeichnis	77

1 Einleitung

1.1 Akute und chronische Hirnschädigung

1.1.1 Das akute Schädelhirntrauma (SHT) und seine Folgen

Bei den Schädelhirntraumata wird zwischen solchen, die nur den knöchernen Schädel betreffen und solchen, die mit einer Funktions- und ggf. einer Substanzschädigung des Gehirns einhergehen, unterschieden. Erstere spielen im weiteren Kontext keine Rolle.

Es gibt eine Reihe von Einteilungsschemata für Schädelhirntraumata. Klassisch ist das in *Commotio cerebri* (Gehirnerschütterung) und *Contusio cerebri* (Gehirnquetschung). Diese Einteilung stammt aus einer Ära der Medizin, in der Schädelbildgebungen wie cerebrale Computertomographie (CCT) und cerebrale Kernspinnresonanztomographie (cMRT) noch nicht zur Verfügung standen, und setzt ein pathologisch-anatomisches Korrelat zu Anamnese und funktionellen Defiziten voraus.

Grob wird in der Neurologie das SHT in leichtes und schweres SHT untergliedert, was sich etwa mit den Begriffen *Hirntrauma mit Kommotiosyndrom* und *Hirntrauma mit Kontusiosyndrom* deckt.

Kommotiosyndrome zeichnen sich in erster Linie durch eine Bewusstlosigkeit von einer Minute bis einer Stunde aus, die unmittelbar nach dem Trauma einsetzt. Amnestische Syndrome sind fakultativ und treten auch ohne Bewusstlosigkeit ein.

Kontusiosyndrome zeichnen sich durch eine Bewusstlosigkeit aus, die länger als eine Stunde andauert. Sie sind regelmäßig mit zerebralen Herdsymptomen wie Lähmungen oder epileptischen Anfällen verbunden. In typischen Fällen weisen

Patienten mit Kontusionen bildgebend (CCT) ein pathologisch-anatomisches Korrelat in Form meist rindennah gelegener, hypodenser, mit blutisodensen Bezirken durchsetzter Läsionen auf.

1.1.2 Chronische Läsionen des ZNS

Chronischen Schädigungen des ZNS können eine Vielzahl von Ätiologien zugrunde liegen.

In der vorgelegten Arbeit wurden mechanische Läsionen im Sinne einer Pfählungsverletzung, eines schweren SHT also, verursacht.

Deshalb soll diese kurze Einführung sich auf die chronischen Folgen solcher Läsionen fokussieren.

Akute, mechanische Hirnverletzungen führen durch Einschränkungen der cerebralen Perfusion, durch Schädigung der Bluthirnschranke, aber auch durch exzitatorische Toxizität zu chronischen Folgen. Es kommt zum Verlust von Neuronen (Chirumamilla et al. 2002) und dadurch bedingt zu lokalisationsbezogenen Syndromen wie chronischen Schmerzsyndromen (Nampiarampil 2008) und kognitiven Einschränkungen (Gorman et al. 1993), aber auch zur Entwicklung symptomatischer Epilepsien (Avramescu und Timofeev 2008).

Das initial in der Ratte entdeckte Chondroitinsulfatproteoglykan NG2 (Stallcup 1981), das in der Maus unabhängig davon als AN2 charakterisiert wurde (Niehaus et al. 1999), wird sowohl während Entwicklungsstadien als auch im adulten ZNS exprimiert. Es findet sich gehäuft auf Zellen von astrozytärem Phänotyp nach Induktion von Läsionen (Dehn et al. 2006; Glass et al. 2005).

Es wurde in Menschen auch als Melanom-Chondroitinsulfatproteoglykan (MCSP) identifiziert (Pluschke et al. 1996). Es ist *in vitro* ein Marker unreifer Oligodendrozyten

(Levine und Nishiyama 1996). *In-vivo*-Expression in der Maus beginnt am Embryonaltag (E) 13/14 und erreicht ihr Maximum um den achten bis zwölften Postnataltag (P). Danach fällt sie langsam ab. Es bleibt aber im adulten Gehirn eine heterogene Subpopulation NG2-positiver Zellen bestehen. Darüber hinaus wird NG2 von unreifen Schwannzellen und fibroblastenartigen Zellen im PNS exprimiert sowie von hauptsächlich unreifen Zellen und extraneuronalem Gewebe wie wachsendem Knorpel, unreifer glatter Muskulatur, Skelettmuskulaturmyoblasten und epidermalen Stammzellen (Jones et al. 2002). *In vitro* verhalten sich NG2-Zellen, die aus früh postnatalem Hirngewebe isoliert werden, wie *Oligodendrozyten-Typ2-Astrozyten* (*O2A-Zellen*) (Baracskaý et al. 2007; Raff et al. 1983), d.h. sie differenzieren sich in Gegenwart von fötalem Kälberserum (FBS) in Astrozyten, in serumfreiem Medium dagegen hauptsächlich in Oligodendrozyten (Diers-Fenger et al. 2001). *In vivo* exprimieren NG2-Zellen *platelet-derived-growth-factor-receptor- α* (*PDGF α*) (Wilson et al. 2006). Wendy Macklin und ihre Gruppe konnten zeigen, dass nur ein Teil dieser putativen Oligodendrozytenvorläufer unter *in-vivo*-Bedingungen Myelin bildet (Mallon et al. 2002). In den vergangenen Jahren wurde zunehmend deutlich, dass NG2-Zellen pluripotente neurale Vorläuferzellen darstellen. Sie exprimieren den Transkriptionsfaktor *Olig2* *in vivo* (Liu und Rao 2004). Es wurde berichtet, dass sich NG2 - positive Zellen im Hippokampus in Zellen differenzieren, die neuronale Marker wie *Neu-N* und *β III-Tubulin* exprimieren, wie auch in (γ -Aminobuttersäure) GABAerge Interneurone (Aguirre et al. 2004). In die anhaltende Debatte über die Existenz neuraler Vorläuferzellen im adulten Kortex haben sich Dayer und seine Kollegen eingeschaltet. Sie konnten belegen, dass eine kleine Population NG2 - positiver Zellen im Kortex adulter Ratten Interneurone bilden kann (Dayer et al. 2005).

Im adulten Gehirn gibt es auch nach Vollendung der Gliogenese noch eine bedeutende Menge NG2 - positiver Zellen (Nishiyama 2007). Diese können morphologisch in zwei Klassen eingeteilt werden: Die eine entspricht protoplasmatischen Astrozyten, die andere hat eine sternförmige Morphologie ähnlich einer Mikrogliazelle (Horner et al. 2002). Ein Teil dieser Zellen teilt sich im adulten ZNS weiter und erfüllt damit die Rolle einer Vorläuferzelle. Zellen dieser Morphologie konnten in der vorgelegten Studie gefunden werden. Diese Zellen haben den Antigenphänotyp eines Oligodendrozytenvorläufers, aber die Morphologie eines Astrozyten. Darüber hinaus werden NG2 - positive Zellen häufig im Kontakt mit Neuronen gefunden. Unter anderem hüllen ihre Fortsätze in Kortex und Hippokampus Synapsen ein, bzw. können auch zwischen synaptischen Kontakten gefunden werden. Arthur Butt charakterisierte diese Zellen als *Synantocytes* (Butt et al. 2002b; Ong und Levine 1999). Im Hippokampus bilden diese Zellen glutamaterge und GABAerge Synapsen mit Neuronen (Bergles et al. 2000; Lin und Bergles 2002). Es wird vermutet, dass NG2 in diesen Synapsen der Modulation der synaptischen Aktivität dient (Stegmüller et al. 2003). In der weißen Substanz kontaktieren NG2 - positive Zellen auch Ranviersche Schnürringe (Butt et al. 2002a).

1.2 Transgene Mausmodelle

Transgene Mausmodelle, in denen die zelltypspezifische Aktivität einzelner Promotoren für die Identifizierung von Zellen durch fluoreszente Proteine genutzt wird, gibt es inzwischen viele. Der Vorteil ihrer Anwendung liegt in ihrer Vielseitigkeit: Sie können sowohl zur histologischen und zytologischen Analyse wie auch zum *Live-Time-Imaging* und für *elektrophysiologische Studien* benutzt werden.

Grundlegend hierfür ist die Erfüllung von drei wesentlichen Voraussetzungen: (1.) Die verwendeten fluoreszenten Proteine dürfen nicht zytotoxisch sein, sie dürfen (2.) die zu untersuchende physiologische Eigenschaft des untersuchten Zelltyps nicht beeinflussen, sie müssen (3.) lange genug detektierbar sein (Tsien 2009).

1.2.1 Das transgene Mausmodell mit grün-fluoreszenten Astrozyten

Das saure Gliafaserprotein (GFAP) repräsentiert den größten Teil der Intermediärfilamente in reifen Astrozyten. Neben dem Zentralen Nervensystem (ZNS) wird es auch im Peripheren Nervensystem (PNS) in Schwannzellen so wie in enterischer Glia exprimiert (Jessen und Mirsky 1985; Jessen et al. 1990). Obwohl nicht in allen Astrozyten exprimiert, ist GFAP der am meisten verwendete Astrozytenmarker (Nolte et al. 2001). Die Expression von GFAP wird im Rahmen der Reaktionskaskaden auf Verletzungen des Gehirns stark erhöht (Nolte et al. 2001; Vijayan et al. 1990).

Der GFAP-Promotor ist einer der am intensivsten studierten Promotoren überhaupt (Besnard et al. 1991). Zahlreiche transgene Mausmodelle wurden unter Anwendung verschiedener Reportersysteme oder anderer Gene unter seiner Kontrolle geschaffen (Brenner und Messing 1996; Galou et al. 1994; Lee et al. 2006; Leoni et al. 2009; Milanese et al. 2009; Su et al. 2004; Zhou und Kimmelberg 2001).

Mutationen des GFAP-Gens haben Bedeutung für die Entstehung humaner, neurologischer Erkrankungen.

Die Bedeutung von Mutationen im GFAP-Gen in der Pathogenese des *Morbus Alexander* zum Beispiel, einer heterogenen Gruppe degenerativer Erkrankungen des ZNS, die sich durch pathologische intrazelluläre Aggregate sogenannter Rosenthalfasern auszeichnet, die GFAP enthalten, wurde in den letzten Jahren intensivst untersucht (Brenner et al. 2001; Liem und Messing 2009; Messing et al. 2001; Rodriguez et al. 2001).

Die Verwendung immunhistochemischer Methoden zur Erforschung GFAP-exprimierender Zellen ist limitiert, da sie nur an permeabilisierten Tieren, toten Zellen also, durchgeführt werden kann. Experimente zur Erforschung der Zellphysiologie können so nur in zwei Schritten durchgeführt werden: Zuerst muss der an *in-vivo*-Bedingungen gebundene Teil der Untersuchung ohne große Zelltypspezifität durchgeführt werden, dann kann im zweiten Schritt *immunhistochemisch* überprüft werden, ob man auch wirklich mit dem Zelltyp gearbeitet hat, nach dem man gesucht hat.

Dieses Problem konnte durch die Entwicklung von Mausmodellen, in denen fluoreszente Proteine unter der Kontrolle des GFAP-Promotors als Transgen exprimiert wurden, gelöst werden.

In der vorliegenden Studie wurde ein solches transgenes Mausmodell benutzt. Ein 2.2 kb DNA-Fragment der humanen GFAP-Promotorsequenz (Besnard et al. 1991; Brenner 1994; Masood et al. 1993) wurde aus einem pCAT/GFAP-Plasmid gewonnen und in einen kommerziell erhältlichen EGFP-Vektor (pEGFP-1, Clontech, Heidelberg, Deutschland) hineinkloniert. Heterozygote Nachkommen transgener Elterntiere zeigten eine stabile EGFP-Expression in Astrozyten aller Hirnregionen,

die mit Hilfe konventioneller Fluoreszenzmikroskopie sichtbar gemacht werden konnte (Nolte et al. 2001).

EGFP (*Enhanced Green Fluorescent Protein*) gehört zur Gruppe der GFP-ähnlichen Proteine, deren erstes das Grüne Fluoreszente Protein (GFP) selbst war (Tsien 1998; Tsien 2009; Zimmer 2009). Alle seine Homologe bestehen aus einem kleinen, kompakten β -Faltblattfaß, das spontan sein eigenes Fluorophor bildet (Ormo et al. 1996; Yang et al. 1996). Ihre Emissionsspektren reichen von 442 bis 645 nm. Sie entstehen im Inneren des Proteins durch kovalente Modifikation dreier Aminosäurereste, die Teil der Polypeptidkette sind (Wachter 2006b).

GFP selbst wurde zuerst von Shimomura und Kollegen in der Qualle *Aequorea Victoria* gefunden (Cody et al. 1993; Shimomura 2009) (Abb. 1, A und B). Das Fluorophor ist vollständig in der Aminosäuresequenz kodiert. Es wird autokatalytisch durch eine Zyklisierungsreaktion zwischen den Aminosäureresten Ser65 und Gly67 gebildet, wodurch ein Imidazolin-5-on entsteht. Dieses wird durch molekularen Sauerstoff an der C α -C β -Brücke von Tyr66 oxidiert, wodurch das reife Fluorophor entsteht (Abb. 1 C). Diese Chemie erzeugt ein konjugiertes Resonanz- π -System (Wall et al. 2000).

In jüngerer Vergangenheit wurden eine Anzahl GFP-ähnlicher Proteine mit geringer Sequenzhomologie aus verschiedenen, riffbildenden Korallen isoliert. Diese haben Emissionsspektren von grün (Lukyanov et al. 2006) über gelb (Yampolsky et al. 2009) bis rot (Gurskaya et al. 2006). Seitdem haben fluoreszente Proteine die Zellbiologie beinahe revolutioniert. Eine enorme Bandbreite an Anwendungen vor allem in Kombination mit hochsensitiver Mikroskopie hat sich in den letzten Jahren ergeben und zu einer großen Zahl von Publikationen innerhalb kürzester Zeit geführt (Day und Davidson 2009; Snapp et al. 2003; Hirrlinger PG et al. 2005).

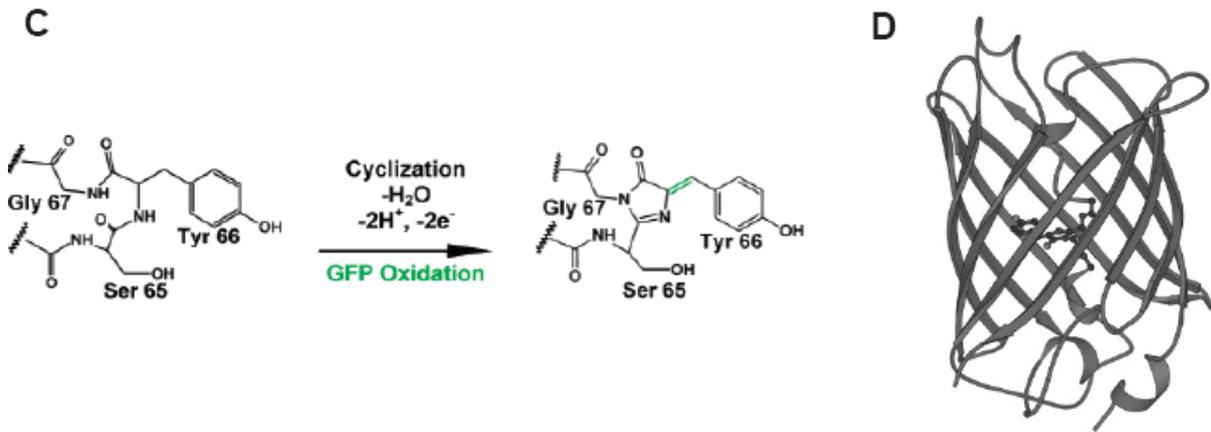
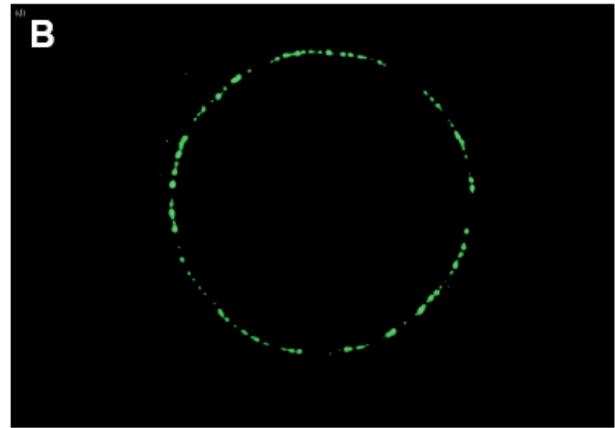
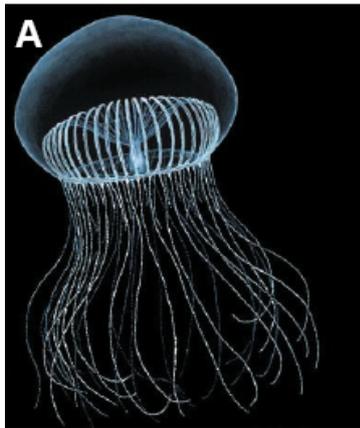


Abb. 1: Analyse der Fluoreszenz in der Qualle *Aequorea Victoria*.

A: *Aequorea Victoria* **B:** *Aequorea Victoria*: **C:** Reifung des GFP-Chromophors: GFP-Oxidation und autokatalytische Zyklisierung (Tubbs et al. 2005, S. 9834, Abb. 1A); **D:** Bandstruktur von GFP (Wachter 2006a, S. 340, Abb. 1).

1.2.2 Das transgene Mausmodell mit rot-fluoreszenten Oligodendrozyten

Zur selektiven Darstellung von Oligodendrozyten wurde das rote fluoreszente Protein *DsRed* (s.u.) unter der Kontrolle des Myelin-Proteolipidprotein-(PLP)-Promotors in transgenen Mäusen zur Expression gebracht. Hierzu wurde das *DsRed1*-Gen in ein PLP-Minigen kloniert (Hirrlinger PG et al. 2005).

PLP ist eines der bedeutendsten Strukturproteine des ZNS und stellt die größte Proteinfraction im Myelin dar. Im Myelin höherer Vertebraten machen PLP und seine kleinere Isoform DM20 schätzungsweise 50% der Trockenmasse der Myelinproteine aus (Dimou et al. 1999). Es gehört zu der sehr heterogenen Gruppe der Proteolipidproteine. Die Primärstruktur von PLP ist über die Evolution hinweg hoch konserviert: Seine 276 Aminosäuren lange Primärstruktur ist zwischen Menschen und Mäusen identisch und zeigt auch noch ein hohes Maß an Ähnlichkeit zu niederen Vertebraten (Griffiths et al. 1995; Linington und Waehneltd 1990). Obwohl PLP mit seinen vier transmembranären α -Helices topologische Verwandtschaft mit kanalformenden Proteinen wie den Connexinen zeigt, konnte Kanalbildung für PLP selbst nie gezeigt werden.

Die ultrastrukturellen Veränderungen der Myelin-Architektur in PLP/DM20-defizienten Mäusen legt nahe, dass Myelin-Proteolipidproteine als Spreizer im Extrazellulärspalt des kompaktierten Myelins fungieren (Edgar und Nave 2009; Karim et al. 2007; Rosenbluth et al. 1996; Rosenbluth et al. 2009).

Große Bedeutung hat PLP in der Erzeugung experimenteller Autoimmunmyelitiden, die als Grundlage muriner Modelle für Enzephalomyelitis disseminata (ED) dienen. Neben anderen Myelinproteinen führt intrathekale PLP-Injektion zur Bildung entzündlicher Herde im Maus-ZNS, die den in der ED beobachteten ähnlich sind (Wekerle 1991).

DsRed (drFP583) ist neben *EGFP* ein weiteres häufig benutztes fluoreszentes Protein (Zhu und Zon 2004). Wildtyp-*DsRed1* stammt aus der riffbildenden Koralle *Discosoma species* (*Blaupunktscheibenphlegmone*) (Abb. 2 A). Es hat einige Nachteile wie schlechte Löslichkeit und langsame Fluorophorreifung von etwa 27 h. Deshalb wurden durch Mutagenese 10-15-mal schneller reifende Derivate erzeugt (Bevis und Glick 2002). Das *DsRed1*-Tetramer besteht aus Monomeren, die GFP strukurähnlich sind (Tubbs et al. 2005; Yarbrough et al. 2001a), (Abb. 2 C). Initial ist *DsRed* grün fluoreszent (Anregung bei 480 nm, Emission bei 500 nm). Das vom GFP bekannte Resonanz- π -System ist bei *DsRed* durch einen weiteren Oxidationsschritt erweitert. Dadurch entsteht ein Acylimin-Rest (-C=N-C=O) und die Fluoreszenz verschiebt sich ins Rote (Gross et al. 2000), (Abb. 3). Zudem unterscheidet sich das *DsRed*-Fluorophor vom GFP-Fluorophor durch eine ungewöhnliche Peptidbindung in *cis*-Stellung zwischen Phe65 und Gln66 (Wall et al. 2000).

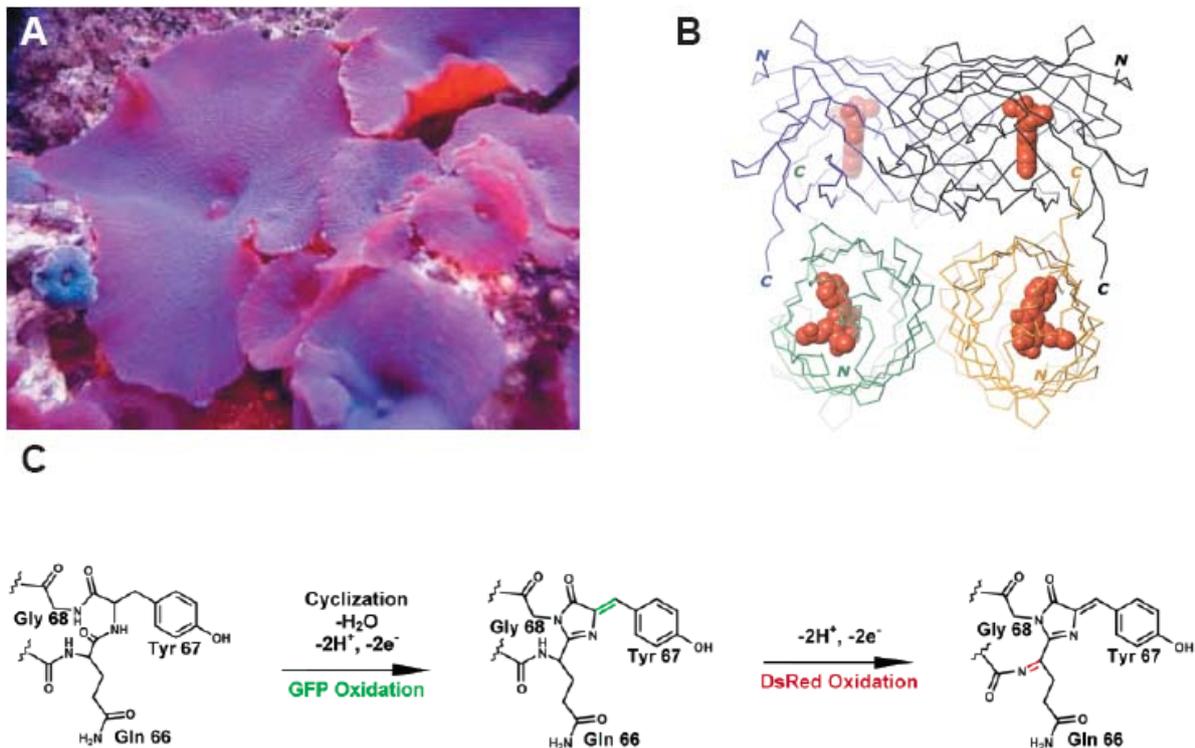


Abb. 2: Analyse der Fluoreszenz in der Riffkoralle *Discosoma* species.

A: *Discosoma* species; **B:** kristallographische Struktur von DsRed (Wall et al. 2000, S. 1133, Abb. 1A); **C:** DsRed-Reifung: GFP-Oxidation (grün) und anschließende DsRed-Oxidation (rot) (Tubbs et al. 2005, S. 9834, Abb. 1B).

1.2.3 Das hGFAP-EGFP/PLP-DRed-doppeltransgene Mausmodell

Mit dem Ziel, Astrozyten und Oligodendrozyten im gleichen Tier fluoreszent zu markieren, wurden Tiere, die GFAP unter dem humanen GFAP-Promotor exprimierten (Nolte et al. 2001), mit solchen verpaart, die DsRed unter dem PLP-Promotor exprimierten (Hirrlinger PG et al. 2005).

Die Spektren der beiden fluoreszenten Proteine erlauben die getrennte Detektion sowohl mit konventioneller Fluoreszenz-Mikroskopie wie auch mit konfokaler Laserscan-Mikroskopie

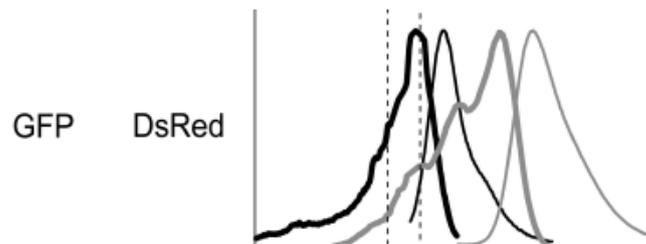


Abb. 3: Vergleich der Spektren von EGFP und DsRed.

EGFP-Spektrum in Schwarz, DsRed-Spektrum in Grau; Das Exzitationsspektrumsspektrum ist jeweils fett dargestellt.

1.3 Zielsetzung der Arbeit

Für die vorgelegte Arbeit wurden zwei Ziele definiert:

1. Eine Mausmutante, die unter der Kontrolle des Proteolipidproteinpromotors das rote fluoreszente Protein DsRed exprimierte, sollte als Werkzeug für entwicklungsbiologische und elektrophysiologische Studien charakterisiert werden.
2. Um die simultane, verletzungsinduzierte Reaktion von Gliazellen (Astrozyten und Oligodendrozyten) zu untersuchen, wurden die im ersten Teil der Arbeit charakterisierte Mausmutante mit rot fluoreszenten Oligodendrozyten und eine weitere Mausmutante, die unter der Kontrolle des humanen GFAP-Promotors das grüne fluoreszente Protein EGFP exprimierte, verpaart.

In der resultierenden doppeltransgenen Mauslinie wurden kortikale Stichwunden stereotaktisch induziert.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien

Nicht gesondert aufgeführte Standardlaborchemikalien wie NaCl, Tris-HCl, Agarose usw. wurden in p.A.-Qualität bei den gängigen Firmen Sigma, Gibco und weiteren handelsüblichen Firmen bestellt.

2.1.2 Gebrauchswaren

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

2.1.3 Sterilisation

Lösungen wurden bis auf hitzeempfindliche Komponenten im Dampfdruckautoklaven für 30 min bei 120°C und 10^5 Pascal dampfsterilisiert. Hitzeempfindliche Lösungen wurden steril filtriert. Gebrauchsgegenstände wie Deckgläschen wurden autoklaviert.

2.1.4 Enzyme

- REDTaqTMDNA-Polymerase, Sigma-Aldrich Co, Taufkirchen (Es wurde der mitgelieferte Reaktionspuffer verwendet.)
- Trypsin-EDTA, Sigma-Aldrich Co, Taufkirchen

2.1.5 Verwendete Mauslinien

Alle in dieser Arbeit verwendeten Mäuse wurden in der lokalen Tierhaltungseinheit des Max-Planck-Institutes für Experimentelle Medizin, Göttingen gezüchtet. Sie

wurden entsprechend den europäischen und deutschen Richtlinien für Versuchstiere behandelt. Wildtypmäuse wurden entweder in der Tierhaltungseinheit gezüchtet oder von Charles River Laboratories, Bad Königshofen, bezogen.

Die verwendeten Wildtypstämme waren:

Inzuchtstamm C57/Bl6

C57/Bl6 wurde von C.C. Little im Jahr 1921 aus einer Zucht von Abby Lathrop's Bestand weiterentwickelt, der auch zu den Stämmen C57BR und C57L führte. Stämme 6 und 10 wurden 1937 separiert.

Inzuchtstamm FVB/N

Dieser Inzuchtstamm ist 1935 abgeleitet von einem *outbred* Stamm aus der Schweiz [N:GP(S)] durch das *National Institute of Health (NIH)*. In den frühen 70er Jahren wurde der Stamm als Inzuchtstamm etabliert. Dabei wurde eine Sensitivität gegen das Friend'sche Leukämie Virus B entdeckt. Zu dieser Zeit wurde eine Inzucht dieser Linie für das Fv1b-Allel durchgeführt und der Stamm wurde FVB genannt.

2.1.6 Antikörper

Die für IHC verwendeten Primär- und Sekundärantikörper sind in Tabelle 1 aufgeführt.

Tab. 1: Übersicht über die verwendeten Antikörper

Antikörper	Spezies	Quelle	Verdünnung
monoklonale Antikörper			
Anti-NG2	Ratte	Jaqueline Trotter	1:50
Anti-NeuN	Maus	Chemicon	1:50
Anti-CNPase	Maus	Sigma-Aldrich	1:300
Anti-CD11b	Ratte	eBioscience	1:200
Anti-GFP	Kaninchen	Abcam	1:200
Anti-DsRed	Maus	BD Bioscience	1:50
Anti-PH3	Kaninchen	Sigma-Aldrich	1:1000
Anti-NF200	Maus	Sigma-Aldrich	1:200
Polyclonale Antikörper			
Anti-GFAP	Kaninchen	DAKO	1:250
Anti-TUC4b	Kaninchen	Chemicon	1:2500
Sekundäre Antikörper			
Cy TM 5-gekoppelter Anti-Ratte-IgG+IgM	Ziege	Jackson	1:1000
Cy TM 5-gekoppelter Anti-Maus-IgG+IgM	Ziege	Jackson	1:800
Cy TM 2-gekoppelter Anti-Maus-IgG	Ziege	Dianova	1:500
Pacific-Blue-gekoppelter Anti-Maus-IgG	Ziege	Molecular Probes	1:800

2.1.7 Wachstumsfaktoren

- rekombinanter, humaner Epidermaler Wachstumsfaktor (EGF), Invitrogen, USA
- rekombinanter, humaner Fibroblastenwachstums (FGF), Pepro Tech, New Yorck, USA

2.1.8 Zellkultur-Supplements

N2-Supplement, GIBCO/Invitrogen Cell Culture, USA

2.2 Methoden

2.2.1 Ganzkörperfixierung von Mäusen durch Perfusion

Nach Anästhesie mit 3% 2,2,2-Tribromethanol in H₂O (100 µl/10 g Körpergewicht) wurde der Brustkorb der Maus geöffnet, das Herz freigelegt, eine Kanüle in die linke Herzkammer eingeführt und ein Schnitt im rechten Vorhof gesetzt. Die Kanüle war mit einer Peristaltikpumpe verbunden (Heraeus SR70, Flußrate 0,2-0,5 ml/sek). Nach dem Ausspülen des Blutes mit ca. 30 ml HBSS wurde mit 4% (w/v) Paraformaldehyd in 100 mM Natriumphosphatpuffer (pH 7,4) fixiert, das Gehirn und weitere Gewebe präpariert und diese bei 4°C über Nacht in der Fixierungslösung nachfixiert. Eine kurzzeitige Lagerung erfolgte in PBS mit 0,01% (w/v) NaN₃.

2.2.2 Herstellung von Vibratomschnitten

Gehirne wurden nach Präparation in eiskaltem PBS (pH 7,4) an einem Leica VT1000s Vibratom (Mikrotom VT1000S, Leica, Wetzlar) geschnitten. Die frei flottierenden Schnitte in einer Dicke von 40-100 µm wurden in eiskalter,

phosphatgepufferter, physiologischer Kochsalzlösung (PBS) (pH 7,4) mit 0,01 % (w/v) NaN_3 versetzt und in 24 *well*-Platten bis zu einer Woche bei 4°C zur weiteren Prozessierung in der Immunhistochemie aufbewahrt.

2.2.3 Standardprotokoll für die immunhistochemische Analyse von Vibratomschnitten (IHC)

Die für immunhistochemische Analysen vorgesehenen Mäuse wurden mit Ether anästhesiert und mit einer vierprozentigen Paraformaldehydlösung (PFA) in PBS perfundiert. Nach Entnahme der Gehirne wurden diese über Nacht in vierprozentiger PFA-Lösung fixiert. Für alle durchgeführten Färbungen wurden mittels eines Vibratoms (Leica) 30 μm dicke Schnitte hergestellt. Diese wurden für 30 min bei Raumtemperatur (RT) in einer 0,4%igen Triton X-100-Lösung in PBS permeabilisiert. Anschließend wurde für 30 min bei RT in 4% Ziegen Serum in PBS geblockt. Danach folgte die Inkubation mit dem Erstantikörper in der jeweils unten angegebenen Verdünnung in 1%iger Ziegen Serum-Lösung in PBS bei 4°C über Nacht. Nachdem die Schnitte drei Mal für jeweils 5 min in PBS gewaschen worden waren, erfolgte die Inkubation mit dem Sekundäantikörper in der jeweils oben (Tabelle 1) angegebenen Verdünnung in 1,5%iger Ziegen Serum-Lösung bei RT für zwei Stunden. Im nächsten Schritt wurde erneut drei Mal für jeweils fünf Minuten in PBS gewaschen. Danach wurden die Schnitte mit Immumount auf Objektträgern eingedeckt und analysiert.

2.2.4 Abweichungen vom IHC-Standardprotokoll

Für folgende Färbungen mussten Abweichungen vom oben beschriebenen Standardprotokoll gemacht werden:

- (1) Für den Nachweis des Chondroitinsulfatproteoglykans NG2 (Staugaitis und Trapp 2009) entfiel der Permeabilisierungsschritt, da dieser zum Verlust des membranständigen Antigens geführt hätte
- (2) Für den Nachweis des Mitosemarkers Phosphohiston H3 (PH3) (Fukushima et al. 2009; Hendzel et al. 1997) wurde zusätzlich ein Trypsinisierungsschritt zur Verbesserung der Antikörperpenetration in den Kern notwendig. Deshalb wurde an Stelle der Permeabilisierung mit Triton X100 für 10 min bei 37°C mit 0,05% Trypsin-EDTA (Sigma) inkubiert. Da dadurch die Fluoreszenz der transgen exprimierten Proteine EGFP und DsRed verloren ging, mussten diese nach Standardprotokoll immunhistochemisch nachgefärbt werden. Dabei war das Problem zu bewältigen, dass mehrere Primärantikörper aus der gleichen Spezies stammten. In diesem Falle wurde sequenziell gefärbt, d.h. zwischen den einzelnen Inkubationsschritten mit Primärantikörpern noch einmal mit 4% NGS in PBS für dreißig Minuten bei RT zwischengeblockt. Um auszuschließen, dass der im zweiten Färbeschritt eingebrachte Sekundärantikörper mit einem Primärantikörper des ersten Färbeschrittes reagierte, wurde als Kontrolle je einmal im zweiten Färbeschritt nur der Sekundärantikörper auf den Schnitt gebracht. In diesem Fall durfte keine Bindung nachzuweisen sein.

2.2.5 Genotypisierung

Schwanzbiopsien wurden üblicherweise im Alter zwischen 3 und 4 Wochen während des Absetzens von der Mutter durchgeführt, um daraus genomische DNA zur routinemäßigen Genotypisierung transgener Mäuse mittels PCR zu gewinnen. Dabei wurde ein etwa 0,5 cm langes Schwanzstück mit einer Schere entfernt. Die

Schwanzbiopsie wurde in einem Reaktionsgefäß bei -20°C gelagert. Notiert wurde die Nummer der Maus, die sich aus Geburtsdatum und fortlaufender Kennung von 1-999 zusammensetzt, sowie das Geschlecht, die Nummern der Eltern, das Geburtsdatum und phänotypische Auffälligkeiten.

2.2.6 Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion wurde nach Standardprotokollen (Mullis et al. 1992) durchgeführt. Das Prinzip dieser Reaktion beruht auf der Verwendung zweier spezifischer Oligonukleotide (*sense*- bzw. *antisense*-Primer), die an komplementäre Bereiche denaturierter DNA binden können (*annealing*) und einer hitzestabilen DNA-Polymerase aus dem Bakterium *Thermus aquaticus* (Taq-Polymerase, Temperaturoptimum 72°C). Da im Idealfall in jedem Zyklus die molare Menge der Matrizen-DNA verdoppelt wird, kommt es zum exponentiellen Wachstum der Zahl der DNA-Moleküle. Standardreaktionen fanden in einem Volumen von 20 μl statt. Die Reaktionen wurden in einem DNA Engine TETRAD[®] 2 Peltier Thermal Cycler (MJ Research) durchgeführt. Die Optimierung der Reaktion erfolgte durch Zugabe von BSA, DMSO, Tween 20 oder „Substanz Q“ (Qiagen) und der Veränderung der MgCl_2 -Konzentration, der Anlagerungs- und/oder der Extensionstemperatur oder der Zyklenzahl.

2.2.7 Konfokale Laserscan-Mikroskopie

Schnitte und Zellkulturen wurden nach Fixierung und Anfärbung mit Hilfe Konfokaler Laserscan-Mikroskopie (LSM) analysiert. Dazu wurde ein Zeiss LSM 510NLO, Axiovert 200M, ausgestattet mit Laserlinien bei 458/488/514, 543 und 633 nm eingesetzt. Die folgenden Laserlinien und Filter wurden für Anregung, resp. Emission

benutzt: 488 nm/BP 500-530 IR (EGFP), 458 nm/BP 480-520 IR or BP 462-548 (Pacific Blue), 543 nm/BP 565-615 IR (DsRed), 633 nm/LP 643 (Cy5). Dreidimensionale Bildstapel wurden mit einer Rahmengröße von 512X512 Pixeln oder 1024X1024 Pixeln für hochauflösende Abbildungen aufgenommen. In der vorliegenden Arbeit sind zweidimensionale Einzelbilder und sog. Maximum-Intensity-Projektionen von Bildstapeln mit einer Tiefe von 10 bis 50 µm gezeigt. Alle konfokalen Bilder wurden mit der Zeiss LSM Software und Adobe Photoshop gespeichert und bearbeitet.

2.2.8 Elektrophysiologie

Es wurde mit hGFAP-EGFP/PLP-DsRed-doppeltransgenen Mäusen sowie PLP-DsRed-transgenen Mäusen im Alter von 4-6 Tagen gearbeitet.

Die Mäuse wurden mit Diethylether betäubt und dann durch zervikale Dyslokation getötet. Das Gehirn wurde schnell herauspräpariert und sofort in mit Carbogen (95 % Sauerstoff; 5 % Kohlendioxid) begaste, eiskalte Präparierlösung (87 mM NaCl; 25 mM NaHCO₃; 2,5 mM KCl; 1,25 mM NaH₂PO₄; 7 mM MgCl₂; 0,5 mM CaCl₂; 25 mM Glucose; 75 mM Saccharose, gepuffert auf pH 7,4 mit Carbogen) überführt und Vibratomschnitte der gewünschten Bereiche in einer Stärke von 200 µm wurden angefertigt.

Zur Lagerung wurden die einzelnen Schnitte vorsichtig mit einem Pinsel in ein Vorratsgefäß mit Nylonnetzboden mit auf 35°C erwärmter, carbogenbegaster Präparierlösung überführt, danach auf Raumtemperatur abgekühlt. Die Schnitte wurden dann in carbogenbegaste Ringer-Lösung (125 mM NaCl; 25 mM NaHCO₃; 2,5 mM KCl; 1,25 mM NaH₂PO₄; 1 mM MgCl₂; 0,2 mM CaCl₂; 2,5 mM Glucose) überführt und konnten so bis zu 6 h am Leben erhalten werden. Alle Experimente

wurden in Ganzzellkonfiguration der Patch-Clamp-Technik durchgeführt. Die Zellen wurden bei einem Ruhemembranpotential von -70 mV gehalten. Es wurden Serien von Spannungssprüngen von -130 bis $+50$ mV mit Steigerungen von je 10 mV induziert.

Um die Schnitte in der Messkammer zu fixieren, wurde ein mit Nylonfäden bespannter U-förmig-gebogener Platindraht verwendet (Sakmann et al. 1989). Die Messkammer selbst wurde mit Hilfe einer Absaugpumpe (Vacusafe Comfort, Integra Biosciences, Fernwald) ständig mit carbogenbegaster Ringerlösung durchspült.

Fluoreszenz wurde im Falle der Schnitte aus hGFAP-EGFP/PLP-DsRed-doppeltransgenen Tieren mit Hilfe konfokaler Laserscan-Mikroskopie an Hand der Transgenexpression überprüft.

Im Falle der PLP-DsRed-transgenen Tiere wurde die Fluoreszenz mit Hilfe einer CCD-Kamera (Princeton Instruments, Trenton, USA) unter Anwendung der MetaMorph-Imaging-Software (Visitron Systems, Puchheim, Deutschland) überprüft. Es wurde ein aufrechtes Mikroskop (Axioscope 2, Fsmot, Zeiss, Deutschland) benutzt. Zur Anregung von DsRed wurde mit einem Epifluoreszenz-Illuminationssystem der Wellenlänge 560 nm (Polychrome II, TILL Photonics, Gräfelfing, Deutschland) gearbeitet.

Der für die Messungen an Schnitten aus hGFAP-EGFP/PLP-DsRed-doppeltransgenen Tieren verwendete Messstand bestand aus einem aufrechten konfokalen Mikroskop (Zeiss Axioskop FS2mot.). Zur Anregung von DsRed wurde Laserlicht der Wellenlänge 543 nm, zur Anregung von EGFP Laserlicht der

Wellenlänge 488 nm benutzt. Sowohl für die mikroskopischen Aufnahmen wie auch für das Patchen der Zellen wurde ein 40x Wasserimmersionsobjektiv verwendet.

Die Kapillaren wurden aus Borosilikatglas (Hilgenberg, Malsfeld, Deutschland) mit einem horizontalem Elektrodenziehgerät (Quarzglaspuller mit Laserstrahlheizung, Modell P-2000, Sutter Instrument Co., Novato, CA, USA) gezogen. Für die Ganzzelleableitungen wurden Pipetten mit einem Außendurchmesser von 1,5 mm und einer Wanddicke von 0,315 mm benutzt. Die erreichten Pipettenwiderstände lagen zwischen 6 und 9 M Ω .

Die Patchpipetten wurden mit (Angaben in mM) 125 K-Gluconat, 1 CaCl₂, 2 MgCl₂, 4 Na₂ATP, 10 EGTA und 10 HEPES (pH mit KOH auf 7,2 titriert) gefüllt und mit Hilfe von Mikromanipulatoren (Liugs-Neumann) an die Zellen herangeführt.

Die Ströme wurden bei 3kHz tiefpassgefiltert und bei 20 kHz mit Hilfe der Patchmaster 1.0 Software (HEKA, Lambrecht/Pfalz, Deutschland) aufgenommen. Off-line-Analyse wurden mit der IGOR Pro Version 4.0 durchgeführt (Wavemetrics, INC., USA).

Die elektrophysiologische Charakterisierung der PLP-DsRed-Maus wurde gemeinsam mit Frau Dr. Anja Scheller (Gliaphysiologie und Imaging, MPI Exp. Med.) durchgeführt.

Die Analyse der doppeltransgenen Gliazellen erfolgte mit Unterstützung von PD Dr. med. Sven Hülsmann (Abt. Neuro- und Sinnesphysiologie, Universität Göttingen).

2.2.9 Protokoll für Neurosphärenkultur

Embryonen hGFAP-EGFP/PLP-DsRed-doppeltransgener Muttertiere wurden an E14.5 entnommen und in kaltes HBSS (4°C) ohne Kalzium und Magnesium überführt. Mit Hilfe eines Binokulars wurden die Gehirne aus den Schädelkalotten präpariert, und die Kortizes von der übrigen telencephalen Anlage sowie Meningen getrennt. Die entstandenen Präparate wurden mit einer Irisschere grob zerkleinert und in auf 37°C vorgewärmtes 0,1% Trypsin, 0,05% DNase in HBSS ohne Kalzium und Magnesium gegeben, worin sie für 20 min bei 37°C inkubiert wurden. Anschließend wurde mit 1 ml 0,05% DNase in HBSS ohne Kalzium und Magnesium bei 37°C gespült, um die Trypsinisierung zu stoppen.

Das trypsinisierte Material wurde in dieser Reihenfolge jeweils 10-mal durch eine 1-ml-Pipettenspitze (Gibco) und eine über einer Bunsenbrennerflamme ausgezogene Pasteurpipette trituriert. Die resultierende Suspension wurde für 5 min bei 500 min⁻¹ und 4°C zentrifugiert. Das Zellsediment wurde dann in 1 ml DMEM/F12 mit N2-Supplement, 20 ng/ml EGF, 10ng/ml βFGF und Penicillin/Streptomycin durch mehrfaches Triturieren in einer 1-ml-Pipette (Gibco) resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen in einer hämatologischen Neubaurzählkammer gezählt und in einer Dichte von 10⁶/10 ml in 25-ml-Kolben angesät.

Um ein Adhärenzen der Zellen zu vermeiden, wurden die Kolben jeden Tag leicht auf ihre Unterlage aufgeklopft.

Ab dem vierten Tag nach Ansäen konnte die Bildung von Neurosphären beobachtet werden.

Das Medium wurde alle fünf bis sieben Tage gewechselt. Dazu wurden die frei schwimmenden Neurosphären in ihrem Medium in eine 5-ml-Pipette aufgesaugt und 3-5-mal sacht auf- und abtrituriert, um die Sphären mechanisch zu dissoziieren.

Danach wurden sie bei 1000 rpm und 4°C zentrifugiert und erneut in dem beschriebenen Medium resuspendiert und angesät (Fukushima et al. 2009; Weiss et al. 1996).

Die Entwicklung der Kulturen wurde mit Hilfe konfokaler Lasermikroskopie dokumentiert.

3 Resultate

3.1 Charakterisierung der PLP-DsRed-Maus

Im ersten Abschnitt der vorgelegten Arbeit wurde eine Mausmutante, die unter der Kontrolle des PLP-Promotors das rote fluoreszente Protein DsRed exprimiert, unter dem Gesichtspunkt ihrer weiteren Verwendung als Modell für elektrophysiologische und entwicklungsbiologische Studien bzw. als Modell für Schädelhirntraumata analysiert.

Das PLP-DsRed-Konstrukt wurde von Frau Prof. Dr. Babette Fuß (Institute of Anatomy and Neurobiology, Virginia Commonwealth University, Richmond, Va., USA) zur Verfügung gestellt. Die Oozyteninjektionen erfolgten am Max-Planck-Institut für experimentelle Medizin (MPI Exp. Med.) in Göttingen.

Die Selektion der das Transgen exprimierenden Mauslinien erfolgte durch Herrn Prof. Dr. Frank Kirchhoff (MPI Exp. Med., Göttingen). Es wurden zwei Mauslinien zur Analyse ausgewählt, die PRDA und PRDB genannt wurden.

Es wurde mit fluoreszenzmikroskopischen, immunhistochemischen und elektrophysiologischen Methoden gearbeitet.

Dabei wurde das zeitliche und räumliche Expressionsmuster von DsRed analysiert. Darüber hinaus wurde mit Hilfe von immunhistochemischen Färbungen gegen Marker anderer Zelltypen die spezifische Expression von DsRed in Oligodendrozyten gesichert.

Außerdem wurde die oligodendrozytären Membraneigenschaften elektrophysiologisch dargestellt.

3.1.1 Analyse des zeitlichen Expressionsmusters

Transgen-Expression konnte in beiden Linien in den Zellsomata bereits zwei Tage nach der Geburt (P2) beobachtet werden (Abb. 4 B). Sie erschien dann im Kernbereich des zwölften Hirnnerven (*Nucleus nervi hypoglossi*) und breitete sich bis P8 über den gesamten Hirnstamm aus (Abb. 6 A und C). Um P10 waren im gesamten *Corpus callosum* exprimierende Zellen sichtbar (Abb. 4 B). Beide Linien verhielten sich hinsichtlich dieses Musters gleich. Nach ca. zwei Wochen erreichte die Expression im Hirnstamm ihr Maximum. Nach drei Wochen war sie bereits wieder stark reduziert (s.u.). Im Telenzephalon erreichte die Expression ihr Maximum nach ca. drei Wochen. Nach vier Wochen war sie in der grauen Substanz des Kortex auch mit Hilfe hochsensitiver Mikroskopie nicht mehr detektierbar, blieb aber in der weißen Substanz weiter erhalten.

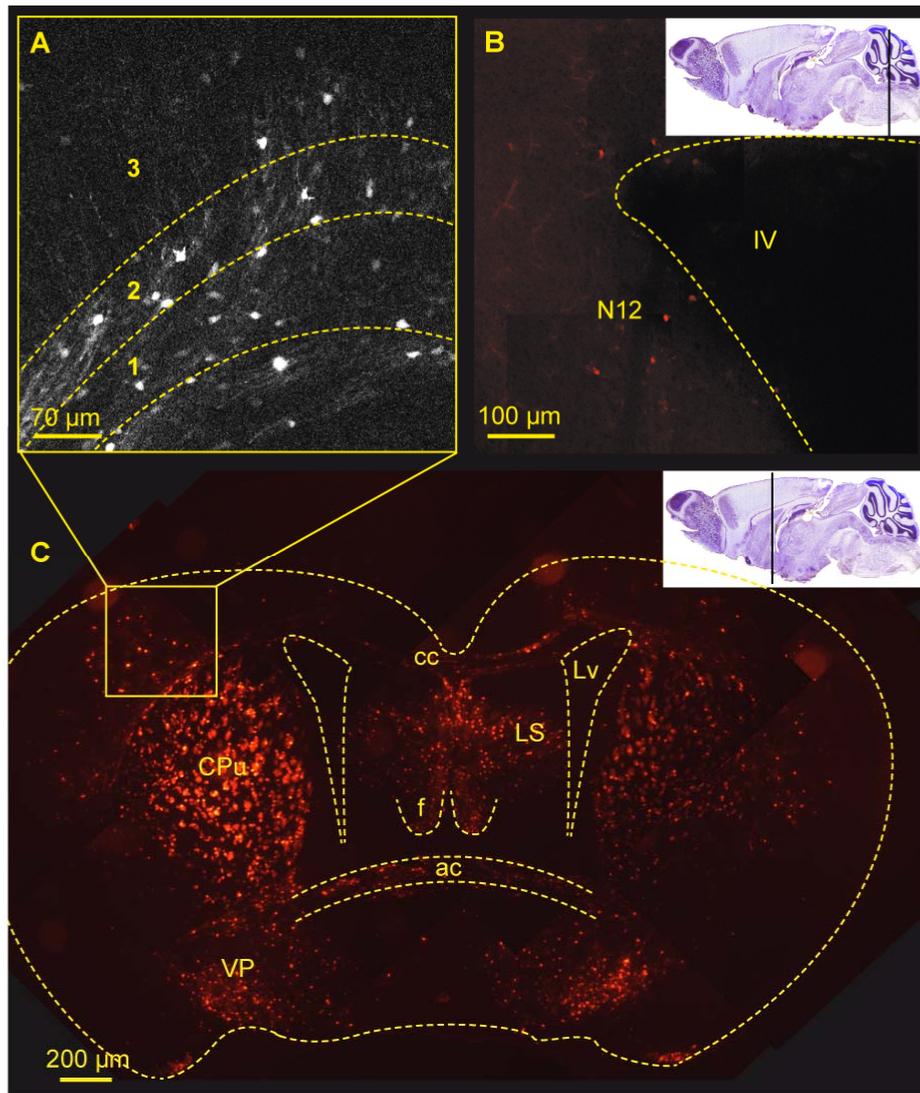


Abb. 4: Analyse der Expression von DsRed in der PRDB-Linie.

Inserts zeigen Schnittebenen **A**: Ausschnittvergrößerung aus **C**, Kortex zum Zeitpunkt P10 (Zahlen zeigen kortikale Schichtung), ac Commissura anterior, cc Corpus callosum, CPu kaudales Putamen (Corpus striatum), f Fornix, LS Nucleus septalis lateralis, LV Seitenventrikel, (MIP eines konfokal aufgenommenen Bildstapels) **B**: obere Medulla oblongata, N12 Nucleus nervi hypoglossi, IV vierter Ventrikel; (Bild zusammengesetzt aus MIPs konfokal aufgenommener Bildstapel) P2,; **C**: Übersicht Frontalhirn P10 (Bild zusammengesetzt aus konventionellen, fluoreszenzmikroskopischen Bildern).

3.1.2 Analyse des Expressionsmusters auf zellulärer Ebene

Bei der Beobachtung und Beurteilung der Expression von DsRed in den Zellen wurde besonderer Wert auf den Aspekt ihrer Verwendbarkeit für *in-situ*-, insbesondere aber auch *in-vivo*-Anwendungen gelegt. Die Expression begann zytosolisch im Bereich des Soma (Abb. 5 B). Mit dem Wachstum der Zellen breitete sie sich in die Fortsätze aus (Abb. 5 A und B). Entlang dieser bildeten sich knotenartige Auftreibungen, die mit DsRed gefüllt waren (Abb. 5 A-D, Pfeile). Die Expression folgte den typischen Wachstumsmustern verschiedener Arten von Oligodendrozyten. So konnte entlang der großen Fasertrakte und Nerven die typische T-förmigen Aufspaltungen der myelinisierenden Oligodendrozytenfortsätze visualisiert werden (Abb. 5 A, 6, 7, 9 B, C und D). Es fanden sich aber auch die typisch sternförmig verzweigten Morphologien von Oligodendrozyten der grauen Substanz (Abb. 5 B).

Nach sieben bis 20 Tagen der Expression war DsRed in den Fortsätzen nicht mehr detektierbar. Während der Expressionsphase war eine gute Darstellung auch der feinen Fortsatzmorphologie sowohl in frisch isolierten Schnitten (Abb. 6 B) wie auch nach PFA-Fixierung (Abb. 5) möglich.

Zudem kam es nach einem Zeitraum von ca. zehn Tagen der DsRed-Expression zur zunehmenden Aggregation des Proteins im Soma und auch in den Fortsätzen der Zellen. Nach ungefähr drei Wochen der Expression hatte diese sich auf wenige Aggregate reduziert, die sich um den Zellkern herum gruppieren (Abb. 5 D). Das Ausmaß, in dem sich die Expression reduzierte, unterlag jedoch regionalen Unterschieden. blieb es in den großen Bahnen der weißen Substanz lange erhalten, so verschwand es in der grauen Substanz des Kortex bis zur vierten postnatalen Woche.

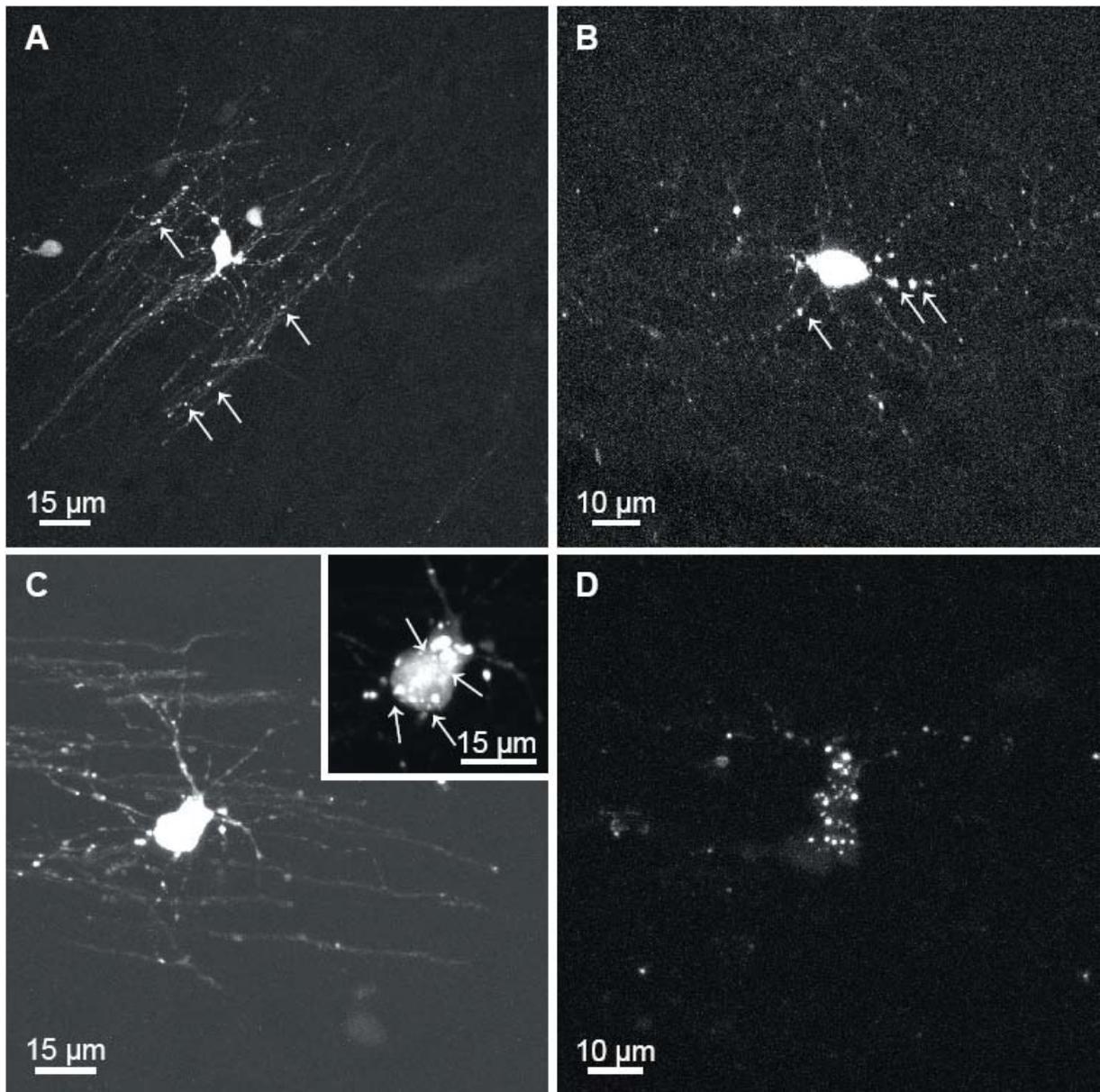


Abb. 5: DsRed wird in den Somata und Fortsätzen von Oligodendrozyten verschiedener Morphologie exprimiert.

A: dienecephaler Oligodendrozyt (P10) mit typischen, sich T-förmig aufspaltenden Fortsätzen, in denen sich DsRed z.T. in girlandenförmig angeordneten Auftreibungen detektieren lässt, (Pfeile); **B:** kortikaler Oligodendrozyt (P12): auch hier aggregiert DsRed entlang der Fortsätze; **C:** striataler Oligodendrozyt (P12): Die Fortsatzmorphologie ist bereits nur eingeschränkt beurteilbar, kann aber noch detektiert werden; das Insert zeigt die somatische DsRed-Aggregation bei geringerer Belichtungszeit; **D:** Hirnstammoligodendrozyt (P20): die DsRed-Aggregation ist bereits so weit fortgeschritten, dass eine Beurteilung der Morphologie nicht mehr möglich ist.

Obwohl DsRed mit ca. 27x34 Å (Yarbrough et al. 2001b) ein recht großes tetrameres Protein darstellt, gelangte es offenbar während des Wachstums der Fortsätze bis in deren feinste Verästelungen, deren morphologische Veränderungen *in situ* untersucht wurden. In der oberen *Medulla oblongata* wurden P4 die Fortsätze wachsender Oligodendrozyten über Zeiträume von bis zu vier Stunden beobachtet unter Carbogenbegasung *in situ*. Dabei konnte das Wachstum filopodienartiger Strukturen an den Enden der Fortsätze visualisiert werden. (Abb. 13).

3.1.3 Analyse des räumlichen Expressionsmusters

In beiden PLP-DsRed-transgenen Mauslinien konnte weit ausgedehnte Expression in fast allen Hirnarealen gefunden werden, jedoch überall mit dem oben beschriebenen zeitlichen Muster.

Es waren praktisch alle verschiedenen Formen von Oligodendrozyten markiert, jedoch bestanden hier regionale Unterschiede. Die klassische Form, die sich durch sich T-förmig aufspaltende Fortsätze auszeichnet, war sowohl in allen Bereichen des Stamm- wie auch des Vorderhirns zu finden. Sie konnte vor allem in den großen Trakten wie zum Beispiel dem Verlauf der Pyramidenbahn, des *Fasciculus longitudinalis medialis (mlf)*, der Kleinhirnstiele (*icp* in Abb. 6 A und *scp* in Abb. 7), der *Fimbria hippocampi* (6 in Abb. 9), den *Tractus mamillotegmentalis* und *mamillothalamicus* (D in Abb. 9) und der *Fornix* (6 in Abb. 9) aber auch im Verlauf der *Nn. facialis* (N7 in Abb. 6 B) und *vestibulocochlearis* (N8 in Abb. 6 B) gut studiert werden. Ähnlich gute Bedingungen fanden sich im intrazerebralen Verlauf anderer Hirnnerven und deren Kerngebieten wie z.B. des *Nervus trigeminus*, dessen *Tractus spinalis (sp5)*, des *Nervus facialis (7N)*, des *Nervus vestibulocochlearis (8N)*, des *Ncl. tractus solitarii (Sol)* und anderer (Abb. 6 und 7).

Im Kleinhirn fand sich ubiquitär starke Expression in der weißen Substanz (Abb. 8 A). Die Expression war dabei zum Teil so stark, dass die Identifikation einzelner Fasern und Zellen schwierig sein konnte. Hier wie an anderen Stellen der Hirnoberfläche fand sich zudem Expression in Zellen der *Pia mater* (Pfeilköpfe in Abb. 8 A).

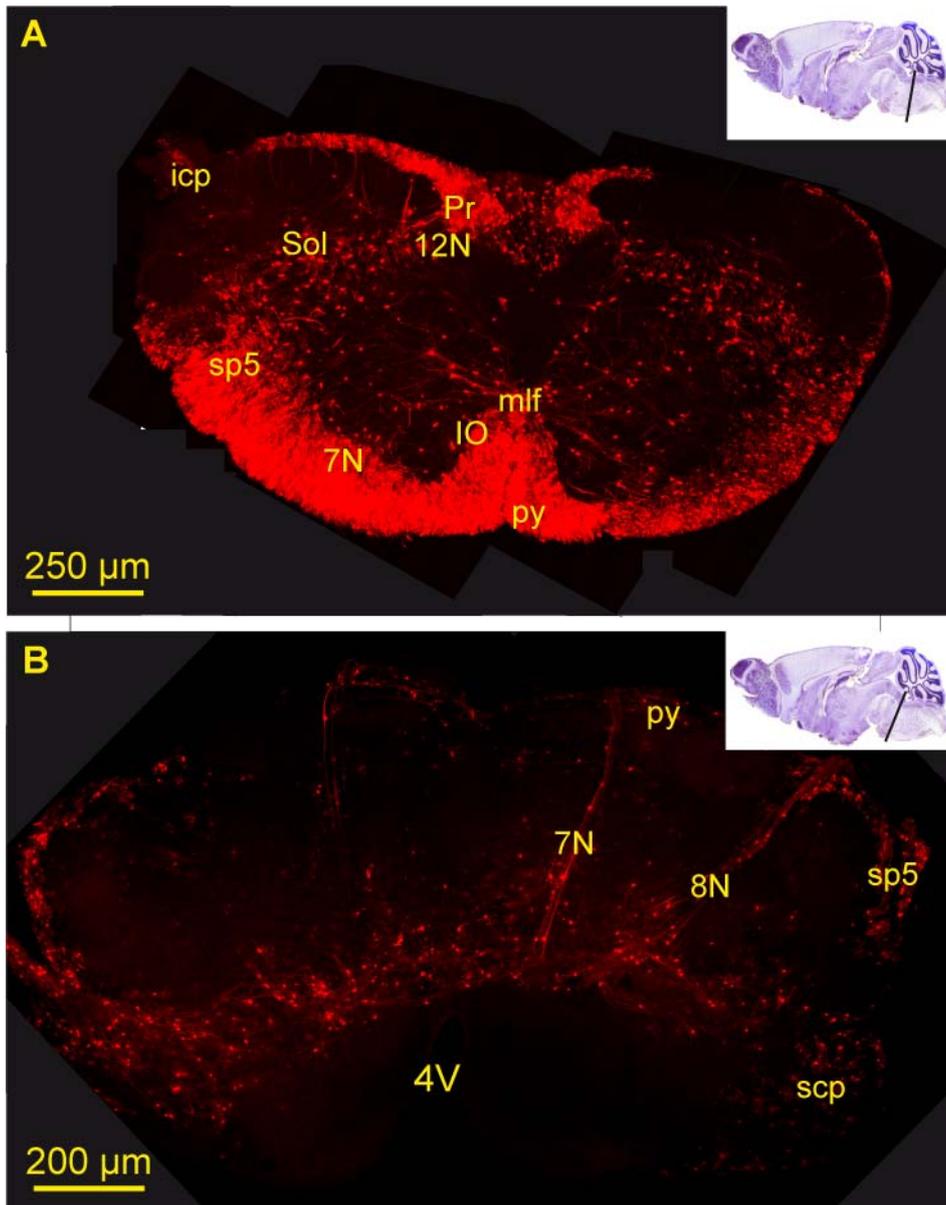


Abb. 6 A und B: Analyse der DsRed-Expression in kaudaler und rostraler Medulla oblongata zum Zeitpunkt P8.

Inserts zeigen die Schnittebenen an. icp Pedunculus cerebellaris inferior, Sol Nucleus tractus solitarii, scp Pedunculus cerebellaris superior, sp5 Nucleus spinalis nervi trigemini, 7N Nervus facialis (Nucleus in A, intrazerebraler Verlauf distal des inneren Fazialisknies in B), 8N intrazerebraler Verlauf des N. vestibularis, 12N Nucleus nervi hypoglossi, py Tractus pyramidalis, mlf Fasciculus longitudinalis medialis, IO Oliva inferior. Bilder zusammengesetzt aus MIPs einzelner Bildstapel.

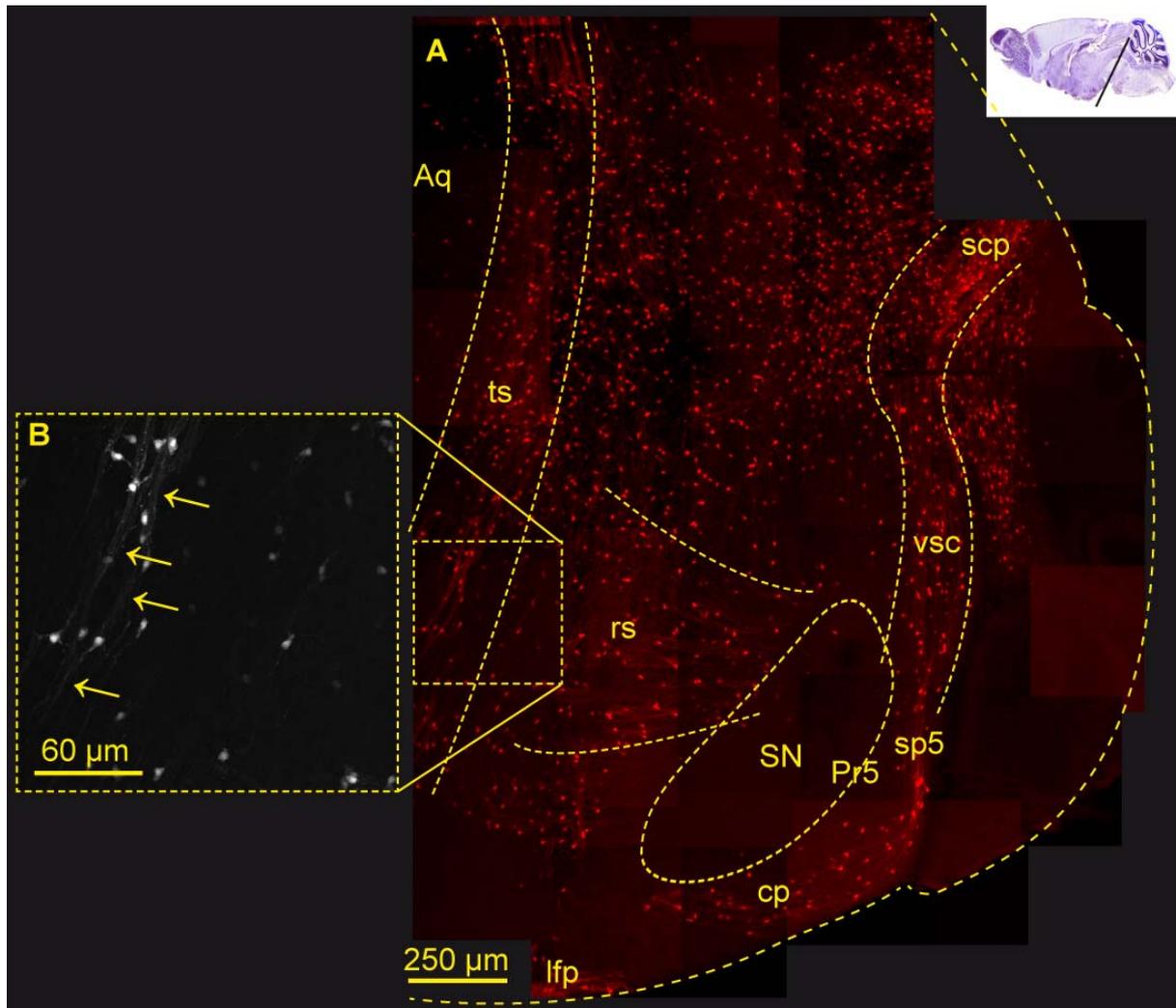


Abb. 7: Analyse der DsRed-Expression am pontomesenzephalen Übergang um Zeitpunkt P10.

A: Übersicht über einen Koronarschnitt durch die im Insert angezeigte Schnitteben (linke Hirnhälfte); Aq Aquaeductus cerebri, cp Pedunculus cerebri, lfp Fasciculus longitudinalis pontis, Pr5 Nucleus principalis nervi trigemini, scp Pedunculus cerebellaris superior, SN Substantia nigra, sp5 Tractus spinali nervi trigemini, ts Tractus tegmentospinalis, vsc Tractus spinocerebellaris anterior. **B:** Vergrößerung des durch Rechteckrahmen angezeigten Bildausschnitts in A: Pfeile zeigen Oligodendrozytenfortsätze im Tractus tegmentospinalis.

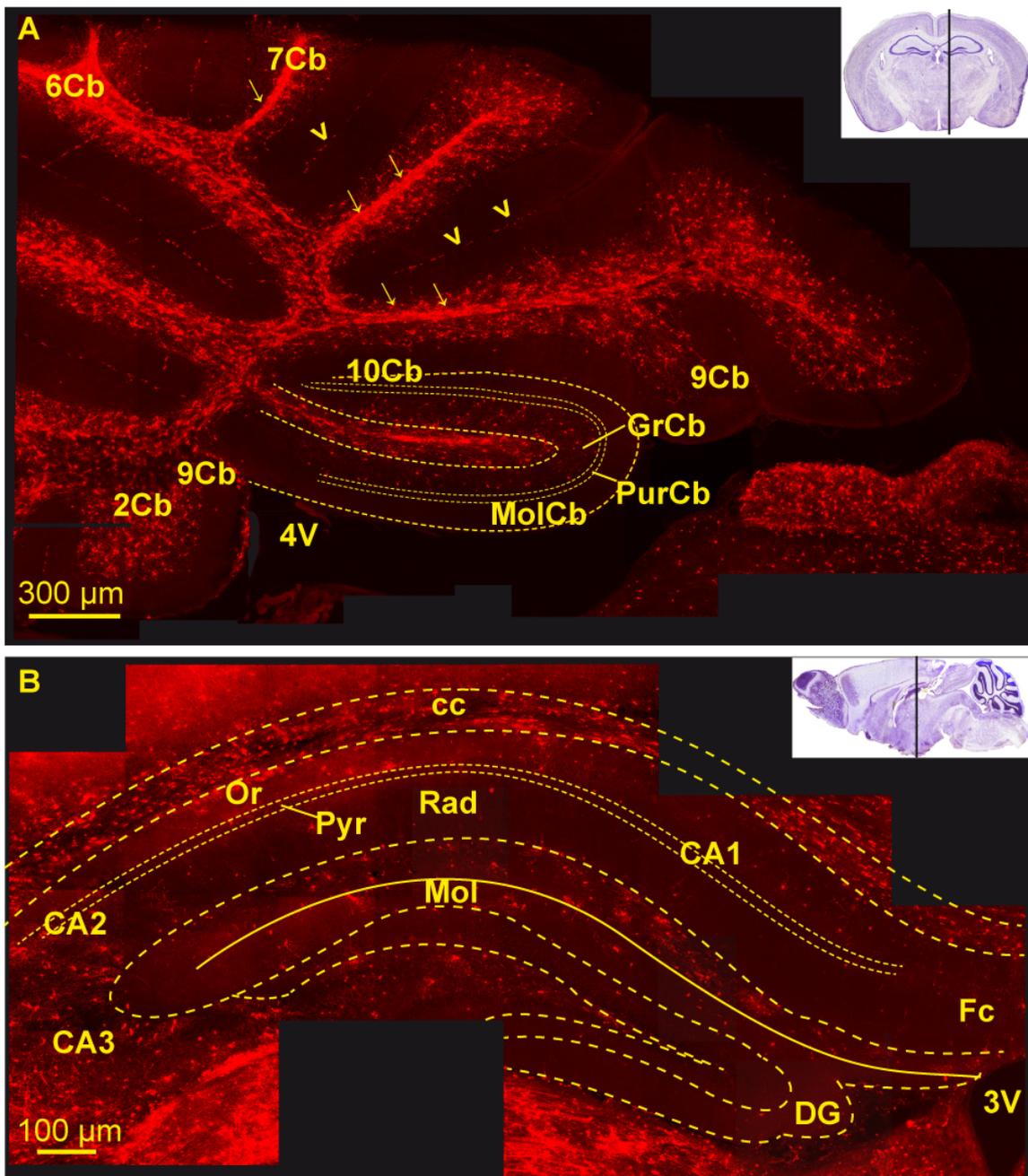


Abb. 8: Analyse der DsRed - Expression in Cerebellum und Hippocampus.

A: DsRed-Expression im adulten Cerebellum (p14): Pfeile zeigen Myelin in der Substantia alba (Arbor vitae), Pfeilköpfe zeigen DsRed-Expression in pialen Endothelzellen; 2 – 10cb: entsprechende Kleinhirnwindungen, 4V Vierter Ventrikel (Ventriculus quartus cerebri), Molcb Stratum moleculare, Purcb Stratum der Purkinjezellen, GrCb Stratum granulare; zusammengesetzte Darstellung aus MIPs einzelner Bildstapel; Insert zeigt sagittale Schnittebene; **B:** DsRed-Expression in der Hippokampusformation und im Corpus callosum (cc) (p24): CA1-3 Cornu ammonis, Rad Stratum radiale, Mol Stratum moleculare, Or Stratum oriens, Fc Fimbria hippocampi, DG Gyrus dentatus, III Dritter Ventrikel (ventriculus tertius cerebri); insert zeigt frontale Schnittebene; Bild aus MIPs einzelner Bildstapel zusammengesetzt.

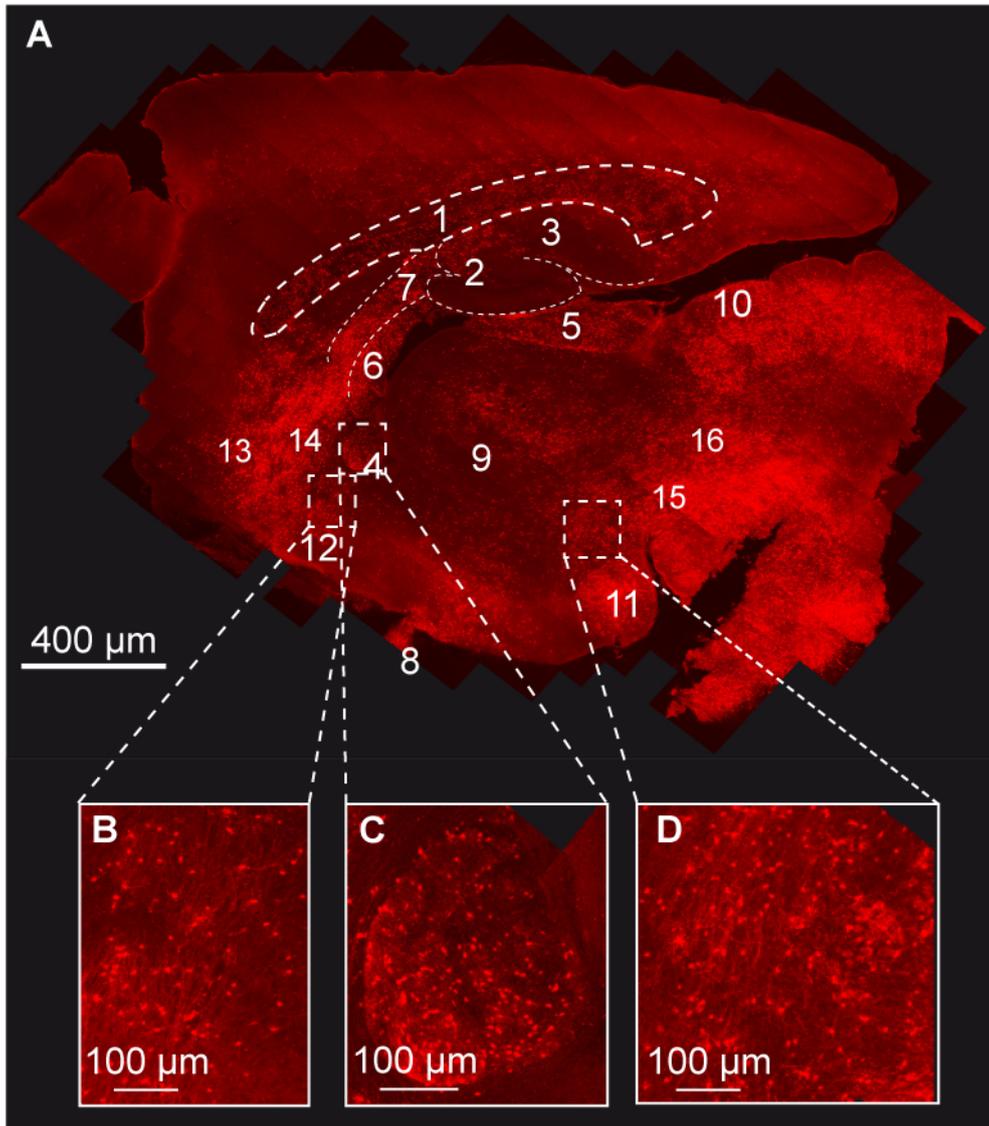


Abb. 9: Analyse der DsRed-Expression im Telenzephalon zum Zeitpunkt P24.

A: 1 Corpus callosum, 2 CA2, 3 CA3, 4 Commissura anterior, 5 Habenula, 6 Fimbria hippocampi, 7 Fornix dorsalis, 8 Chiasma opticum, 9 Thalamus, 10 Colliculus superior, 11 Corpus mammilare, 12 Hypothalamus, 13 Ncl. accumbens, 14 Ncl. olfactorius rostralis, 15 Ncl. ruber, 16 Ncl. Nervi oculomotorii; **B:** Vergrößerung aus A: Area praeoptica; **C:** Vergrößerung aus A: Commissura anterior; **D:** Vergrößerung aus A: Tractus mamillo tegmentalis et mamillothalamicus. Bild zusammengesetzt aus 284 MIPs einzelner, konfokal aufgenommener Bildstapel, P24

Im Telenzephalon war DsRed - Expression zunächst in den Kommissurenbahnen wie dem *Corpus callosum* und der *Commissura anterior* sowie im *Striatum* und *Thalamus* zu sehen (Abb. 4 B, 9 A und C). Des Weiteren zeigte sich starke Expression insbesondere im rostralen und ventralen *Hypothalamus* und im *Corpus*

habenulare (Abb. 9 A und B). Auch die visuellen Bahnen zeigten sich im *Chiasma opticum* sowie im *Colliculus superior* deutlich markiert (Abb. 9 A). In dienzephalen Strukturen zeigte sich fast generell deutliche Expression wie z.B. im *Tractus mamillotegmentalis*, im *Tractus tegmentospinalis*, in den Nuclei des *Nervus oculomotorius* sowie in den Verbindungen des *Ncl. ruber* wie *Tractus rubrothalamicus*, *rubrosinalis* und im *Tractus tegmentalis medialis* (Abb. 8 und 9).

Im Hippokampus war die Expression nicht ganz regelmäßig verteilt. Sie konzentrierte sich vor allem in CA2 (Abb. 8 B und 9 A). Sie war hier insgesamt schwächer, als im motorischen und sensorischen System. Auffallend deutlich zeigte sich dann aber die Expression in der *Fimbria hippocampi* (6 in Abb. 9). Wie schon im Cerebellum, so zeigten sich auch im Hippokampus die einzelnen Schichten deutlich abgrenzbar.

Der Kortex zeigte die schwächste Expression entsprechend der geringeren Anzahl an Oligodendrozyten. Hier waren nur einzelne, typisch irregulär geformte Zellen zu finden (Abb. 4 A 1-3 und 4 C 9).

3.1.4 DsRed-exprimierende Oligodendrozyten exprimieren keine Marker anderer Zelllinien, jedoch den Oligodendrozytenmarker „zyklische Nukleotidphosphatase“

Immunhistochemische Analysen wurden vor allem mit dem Ziel unternommen, DsRed - Expression in andern Zelltypen zu finden, resp. auszuschließen, und das Verhältnis von Oligodendrozyten zu anderen Zelltypen morphologisch darzustellen. Es wurden klassische, zelltypspezifische Marker wie GFAP für Astrozyten, cyclische Nukleotidphosphatase (CNPase) für Oligodendrozyten, sowie NeuN und NF200 für Nervenzellen und deren Fortsätze benutzt. Die Analysen wurden auf die Zeit starker Expression und hier vor allem auf noch wachsende Oligodendrozyten konzentriert.

Immunhistochemische Färbungen wurden also im Hinstamm zwischen P4 und P10 und im Telenzephalon zwischen P10 und P20 angefertigt.

Es konnte keine Überlappung mit einem nicht-oligodendrozytären Markern gefunden werden (Abb. 8-11).

Zur Darstellung von neuronalen Somata wurden im *Striatum* und Kortex adulter Mäuse der PRDA- und PRDB-Linie immunhistochemische Färbungen auf NeuN unternommen. Dieses Protein wird in allen bekannten Subgruppen von Neuronen exprimiert (Kim et al. 2009). Bei dem NeuN-Gen handelt es sich um ein Mitglied der Fox-Familie, einer Gruppe von Splice Faktoren, und wurde kürzlich als Fox-3 identifiziert.

Es konnte keine Kolokalisation detektiert werden. Exemplarisch stellt Abb. 10 (A-C) die Ergebnisse im *Striatum* und einem Ausschnitt der Inneren Kapsel in der PRDA-Linie dar. Es ergaben sich keine Unterschiede in den beiden Linien.

GFAP wird in einem Großteil astrozytärer Zelltypen exprimiert, jedoch nie in Oligodendrozyten. Es wurden zunächst immunhistochemische Färbungen auf GFAP in gesunden, adulten Tieren der PRDA- und PRDB-Linie unternommen. Hier ergab sich ebenfalls keine Kolokalisation (Abb. 9 D-F).

Im Rahmen des im zweiten Teil der vorgelegten Arbeit beschriebenen Läsionsmodells wurden umfangreiche immunhistochemische Analysen nach Verursachung cerebraler, stereotaktischer Stichwunden unternommen, die auch unter diesen Bedingungen keine Kolokalisation zwischen DsRed und GFAP zu Tage fördern konnten, obwohl nach diesem Eingriff eine Kolokalisation zwischen DsRed und EGFP in einer hGFAP-EGFP/PLP-DsRed- doppeltransgenen Maus gefunden werden konnte.

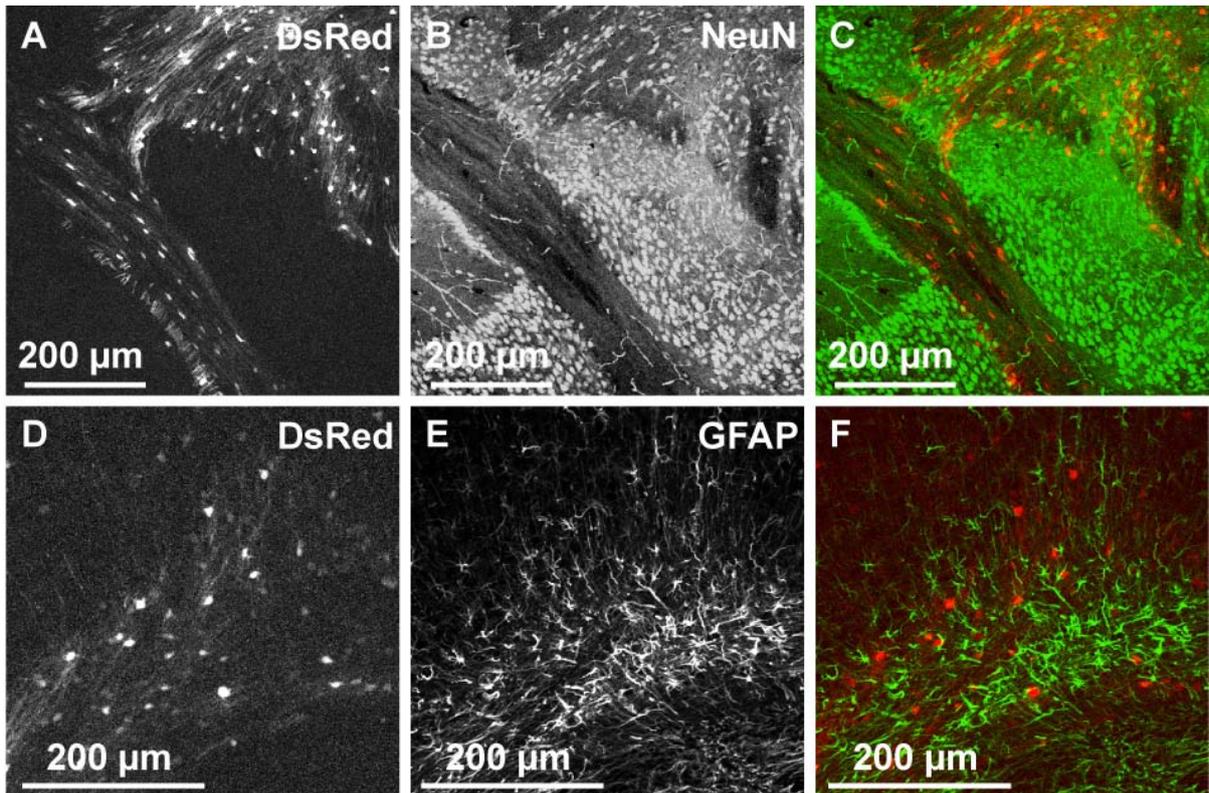


Abb. 10: Analyse der Expression von NeuN und GFAP in PLP/DsRed-Mäusen.

A: DsRed; **B:** NeuN; **C:** Überlagerung von A und B; **D:** DsRed; **E:** GFAP; **F:** Überlagerung von D und E. A-E: MIP's konfokal aufgenommener Bildstapel.

Im gleichen Kontext wurde immunhistochemisch Kolokalisation mit dem Mikroglia marker Mac-1 (CD11b) ausgeschlossen (Abb. 18).

Im nächsten Schritt wurde auf Kolokalisation mit dem bekannten oligodendrozytären Protein CNPase untersucht.

Alle DsRed-exprimierenden Zellen exprimierten auch CNPase, jedoch waren nicht alle CNPase-positiven Zellen auch DsRed-positiv (Abb. 11). Auch hier waren keine Linien-spezifischen Unterschiede offensichtlich.

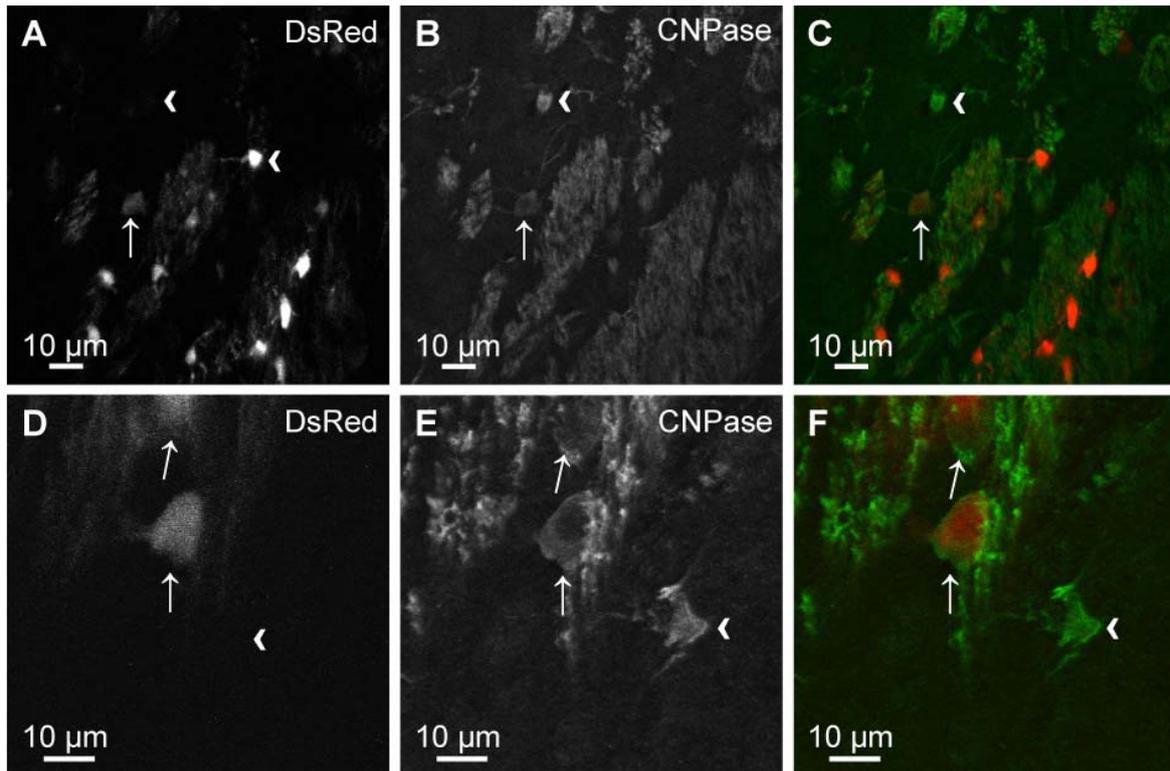


Abb. 11: Immunhistochemische Analyse der CNPase-Expression in DsRed-positiven Oligodendrozyten.

A: DsRed; **B:** CNPase; **C:** Überlagerung von A und B; **A-C:** Übersicht, Pfeile: DsRed-exprimierender, CNPase-positiver Oligodendrozyten, Pfeilköpfe: DsRed-negativer, CNPase-immunreaktiver Oligodendrozyt; **D-E:** Einzelzelle in höherer Vergrößerung, Pfeile: DsRed-exprimierende, CNPase-immunreaktive Oligodendrozyten; **D:** DsRed; **E:** CNPase; **F:** Überlagerung von D und E.

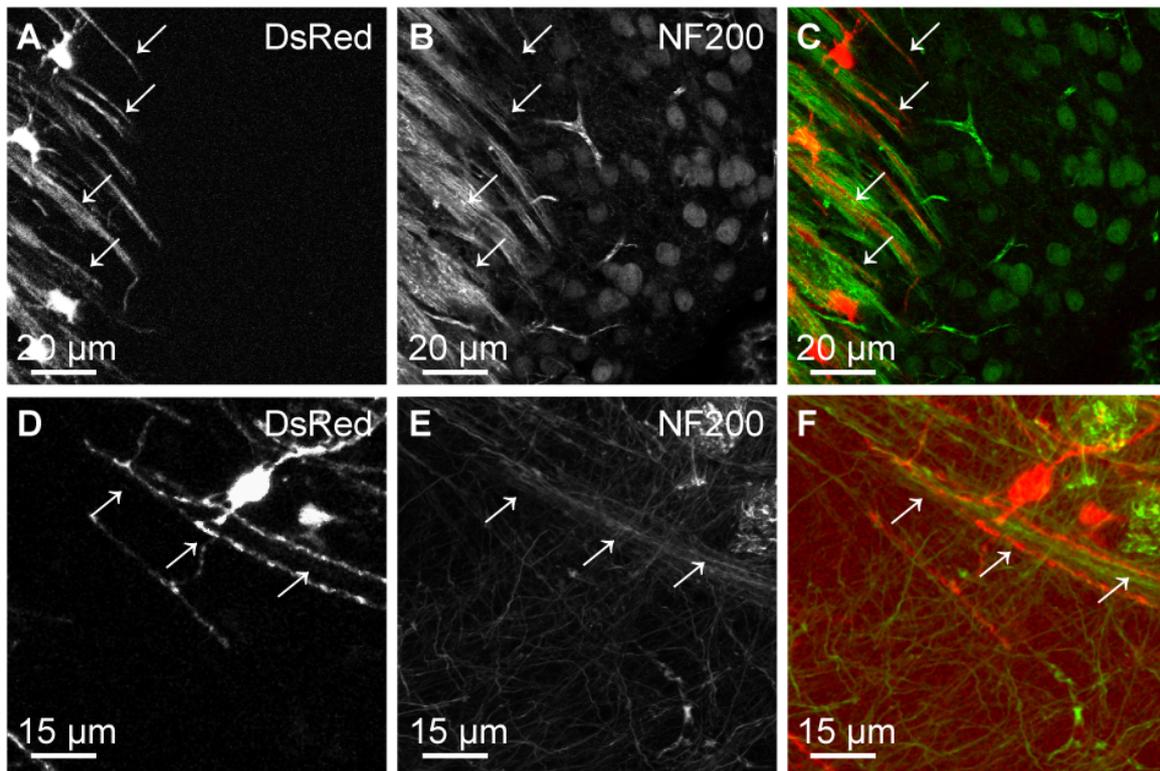


Abb. 12: Immunhistochemische Analyse der NF200-Expression in PLP/DsRed-transgenen Mäusen.

A-C: Striatum, P18; **A:** DsRed; **B:** NF200; **C:** Überlagerung von A und B; **D-F:** Pons P8; **D:** DsRed; **E:** NF200; **F:** Überlagerung von D und E.

Des Weiteren wurde das räumliche Nebeneinander von Oligodendrozytenfortsätzen und Neuriten mit Hilfe von Neurofilamentfärbungen (NF200) studiert. Dies wurde zunächst im adulten Tier vorgenommen, wo keine Kolo-kalisation gesehen wurde (Abb. 12 A-C).

Da, wie o.a., im adulten Tier die Fortsätze der Oligodendrozyten weniger gut zu sehen waren, wurde eine weitere Färbungsserie in juvenilen Tieren (P8) angeschlossen.

Dabei konnte beobachtet werden, dass Fortsätze von jungen Oligodendrozyten sich über längere Strecken Nervenfasern anlagern (Abb. 12 D-F). Die ersten myelinisierten Nervenfasern konnten im Bereich des motorischen Trigemuskerns,

der *Fasciculi cuneatus et gracilis*, der *Decussatio lemniscorum* und in den *Tractus spinocerebellares* bereits P8 gesehen werden. (Abb.6). Hier konnte mit Hilfe der NF200-Färbung die langstreckige Anlagerung vor Oligodendrozytenfortsätzen dargestellt werden (Abb. 12 D-F).

3.1.5 DsRed – Expression erlaubt die Darstellung der Fortsatzaussprossung

Zur Darstellung des Wachstums oligodendrozytärer Fortsätze wurden unmittelbar nach Tötung unperfundierter vier Tage alter Tiere (P4) Schnitte aus dem Hirnstamm präpariert und unter Carbogen-Begasung sowie ständiger Perfusion der Beobachtungskammer mit artifizieller Zerebrospinalflüssigkeit (ACFS) über drei Stunden mit Hilfe eines CLSM beobachtet. Es zeigte sich das Wachstum filopodienartiger Strukturen am Ende der Fortsätze (Abb. 13)

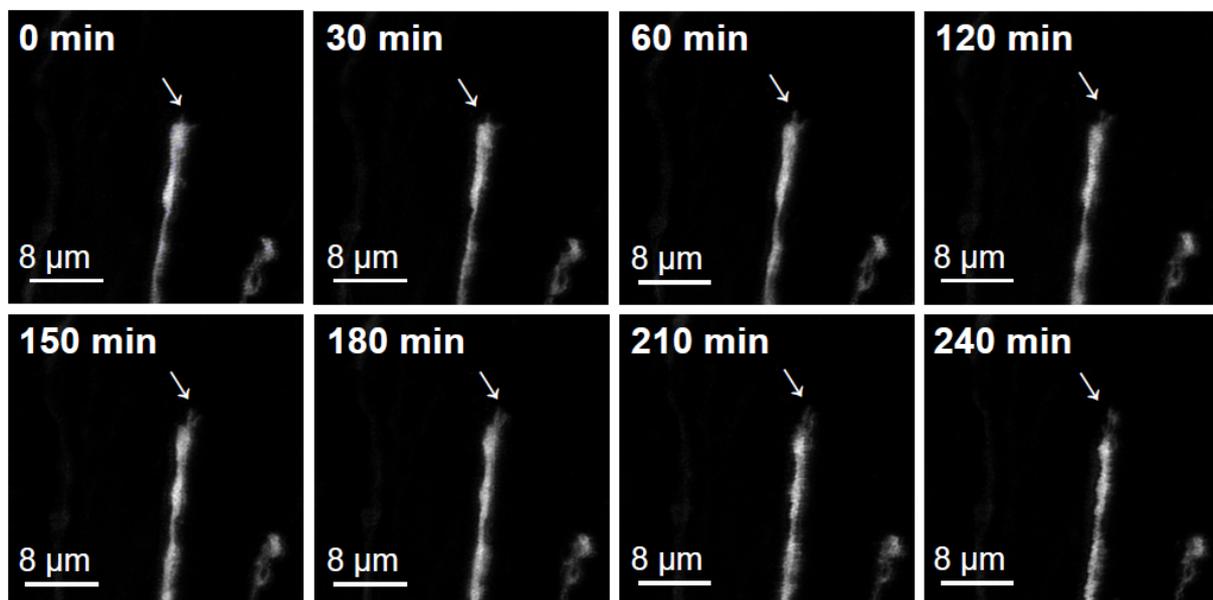


Abb.13: DsRed-Expression in den Fortsätzen junger Oligodendrozyten erlaubt die Darstellung der Aussprossung filopodienartiger Strukturen.

Zeiterie über 240 min mit Hilfe konfokaler Laserscan-Mikroskopie (P4).

3.1.6 Patch-Clamp-Analyse in PLP-DsRed-exprimierenden Oligodendrozyten

Patch-Clamp-Studien wurden in Tieren zwischen P2 und P6 gemacht. Es wurden telenzepale Oligodendrozyten im *Striatum* untersucht, um auszuschließen, dass die Expression von DsRed die Physiologie der Zellen verändert (Hirrlinger PG et al. 2005).

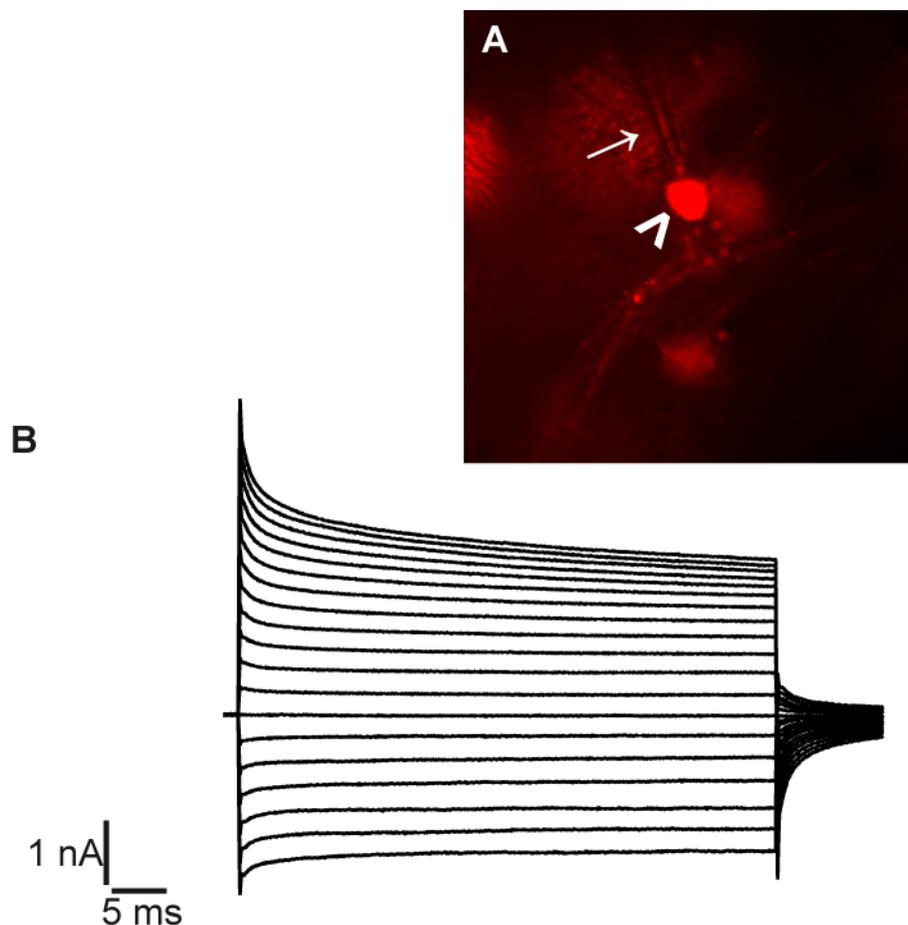


Abb. 14: Elektrophysiologische Analyse eines striatalen Oligodendrozyten.

A: Epifluoreszenz-Bild (Aufnahme mit einer CCD-Kamera); Pfeilkopf zeigt Soma einer DsRed-exprimierenden Zelle, Pfeil zeigt Patchpipette. **B:** Stromantworten nach Induktion durch Applikation einer Serie von hyper- und depolarisierenden Spannungssprüngen.

Die Zellen wurden im Ganzzellmodus bei -60 mV gehalten. Es wurden 10 mV-Spannungssprünge zwischen -130 mV und $+50$ mV appliziert, was bei beinahe allen

Zellen symmetrische Stromantworten nicht gleichrichtender, passiver Kaliumströme hervorrief (Abb.14 B). Das mittlere Membranpotenzial lag bei -60mV ($\pm 10\text{ mV}$). In Zusammenarbeit mit Frau Dr. Anja Scheller (Arbeitsgruppe Gliaphysiologie und Imaging, MPI Exp. Med., Göttingen) wurden zwanzig Oligodendrozyten untersucht.

3.2 Läsionsmodell in einer *hGFAP-EGFP/PLP-DsRed*-doppeltransgenen Maus

Um die Reaktion von Astrozyten und Oligodendrozyten auf mechanische Stichläsionen simultan studieren zu können, wurden in vier adulten *hGFAP-EGFP/PLP-DsRed*-doppeltransgener Mauslinien stereotaktisch Stichwunden mit Hilfe einer 1,6 mm starken Kanüle gesetzt. Die Auswirkungen dieser Stichwunde wurden mit Hilfe fluoreszenzmikroskopischer, immunchemischer und elektrophysiologischer Methoden so wie mit Zellkulturtechniken untersucht.

3.2.1 Stichwunden führen zu einer verstärkten EGFP-Expression

Zur Analyse der astrozytären Reaktion auf die beschriebene Läsion wurden lädierte Tiere 4 (4 pOP), 8, 12, 16 und 21 Tage nach der Operation getötet und untersucht.

Es handelte sich um vier bis 12 Monate alte Tiere. Dieses Alter wurde gewählt, um die Aktivierung des in gesunden Tieren bereits herunter regulierten Transgens unter den Bedingungen der mechanischen Läsion zu beobachten (Pfeile in Abb. 15 A).

Es zeigte sich eine starke, kortikale Aktivierung des *hGFAP/EGFP*-Transgens in der Umgebung der Läsion. Zur Kontrolle wurde die kontralaterale Seite im gleichen Abstand zur *Falx* beobachtet (Pfeile in Abb. 15 B).

Immunhistochemische Analysen zeigten eine deutliche Aktivierung der endogenen GFAP-Expression auf der Läsionsseite (Pfeilköpfe in Abb. 15 A). Kontralateral war zu diesem Zeitpunkt immunhistochemisch nur sehr geringe GFAP-Immunreaktivität

detektierbar (Pfeile in Abb. 15 B). Sowohl EGFP-Expression wie auch GFAP-Immunhistochemie zeigten dabei die typische Morphologie aktivierter Astrozyten mit sternförmig ausgebreiteten Fortsätzen (Abb.15 und 19).

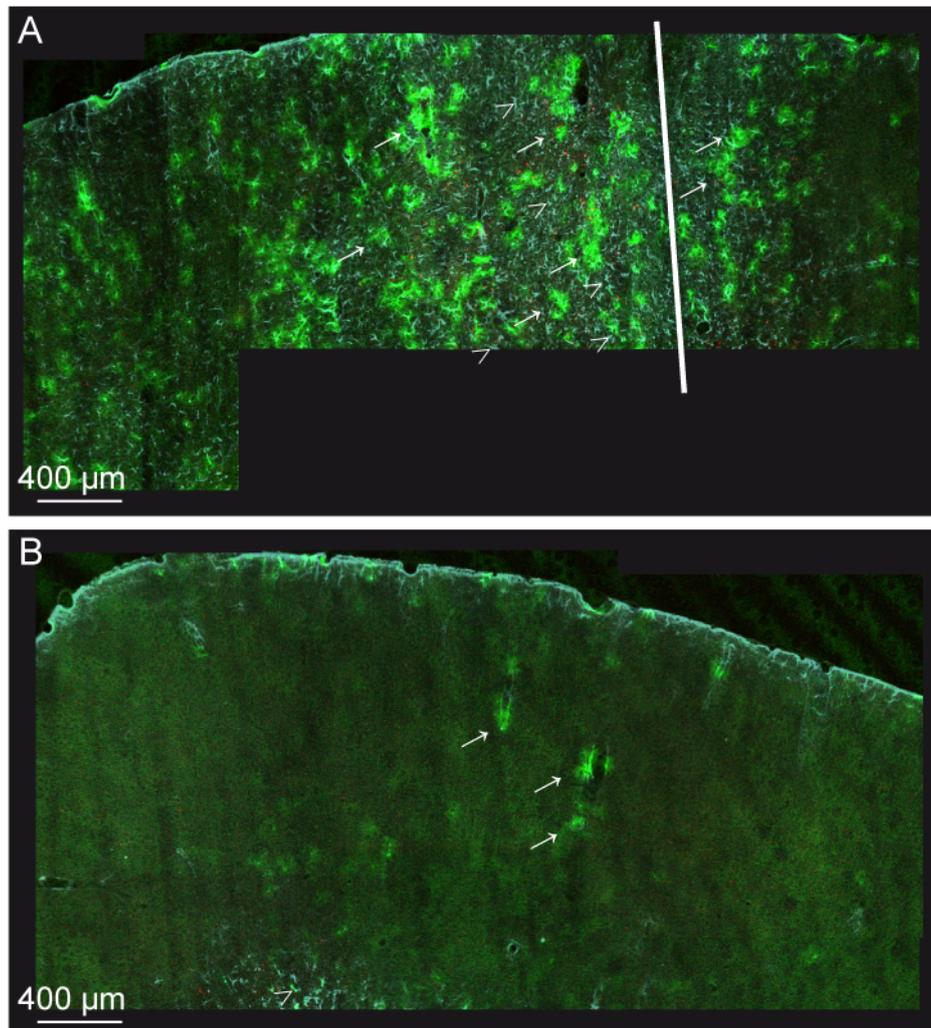


Abb. 15: Immunhistochemische Analyse der Expression endogenen GFAPs in hGFAP-EGFP/PLP-DsRed-doppeltransgenen Mäusen nach kortikaler Stichverletzung.

A: Seite der Läsion (weißer Balken zeigt Stichkanal); **B:** kontralaterale Kontrolle: EGFP-exprimierende Astrozyten (weiße Pfeile) und GFAP-Immunhistochemie (weiße Pfeilköpfe). **Blau:** GFAP-Immunreaktivität, **Grün:** EGFP, **Rot:** DsRed; beide Abbildungen zusammengesetzt aus MIPs konfokal aufgenommener Bildstapel.

Dabei überlappten die Expression des hGFAP/EGFP-Transgens und die Immunreaktivität des endogenen GFAP nach einer Abschätzung nur zu ca. 10 %. Ein

großer Teil der GFAP-positiven Astrozyten exprimierten wie schon im gesunden Tier nicht das Transgen (Pfeilköpfe in Abb. 15 A).

Umgekehrt exprimierten alle hGFAP/EGFP-positiven Zellen GFAP, das immunhistochemisch detektierbar war (Abb. 15 A und Abb. 19 A, C und D).

3.2.2 Stichwunden führen zu einer verstärkten Expression von DsRed in Oligodendrozyten

Stichläsionen bewirkten auch in DsRed-exprimierenden Oligodendrozyten eine verstärkte Transgenexpression. Diese folgte der Verstärkung der hGFAP/EGFP-Transgenexpression im Abstand von vier bis fünf Tagen.

Die Aktivierung des PLP/DsRed-Transgens konnte ab dem Zeitpunkt 4 pOp gefunden werden und erreichte ihr Maximum 8 pOp, war aber auch 16 pOp und auch 21 pOp noch zu beobachten (Abb. 16). Sie war weniger homogen über die Läsion hinweg verteilt, als die Aktivierung des GFAP/EGFP-Transgens. Sie trat teilweise im *Corpus callosum* stark akzentuiert auf (Abb. 22, 8pOp).

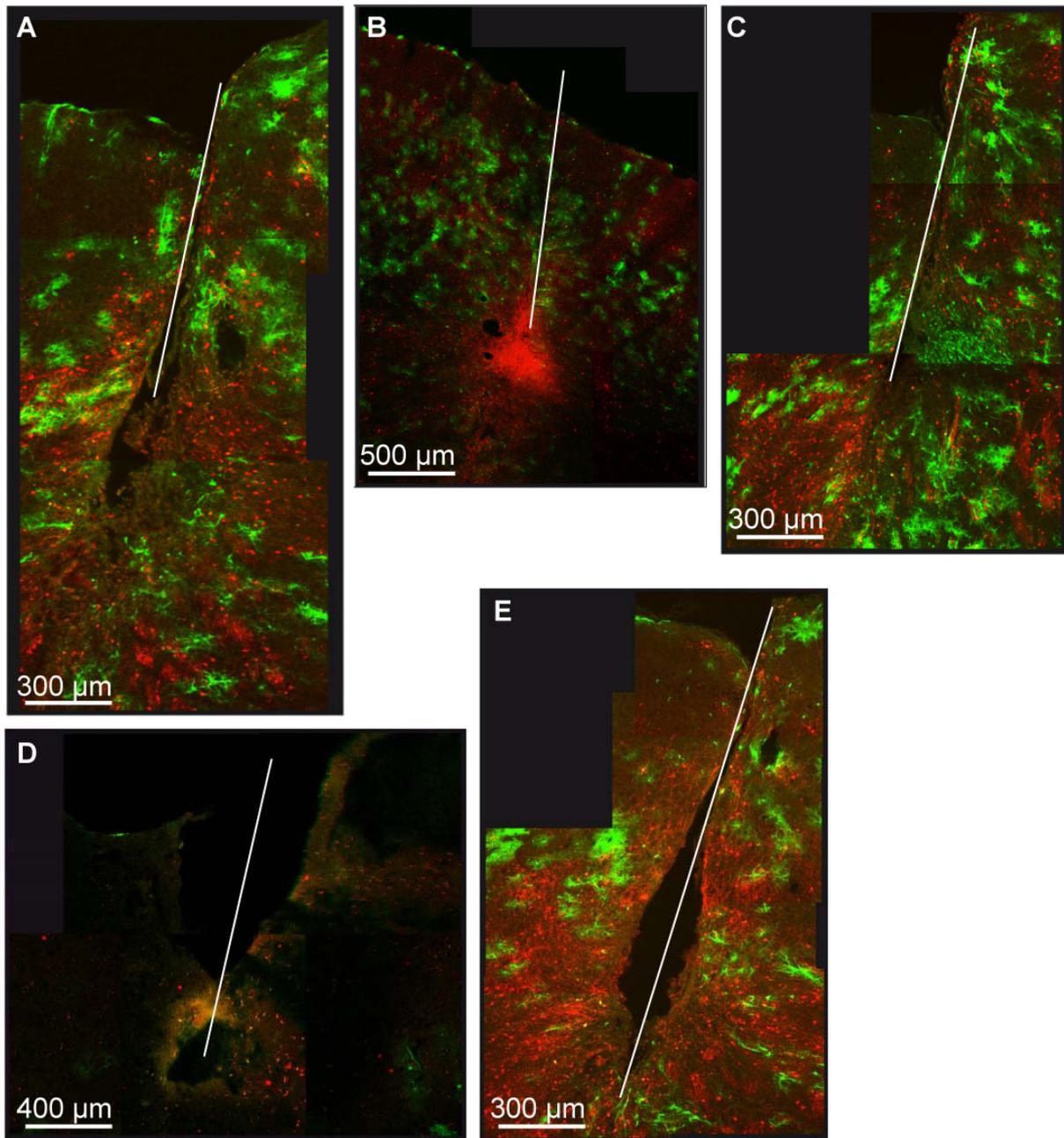


Abb. 16: Zeitlicher Verlauf der Expression der hGFAP- und PLP-DsRed-Transgene zwischen dem achten und dem 21. postoperativen Tag nach Induzierung der Stichwunde.

A: 4 pOp; B: 8 pOp; C: 12 pOp; D: 21 pOp; E: 16 pOp; weißer Balken zeigt Stichkanal.

3.2.3 Nach Induzierung von Stichläsionen treten hGFAP-EGFP/PLP-DsRed-doppeltransgene Zellen auf

3.2.3.1 Auftreten

In der Umgebung von Läsionen konnten in adulten Tieren bereits vier Tage nach Setzen der Läsion (4 pOp) in deren direkter Umgebung Zellen detektiert werden, die durch ihre Fluoreszenzmuster die Expression sowohl des PLP/DsRed- wie auch des GFAP/EGFP-Transgens anzeigten. Ihr Auftreten war zwar hinsichtlich des zeitlichen Verlaufs und der Menge variabel, aber konstant nachweisbar.

In adulten Tieren erreichte es sein Maximum zum Zeitpunkt 8 pOp (Abb. 23) und fiel dann bis zum Zeitpunkt 21 pOp ab, wo nur noch vereinzelt Zellen nachgewiesen werden konnten (Abb. 24).

Waren die Zellen auch variabel weit von der Läsion entfernt (z.T. bis mehrere Millimeter), so konzentrierte sich ihr Auftreten doch auf die unmittelbare Umgebung der Läsion (bis 200 µm).

Bei verschieden tief ausgeführten Läsionen konnten doppeltransgene Zellen in diversen Hirnarealen gefunden werden: im motorischen Kortex, dem *Corpus callosum*, dem *Putamen* und dem Hippokampus. Außerhalb lädierter Areale wurden zu keinem Zeitpunkt doppeltransgene Zellen gefunden. Dies galt auch für die adulte SVZ.

3.2.3.2 Morphologie der hGFAP-EGFP/PLP-DsRed-doppeltransgenen Zellen

hGFAP-EGFP/PLP-DsRed-doppeltransgene Zellen zeigten eine variable Morphologie. Der jeweilige Anteil der beiden Proteine schwankte ebenfalls stark (Abb. 17 A-C).

Es fanden sich hauptsächlich sternförmige, astrozytenähnliche Phänotypen mit zahlreichen Fortsätzen (Abb.17 D-F) wie auch uni- und bipolare Zellen mit O2A-ähnlichem Phänotyp (Abb.17 G-I). Zum Teil zeigten die Zellen sehr lange, irregulär geformte Fortsätze (siehe Immunhistochemische Charakterisierung, Abb. 21).

Eine Korrelation zwischen Morphologie und zeitlichem Verlauf bzw. räumlicher Verteilung konnte nicht erkannt werden. An vielen Stellen konnten einfach transgene Zellen direkt nebeneinander wie auch direkt neben doppeltransgenen Zellen gefunden werden (Abb. 17, Sterne).

Um auszuschließen, dass es sich bei den als doppeltransgen charakterisierten Zellen um ein Überlagerungsartefakt eng benachbarter einfach transgener Zellen handelt, wurden aus dreidimensionale Bildstapeln konfokaler Einzelbilder dreidimensionale Rekonstruktionen erstellt, die klar belegten, dass tatsächlich DsRed und EGFP in den jeweiligen Zellen detektierbar sind (Abb.17 G-I).

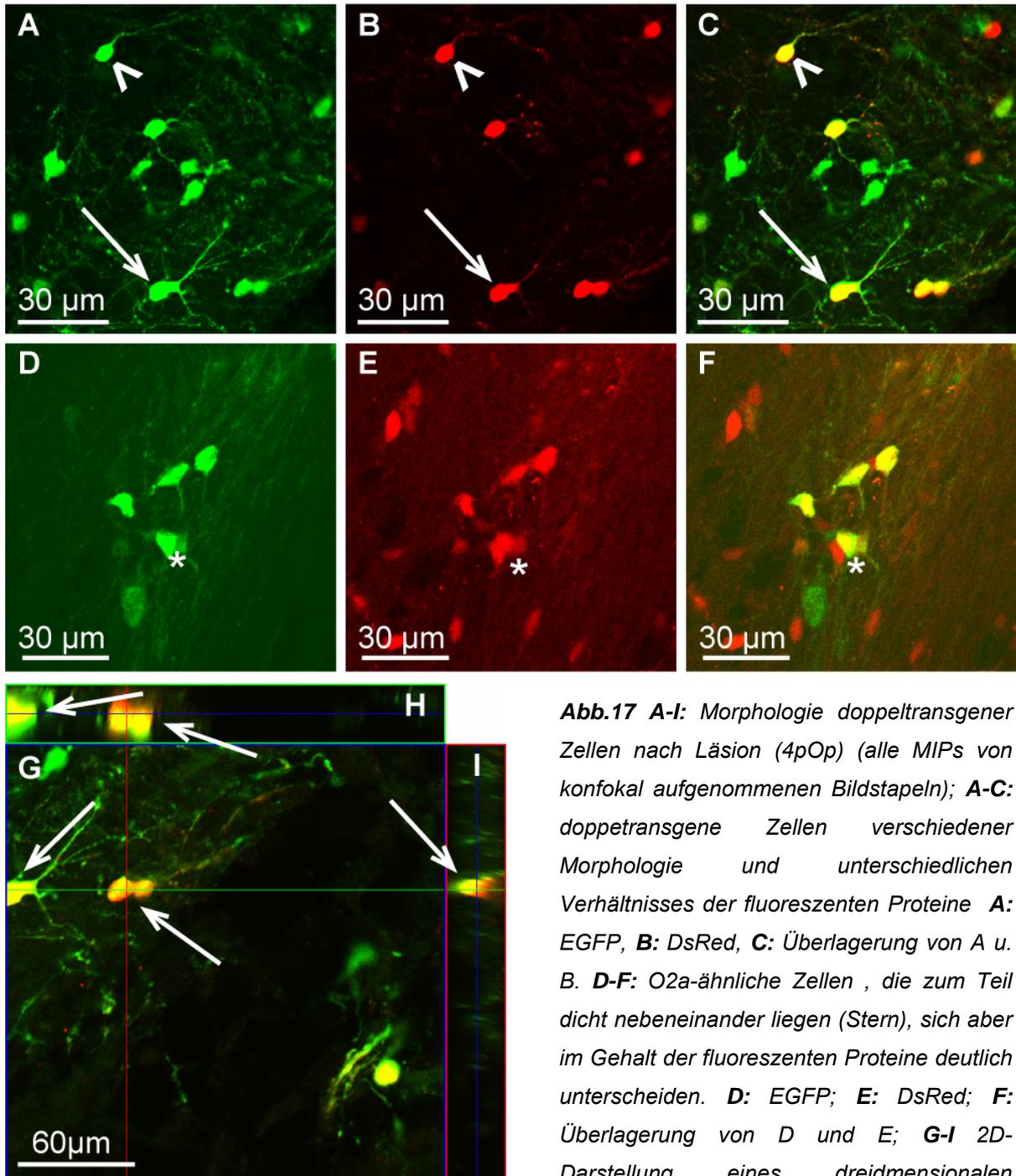


Abb.17 A-I: Morphologie doppeltransgener Zellen nach Läsion (4pOp) (alle MIPs von konfokal aufgenommenen Bildstapeln); **A-C:** doppeltransgene Zellen verschiedener Morphologie und unterschiedlichen Verhältnisses der fluoreszenten Proteine **A:** EGFP, **B:** DsRed, **C:** Überlagerung von A u. B. **D-F:** O2a-ähnliche Zellen, die zum Teil dicht nebeneinander liegen (Stern), sich aber im Gehalt der fluoreszenten Proteine deutlich unterscheiden. **D:** EGFP; **E:** DsRed; **F:** Überlagerung von D und E; **G-I** 2D-Darstellung eines dreidimensionalen Bildstapels, Pfeile zeigen korrespondierende

Zellen: **G:** MIP, **U,I:** Rekonstruktion der Seitenansicht des Stapels aus x- und y-Richtung, grüne Linie zeigt Schnittebene H, rote Linie zeigt Schnittebene I; „gelbe“ Fluoreszenz ergibt sich nicht durch Überlagerung in der Z-Ebene eng benachbarter Zellen, sondern durch Koexpression des hGFAP-EGFP- und des PLP-DsRed Transgens in einer Zelle.

3.2.3.3 Immunhistochemische Charakterisierung

3.2.3.3.1 cD11b- (Mac-1)-Immunhistochemie schließt Phagozytose fluoreszenter Proteine durch Makrophagen aus

Um auszuschließen, dass es sich bei den DsRed- und GFAP - enthaltenden Zellen um Makrophagen bzw. Mikroglia handelte, die tote Astrozyten und Oligodendrozyten oder EGFP und DsRed phagozytiert hatten, das bei der Läsion frei geworden war, wurde gegen den Makrophagenmarker CD11b (Mac-1) immunhistochemisch gefärbt. Diese Färbungen wurden zum Zeitpunkt 16 pOp durchgeführt. Die Ausdehnung auf weitere Zeitpunkte nach Induktion der Läsion schien nicht notwendig, da dem Auftreten der doppelfluoreszenten Zellen zu jedem Zeitpunkt der gleiche Mechanismus zu Grunde liegen sollte.

Diese Färbung zeigte eine deutliche Anhäufung aktivierter Mikroglia resp. Makrophagen in der Umgebung der Läsion an (siehe Pfeilköpfe in Abb. 18).

Es wurden jedoch keine CD11b-positiven Zellen gefunden, die zugleich Expression des hGFAP/EGFP- und des PLP/DsRed-Transgens zeigten (siehe Pfeile in Abb. 18). Ebenso wenig konnten cD11b-positive Zellen detektiert werden, die jeweils nur EGFP- oder DsRed-Fluoreszenz zeigten.

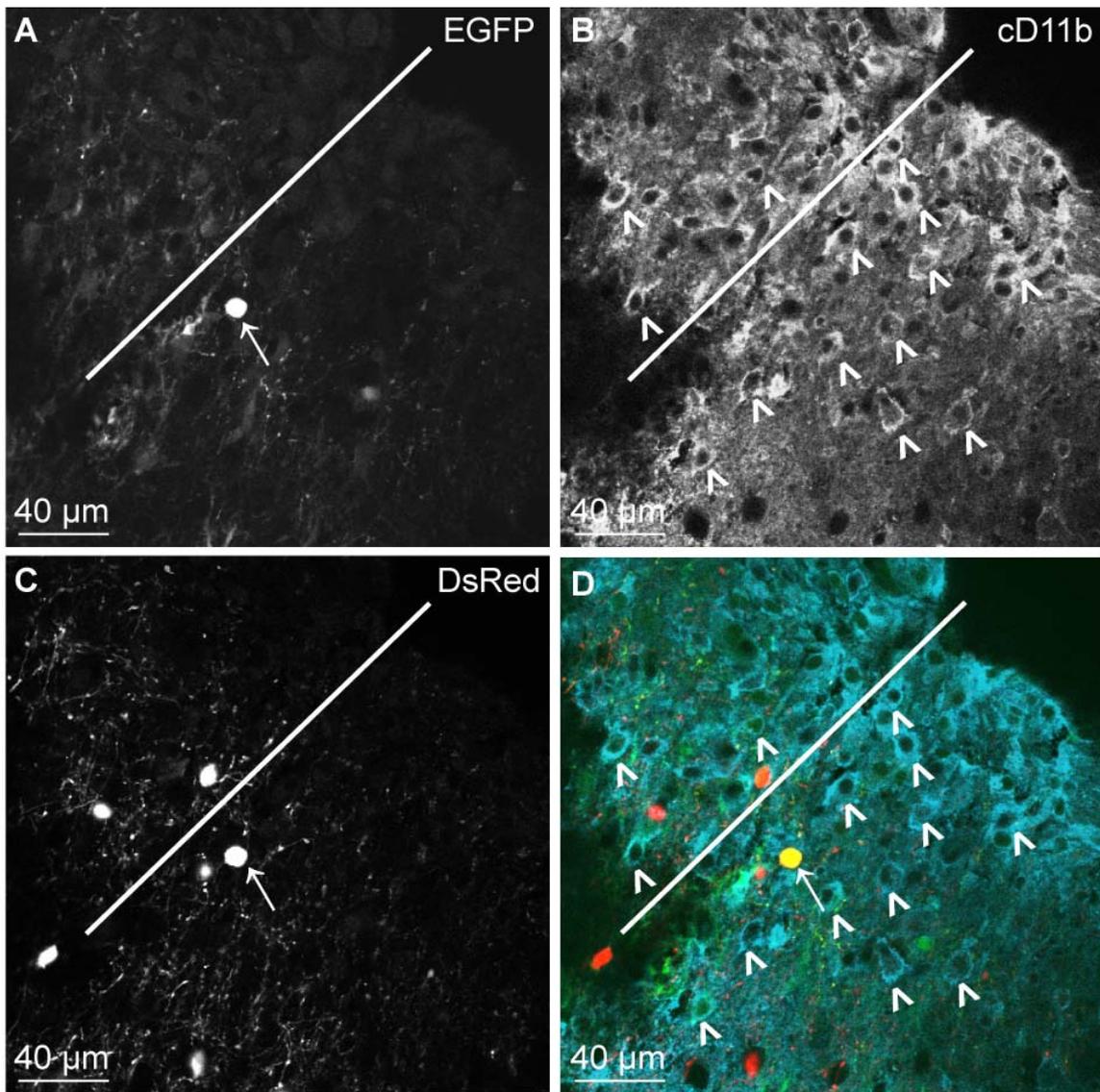


Abb. 18: Immunhistochemische Analyse der Expression des Mikrogliamarkers CD11b (Mac-1) in hGFAP-EGFP/PLP-DsRed-doppeltransgenen Mäusen nach kortikaler Stichläsion.

A: .EGFP; **B:** cD11b-Immunhistochemie; **C:** EGFP; **D:** Überlagerung von A-C. Weißer Balken zeigt Stichkanal.

3.2.3.3.2 GFAP-Immunhistochemie zeigt Aktivierung endogenen GFAP's, jedoch nur geringe Kolo-kalisation mit dem hGFAP/EGFP-Transgen

GFAP wurde zu den Zeitpunkten 4 pOp, 8 pOp und 16 pOp immunhistochemisch gefärbt. Abbildung 19 zeigt exemplarisch das Färbeergebnis zum Zeitpunkt 8pOp.

GFAP war in der Umgebung der Läsion weiträumig hochreguliert (siehe Abb. 15 A bzw. Abb.14 B als interne Kontrolle in Form der kontralateralen Hemisphäre).

Ihr Maximum erreichte die Aktivierung endogenen GFAPs zum Zeitpunkt 8 pOp.

Längst nicht alle immunhistochemisch GFAP-positiven Zellen exprimierten auch das hGFAP/EGFP-Transgen. Der Anteil betrug etwa 10%.

Umgekehrt gab es hGFAP/EGFP-positive Zellen, die kein GFAP exprimierten (Abb. 15 A und B, Abb. 19). Dies traf auf den größten Teil dieser Zellen zu. Anhand ihrer Morphologie konnten diese jedoch einem astrozytären Phänotyp zugeordnet werden (Abb. 19).

hGFAP-EGFP/PLP-DsRed-doppeltransgene Zellen exprimierten zu keinem Zeitpunkt endogenes GFAP (Abb. 19 D).

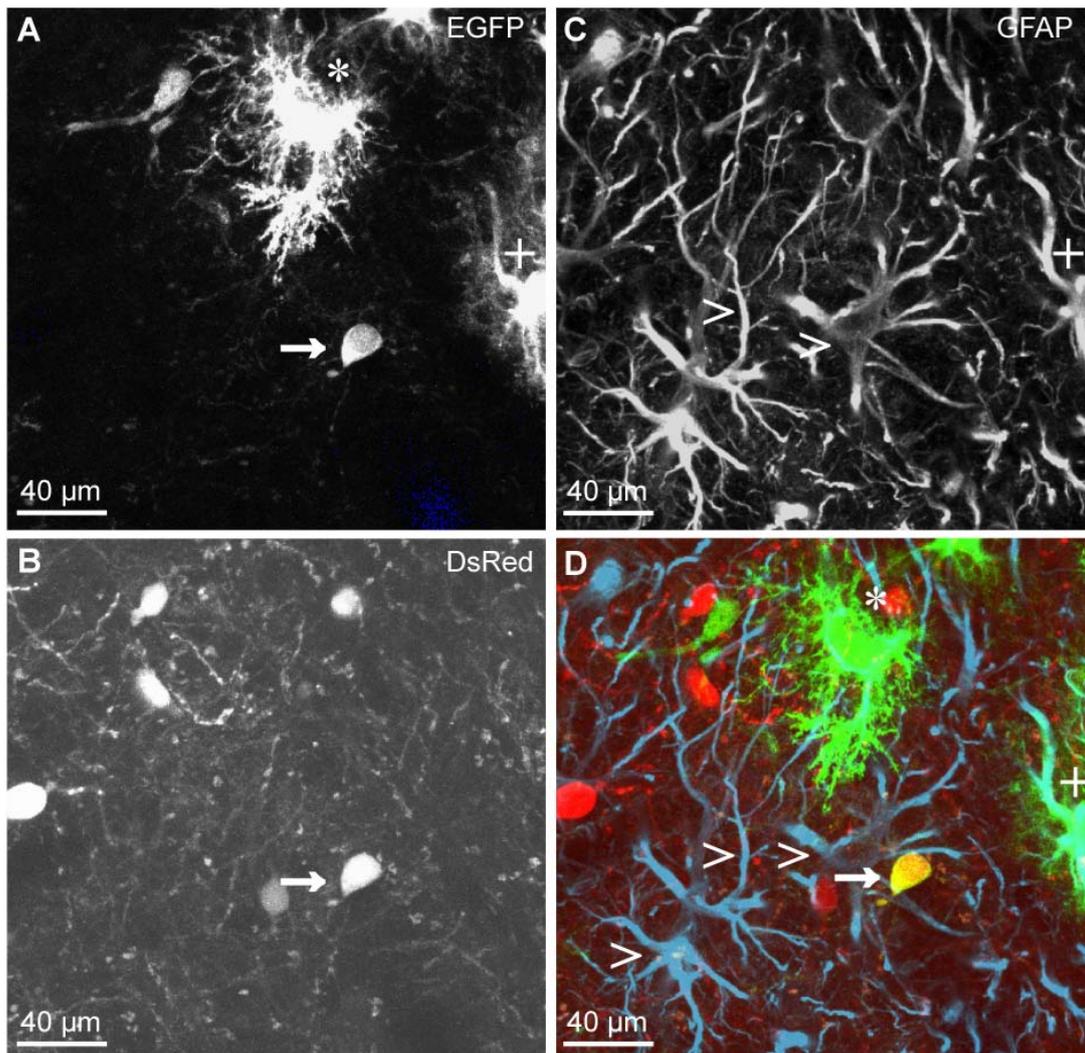


Abb. 19: Immunhistochemische Analyse der GFAP-Expression in einem PLP-DsRed/GFAP-EGFP-doppeltransgenen Tier zum Zeitpunkt 8pOp.

A-E: GFAP-positive Zellen (Pfeilspitzen) umgeben in großer Zahl eine hGFAP-EGFP/PLP-DsRed - doppeltransgene Zelle (Pfeil), die selbst kein endogenes GFAP exprimiert; hGFAP-EGFP-positive Zellen sind z.T. GFAP-immunreaktiv (Kreuz) z.T. GFAP-negativ (Stern). A: EGFP; B: DsRed; C: GFAP; D: Überlagerung von A-C.

3.2.3.3.3 Immunhistochemische Analyse der Expression von NG2 in hGFAP-EGFP/PLP-DsRed-doppeltransgenen Mäusen

Es wurde zu den Zeitpunkten 4 pOp, 8 pOp, 16 pOp und 21 pOp gegen NG2 immunhistochemisch gefärbt.

Um die Läsion konnte eine Hochregulierung des Epitops gefunden werden, die bis zum 16. Tag nach der Operation detektierbar war.

Nur 4- und 8 pOp stellte sich ein geringer Anteil der hGFAP-EGFP/PLP-DsRed-positiven Zellen NG2-positiv dar. Auf einer Fläche von 100 μm^2 konnten drei Zellen gefunden werden. Die meisten NG2-positiven Zellen zeigten somit keine Transgenexpression. Es konnten jedoch hGFAP/EGFP-positive Zellen gefunden werden, die NG2-positiv waren. Darüber hinaus fanden sich hGFAP/EGFP-positive Astrozyten, die NG2 exprimierten (Abb. 19).

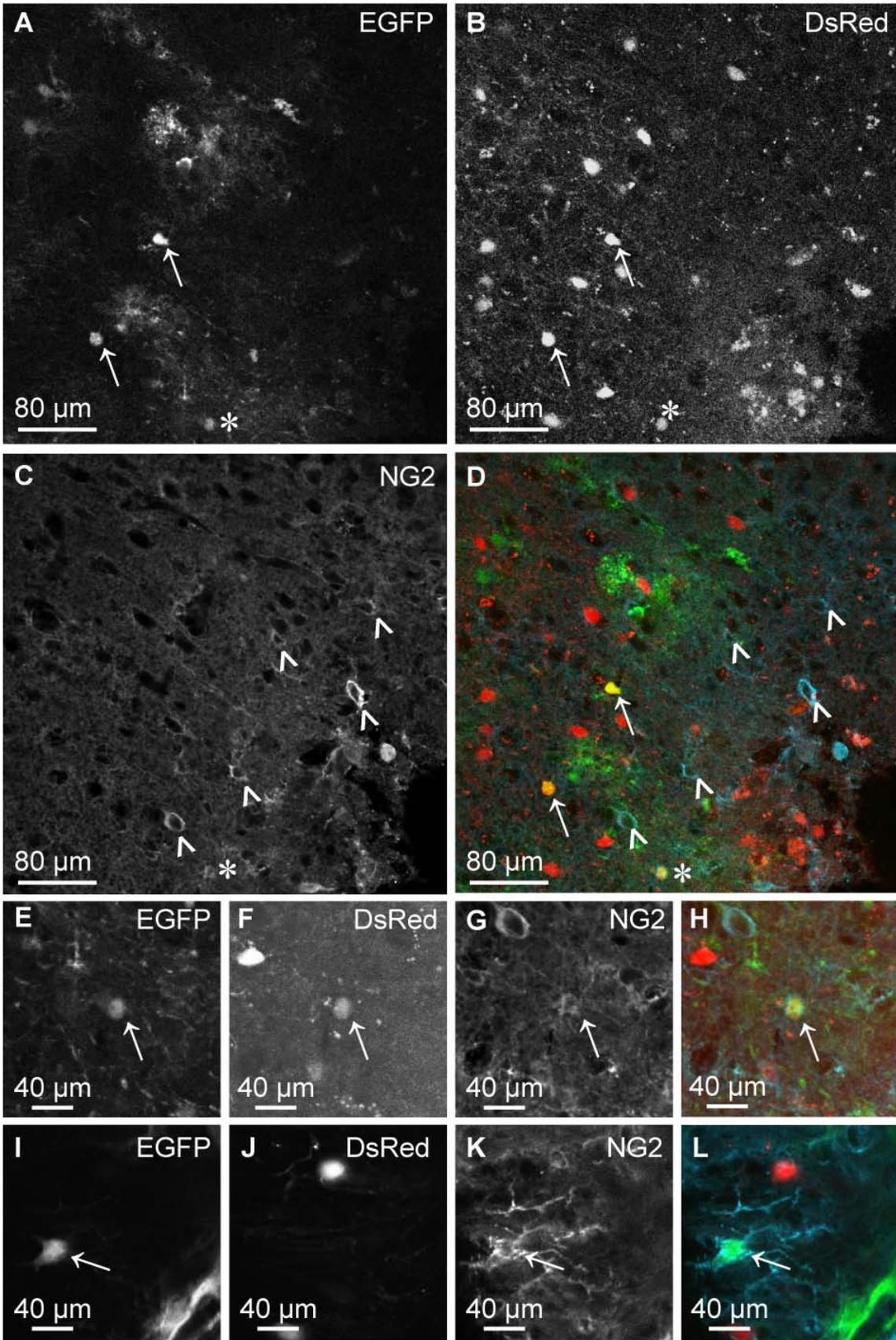


Abb. 20 A-L: Immunhistochemische Analyse zur Detektion von NG2 in hGFAP-EGFP/PLP-DsRed-doppeltransgenen Mäusen zum Zeitpunkt 4pOp.

A-D: NG2-Expression ist in einem ca. 50µm breiten Saum um die Läsion herum erhöht (Pfeilspitzen). Die Mehrzahl hGFAP-EGFP/PLP-DsRed+ Zellen ist NG2- (Pfeile), einige wenige aber positiv (Stern); **A:** EGFP, **B:** DsRed; **C:** NG2; **D:** Überlagerung von A-C; **E-H:** NG2-positive Zelle in höherer Vergrößerung; **E:** EGFP; **F:** DsRed; **G:** NG2; **H:** Überlagerung von E-G; **I-L:** NG2- und hGFAP/EGFP-positiver Astrozyt in der Umgebung der Läsion (Pfeile), (Maßstäbe 10µm); **I:** EGFP; **J:** DsRed; **K:** NG2; **L:** Überlagerung von I-K; (alle MIPs von konfokal aufgenommenen Bildstapeln)

3.2.3.3.4 Immunhistochemische Analyse zur Detektion von TUC4b

Gegen Ende der gleichzeitigen Expression der beiden Transgene (hGFAP-EGFP/PLP-DsRed), nämlich 16 Tage nach der Operation, wurde immunhistochemisch auf TUC4b gefärbt, um einen Hinweis auf Differenzierung in einen neuronalen Phänotyp zu erhalten. TUC4b wird typischerweise in den Fortsätzen pluripotenter Zellen exprimiert, die sich in einen neuronalen Phänotyp zu differenzieren beginnen, jedoch nicht endgültig ausdifferenziert sind.

In der Umgebung der Läsion konnten zahlreiche TUC4b-positive Zellfortsätze gefunden werden (Abb. 21 C).

Es zeigte sich in einem sehr geringen Teil der Zellen Expression von TUC4b in den Fortsätzen (Abb. 21 A-D). Diese Zellen zeigten die bereits o.a. Morphologie: Sie besaßen mehrere, weit ausgreifende, dünne Fortsätze (Pfeile in Abb. 21).

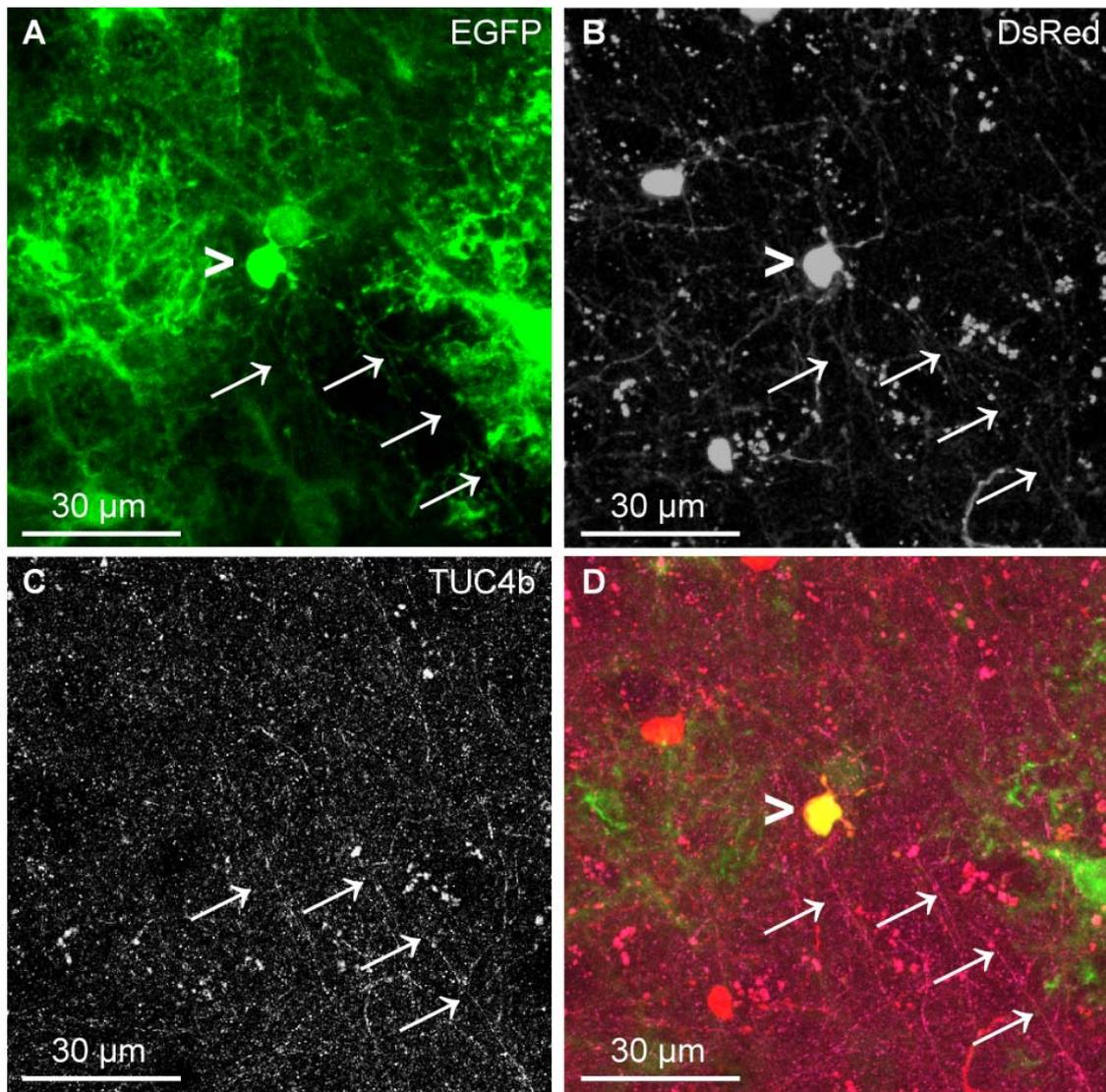


Abb. 21: Immunhistochemische Analyse der Expression von TUC4b in hGFAP-EGFP/PLP-DsRed-doppeltransgenen Mäusen am 16. Tag nach Setzen der Stichläsion.

Pfeile zeigen zwei TUC4b-positive Fortsätze einer hGFAP-EGFP/PLP-DsRed doppeltransgene Zelle, Pfeilköpfe zeigen Soma einer hGFAP-EGFP/PLP-DsRed doppeltransgene Zelle: A: EGFP; B: DsRed; C: TUC4b-Immunhistochemie; D: Überlagerung von A,B und C.

3.2.3.3.5 Analyse der Proliferationsrate mit Hilfe des Mitosemarkers

Phosphohiston 3

Zur Detektion sich im Mitoseprozess befindlicher hGFAP-EGFP/PLP-DsRed-doppletransgener Zellen wurden immunhistochemische Färbungen gegen den Mitosemarker Phosphohiston H3 (PH3) durchgeführt. Neben der BrDU-

injektionsmethode (Leif et al. 2004) diente diese Methode als zweites Proliferationsassay (Hendzel et al. 1997). Zu keinem Zeitpunkt konnte PH 3 in den fraglichen Zellen nachgewiesen werden.

Abb.22 zeigt exemplarisch eine PH3-Immunhistochemie acht Tage nach der Operation.

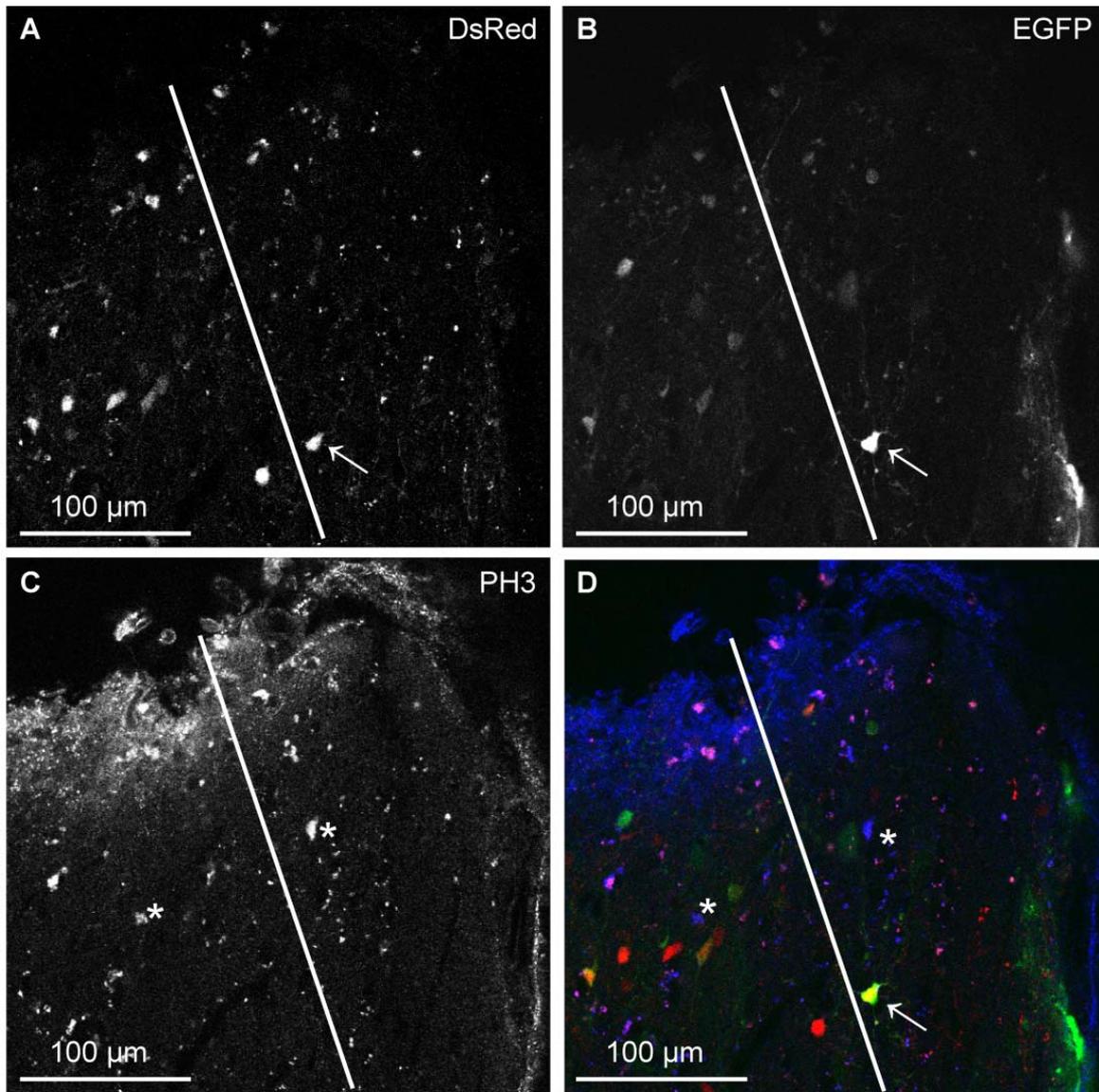


Abb. 22: Immunhistochemische Analyse der Proliferation Mittels des Mitosemarkers PH3 in hGFAP-EGFP/PLP-DsRed-doppeltransgenen Mäusen.

A: DsRed; **B:** EGFP; **C:** PH3-Immunhistochemie; **D:** Überlagerung von A-C. Es kann kein PH3 in hGFAP-EGFP/PLP-DsRed – doppeltransgenen Zellen detektiert werden.

3.2.3.3.6 Analyse der Proliferation mit Hilfe von Bromodesoxyuridin

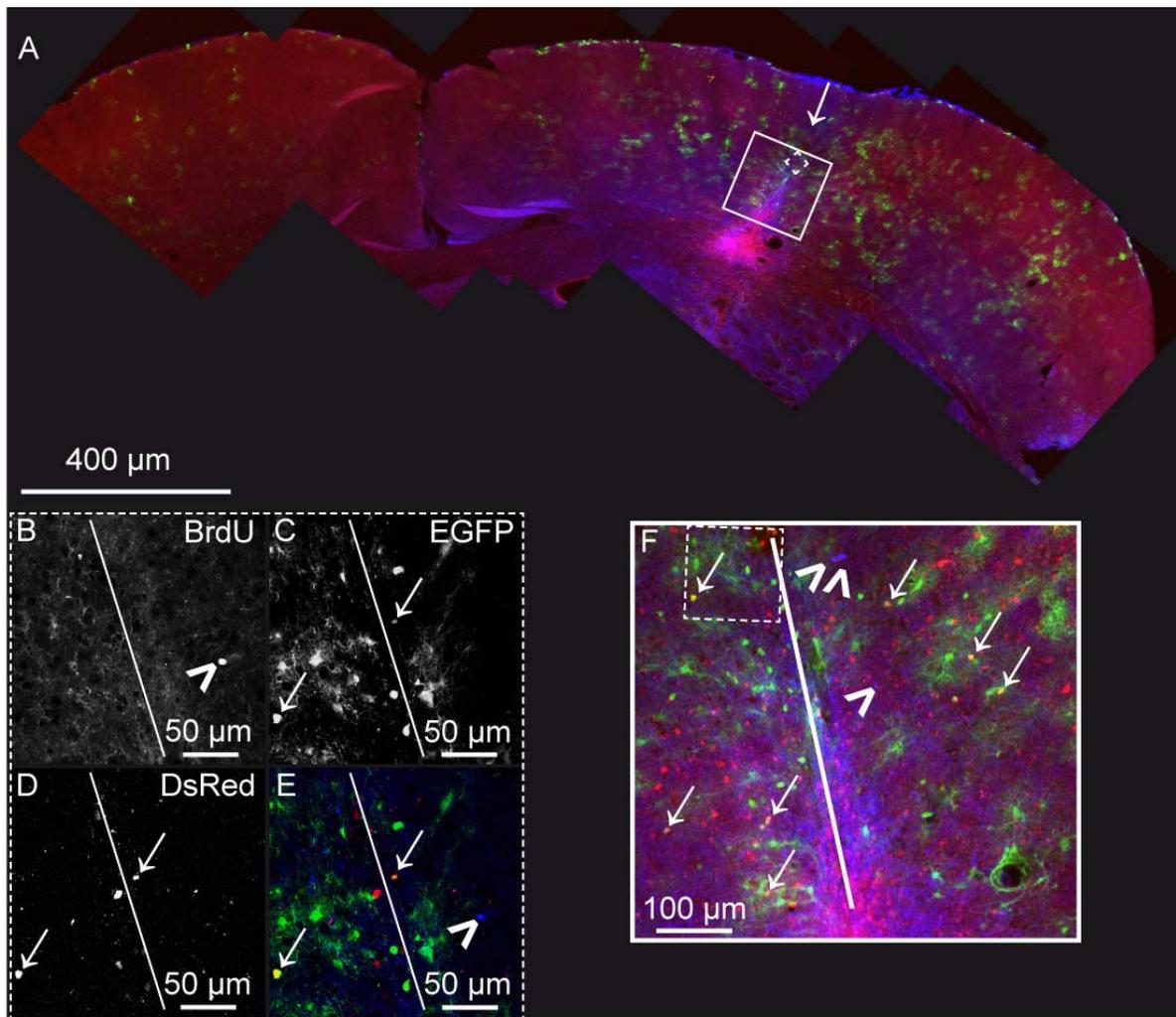


Abb. 23: Analyse der Proliferation mittels BrdU-Immunhistochemie in hGFAP-EGFP/PLP-DsRed-doppeltransgenen Mäusen acht Tage nach der Operation.

BrdU wurde vom ersten bis zum siebten postoperativen Tag injiziert: **A: Übersicht:** Ansicht von kaudal, Läsion wurde in der rechten Hemisphäre induziert (Pfeil zeigt Stichrichtung), deutliche Aktivierung beider Transgene in der Umgebung der Läsion, wenig Transgenexpression kontralateral (4 Monate altes Tier). **B – E** Vergrößerung des durch gestricheltes Quadrat angezeigten Ausschnitts in A, Balken zeigt Stichkanal, Pfeilköpfe zeigen BrdU-positive Zelle, Pfeile zeigen hGFAP-EGFP/PLP-DsRed-doppeltransgene Zellen; **B:** BrdU-Immunhistochemie; **C:** EGFP; **D:** DsRed; **E:** Überlagerung von B,C und D; **F:** Vergrößerung des in A durch durchgezogenes Quadrat angezeigten Bildausschnitts: Balken zeigt Stichkanal, Pfeile zeigen hGFAP-EGFP/PLP-DsRed-doppeltransgene Zellen, Pfeilköpfe zeigen BrdU-positive Zellen.

Zur Detektion von Zellteilungsaktivität während der Phase der Expression beider Transgene wurde den Tieren unmittelbar nach der Operation BrdU intraperitoneal

injiziert (Leif et al. 2004; Goebbels et al. 2006) (100µg/g Körpergewicht). Es folgten dann tägliche Injektionen bis einen Tag vor der Perfusion. Dies wurde für die Zeitpunkte 4 pOp und 21 pOp durchgeführt.

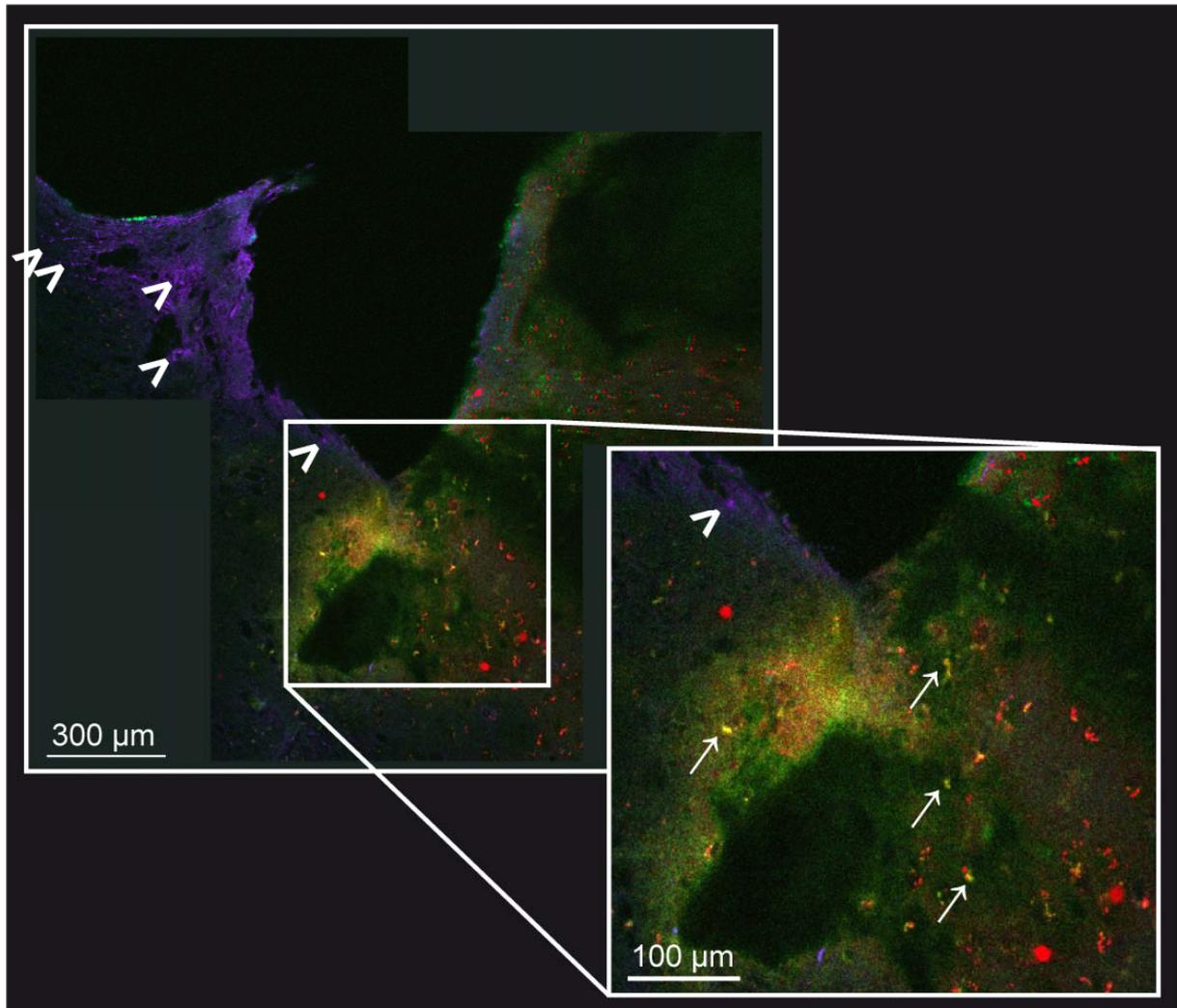


Abb. 24: Analyse der Proliferation mittels BrdU-Immunhistochemie in hGFAP-EGFP/PLP-DsRed-doppeltransgenen Mäusen 21 Tage nach der Operation.

BrdU wurde vom achten bis zum 20. postoperativen Tag injiziert: Pfeilköpfe zeigen BrdU-positive Zellen, Pfeile zeigen zeigen hGFAP-EGFP/PLP-DsRed-doppeltransgene Zellen.

3.2.3.4 Elektrophysiologische Analysen

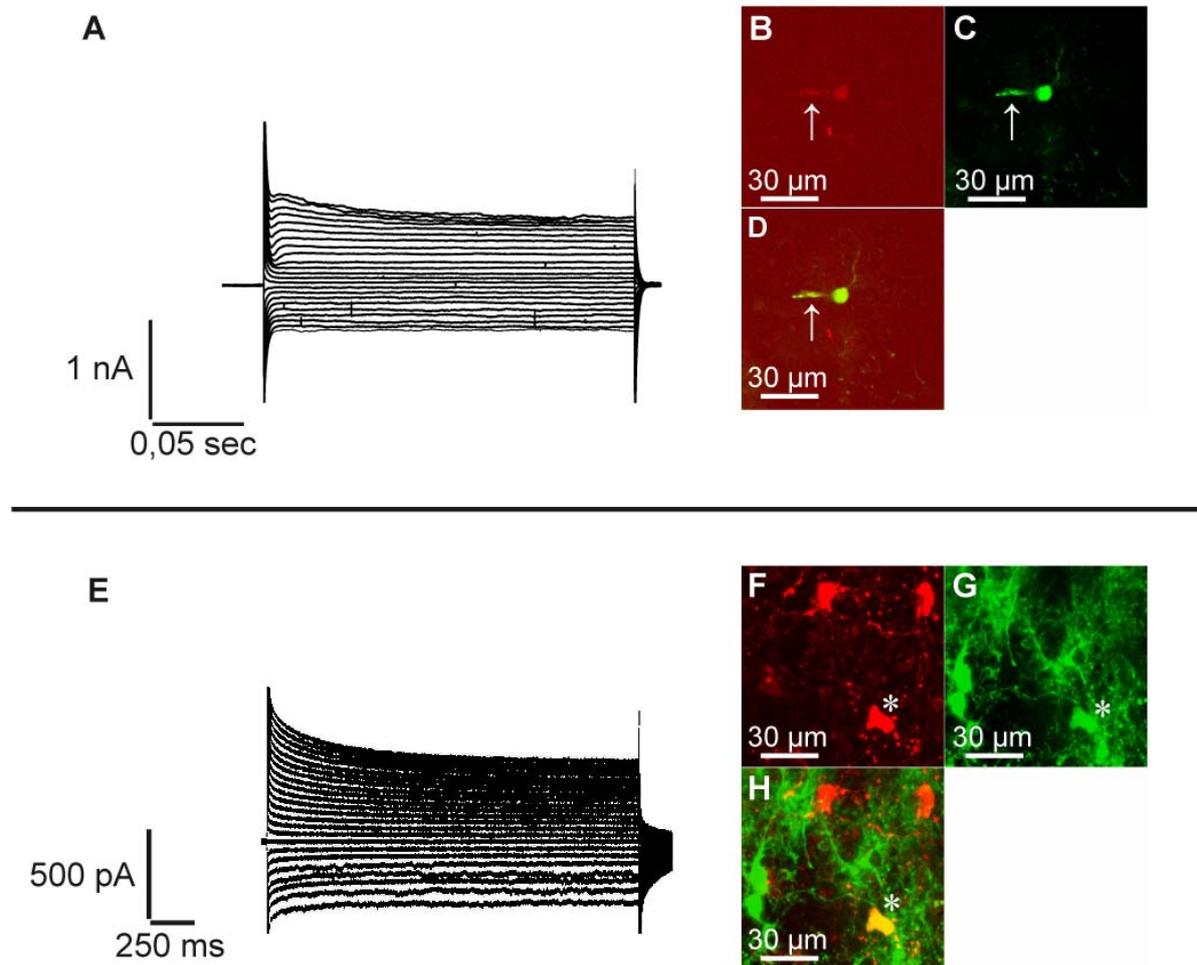


Abb. 25: A-G: Elektrophysiologische Analyse hGFAP-EGFP/PLP-DsRed-doppeltransgener Zellen; Ganzzelleleitung.

A, E: durch Serien von Spannungsspüngen von -160 bis +40 mV und je 2 Sekunden Dauer provozierte Membranströme; B-D: MIP eines konfokal aufgenommenen Bildstapels durch die Zelle, deren Strommuster in A gezeigt ist; Patchpipette durch Pfeile markiert; B: DsRed; C: EGFP; D: Überlagerung von B u. C; F-H: MIP eines konfokal aufgenommenen Bildstapels durch die Zelle, deren Strommuster in E gezeigt ist; F: DsRed; G: EGFP; H: Überlagerung von F u. G;

Die elektrophysiologische Charakterisierung der PLP-DsRed/GFAP-EGFP-doppeltransgenen Zellen gestaltete sich sehr schwierig. Sie wurde in Zusammenarbeit mit Herrn PD Dr. Sven Hülsmann (Abteilung Neuro- und Sinnesphysiologie, Georg-August-Universität, Göttingen) durchgeführt.

Im lädierten Gewebe war es auf Grund der speziellen Verhältnisse der Glianarbe mit ihrer dicht gepackten extrazellulären Matrix schwierig, Patchpipetten mit den gesuchten Zellen in einer Weise in Kontakt zu bringen, die die Erzeugung eines Seals im Gigaohm-Bereich ermöglichte.

Es wurden insgesamt fünf Zellen gepatcht. Es wurden vier Tiere im Alter von 16 bis 20 Tagen verwendet. Um sicherzustellen, dass es sich um doppeltransgene Zellen handelte wurde nach Erreichen eines Gigaseals mit Hilfe eines konfokalen *Laserscan*-Mikroskops Bildstapel von den entsprechenden Zellen aufgenommen. (siehe Material und Methoden und Abb.25 B-D u. F-G).

Alle Zellen waren gegenüber dem sonst in astroglialen Zellen anzutreffenden Ruhemembranpotential von ca. -60mV depolarisiert. Sie zeigten ein Membranpotential von -30 bis -40 mV (Butt und Kalsi 2006). Die Stromantworten zeigten zwei Zelltypen an: Drei der fünf Zellen zeigten eine vollständig passive Leitfähigkeit (Abb.25 E), während zwei der Zellen u.a. einen auswärtsgerichteten Strom aufwiesen.

3.2.3.5 Analyse der Expression des hGFAP-EGFP- und PLP-DsRed-Transgens in Neurosphärenkulturen.

Seit Reynolds und Weiss 1992 zum ersten Mal publizierten, dass primäre Zellkulturen aus Maushirnen unter definierten Bedingungen zur Gewinnung pluripotenter Zellen dienen können, gilt das Neurosphärenassay als Methode zur Gewinnung von Zellen mit Stammzeleigenschaften. (Reynolds und Weiss 1992; Gage 2000; Chen et al. 2009). Um die Multipotenzialität hGFAP-EGFP/PLP-DsRed-doppeltransgener Zellen unter diesen Bedingungen zu verifizieren, wurde diese Kulturmethode an Embryonen hGFAP-EGFP/PLP-DsRed-doppeltransgener Elternmäuse angewandt.

Unter den bekannten Bedingungen für Neurosphärenkulturen (siehe 2.2.11) bildeten am Tag E 14 aus dem Kortex von Embryonen doppeltransgener Eltern gewonnene Zellkulturen ab dem sechsten Tag in Kultur typische Neurosphären. In einem 75-Milliliterkolben waren dies durchschnittlich 85 mit einem Durchmesser von ca. 100 μm . Dabei ergab sich folgendes Expressionsmuster der beiden Transgene:

Bereits am zweiten Tag in Kultur (2 DIV) konnte EGFP mit Hilfe konventioneller Fluoreszenzmikroskopie detektiert werden. Ab dem 4 DIV konnte auch DsRed gesehen werden. Ab 7 DIV tauchten in den Neurosphären Zellen auf, die beide Transgene exprimierten (Abb. 26). Einige Neurosphären enthielten keine doppeltransgenen Zellen, in anderen dagegen machten diese einen großen Teil der gesamten Zellmasse aus.

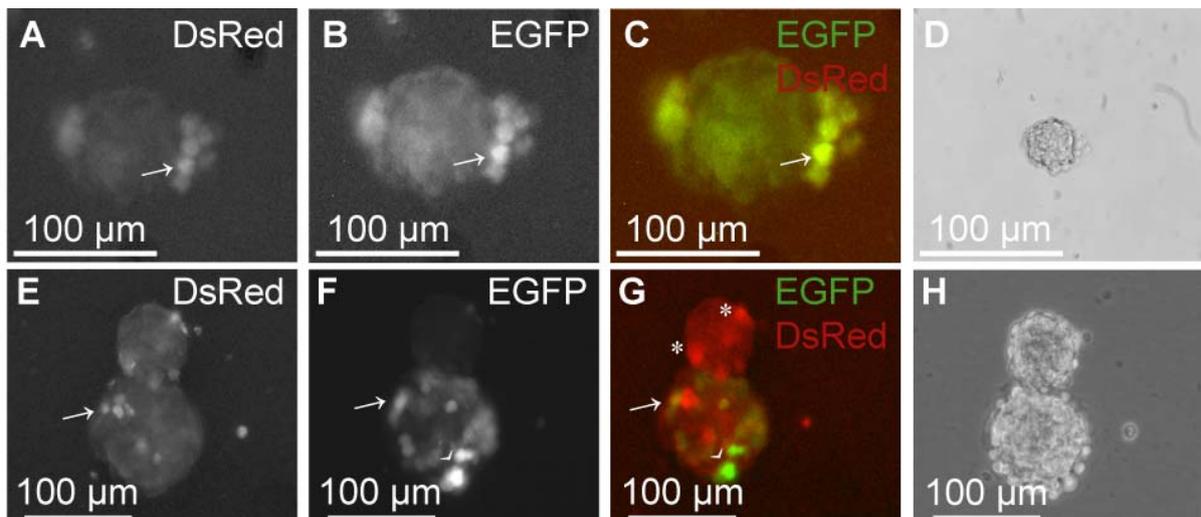


Abb. 26: Neurosphärenkultur nach 7 Tagen in Kultur (konventionelle fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen frei schwimmender Neurosphären).

A,E: DsRed; B,F: EGFP; C: Überlagerung von A u. B; G: Überlagerung von E u. F; D: Durchlichtaufnahme zu A-c; H: Durchlichtaufnahme zu E-G; Pfeile zeigen PLP-DsRed/GFAP-EGFP-doppeltransgene Zellen, Pfeilköpfe zeigen GFAP-EGFP-transgene Zellen, Sterne zeigen PLP-DsRed-transgene Zellen.

4 Diskussion

4.1 Charakterisierung der PLP-DsRed-Maus

In der vorliegenden Arbeit wurde eine transgene Mauslinie, die unter der Kontrolle des PLP-Promotors das rote fluoreszente Protein DsRed exprimiert, unter dem Gesichtspunkt ihres Expressionsmusters und ihrer Verwendbarkeit als Werkzeug in Studien zur Elektrophysiologie und Hirnentwicklung so wie zur Oligodendrozyt-Neuron-Interaktion untersucht.

Es konnte eine beinahe ubiquitäre Expression von DsRed nachgewiesen werden, insbesondere auch in den Bereichen Hirnstamm, *Striatum*, Hippokampus, *Corpus callosum* und Kortex (Abb. 6-9).

Sie wurde limitiert durch die für tetramere fluoreszente Proteine wie DsRed bekannte Problematik der intrazellulären Proteinaggregation (Hirrlinger PG et al. 2005) so wie durch die Größe des Proteins (Strack et al. 2009). An DsRed-exprimierenden Zellen konnten morphologisch keine Anzeichen für Pathologika festgestellt werden. DsRed-transgene Tiere zeigten keine klinischen Anzeichen einer Myelindysfunktion wie Ataxie oder Gedeihstörungen.

Unter diesen Gesichtspunkten ergaben sich keine Hinweise auf Zytotoxizität.

Insbesondere im Bereich des Hirnstamms lag der Beginn der DsRed-Expression in einem entwicklungsbiologisch interessanten Zeitfenster, um den dritten Tag nach der Geburt (Abb. 4).

Die Expression von DsRed variierte nicht die Membraneigenschaften der Oligodendrozyten. Patch-Clamp-Analysen belegten in 20 untersuchten Zellen ein typisches Strommuster kaum gleichrichtender, passiver Kaliumströme und ein

typisches Ruhemembranpotenzial von im Mittel -60mV (Abb.14 B), (Fuss et al. 2000; Hirrlinger PG et al. 2005).

Um den achten postnatalen Tag aufgenommene Zeitserien an DsRed-exprimierenden Oligodendrozytenfortsätzen zeigten die Aussprossung filopodienartiger Strukturen (Abb. 13). Dieser Vorgang wurde bisher in Säugern nicht im Detail beobachtet. Untersuchungen im Seitenorgan von Zebrafischen mit Hilfe fluoreszenter Proteine konnten aber gliale Zellen zeigen, die in ähnlicher Weise wie in der vorgelegten Arbeit demonstriert bei der Myelinisierung filopodienartige Fortsätze bilden (Gilmour et al. 2004).

Die Frage nach dem genauen Mechanismus der Myelinisierung ist seit langem Gegenstand intensiver Forschung. Bis heute ist erstaunlich wenig über die dynamische Zell-Zell-Interaktion bekannt, die zur Ausbildung der Myelinscheiden und ihrer Stabilisierung führt (Michailov et al. 2004; Sherman et al. 2005; Camara et al. 2009).

Oligodendrozyten bilden zahlreiche Fortsätze, die individuell mit Axonen Kontakt aufnehmen (Hardy und Friedrich 1996). Die zu den Zeitpunkten P8 im Hirnstamm und P12 im Frontalhirn gefundenen Zellen zeigen die typische Morphologie wachsender Oligodendrozyten, wie sie zum Beispiel im *Velum medullare superius* beschrieben wurde (Butt et al. 1998) (Abb. 6 A).

Fluoreszenzfärbungen des neuronalen Filaments NF200 zeigten, dass sich wachsende Oligodendrozytenfortsätze zunächst längerstreckig Axonen anlagern, bevor Umhüllung beginnt (Abb. 12). Dies gibt einen deutlichen Hinweis darauf, dass Einscheidung von Axonen nicht sofort beim Kontakt mit dem Oligodendrozytenfortsatz beginnt, sondern einen langstreckigen Kontakt mit dem Axon erfordert. Diese Resultate sind konkordant mit Ergebnissen, die - wiederum in

Zebrafisch - die Anlagerung von GFP-markierten, wachsenden Oligodendrozyten an Axone im sich entwickelnden Rückenmark demonstrierten (Yoshida und Macklin 2005).

Entsprechende Untersuchungen in höheren Vertebraten liegen bis dato nicht vor.

Die DsRed exprimierenden Zellen zeigten keine Expression nichtoligodendrozytärer Marker wie GFAP, NeuN oder NF200 (Abb. 10, 12). Alle exprimierten jedoch den Oligodendrozytenmarker CNPase (Abb. 11). Es kann daher angenommen werden, dass alle DsRed-positiven Zellen tatsächlich Oligodendrozyten darstellen. Nicht alle CNP-positiven Oligodendrozyten exprimierten jedoch DsRed (Abb. 11). Das Transgen ist also selbst zu Zeiten maximaler Expression sicher nicht in allen Oligodendrozyten aktiv. Dies erlaubt die Beobachtung einzelner Zellen, was bei der Dichte des Myelins insbesondere in den Fasertrakten der weißen Substanz bei einer vollständigen Expression nicht möglich wäre.

4.2 Aktivierung einer distinkten Gliazellpopulation in einer PLP-

DsRed/GFAP-EGFP-doppeltransgenen Maus

In der vorgelegten Arbeit wird das Auftreten einer hGFAP-EGFP/PLP-DsRed-doppeltransgenen Zelle nach Induktion einer cerebralen Stichwunde demonstriert.

Dieses Auftreten beider fluoreszenter Proteine zur gleichen Zeit führte zu der Annahme, dass es sich bei der auf diese Weise detektierten Zelle um einen Zelltyp mit astroglialen Eigenschaften handle, der auf Grund seiner Multipotentialität zur Differenzierung in die anderen Zelllinien des adulten Zentralnervensystems in der Lage sei.

Die Existenz Neuraler Stammzellen und oligopotenter Vorläuferzellen konnte in zahlreichen Regionen des adulten Gehirns demonstriert werden (Aigner und

Bogdahn 2008). Sie können um die Seitenventrikel herum gefunden werden und generieren lebenslang neue Neurone, die im *Bulbus olfactorius* als neue inhibitorische Interneurone ihren Platz finden (Doetsch et al. 1999) .

Obwohl die Stammzellnatur von Vorläuferzellen im *Gyrus dentatus* des Hippocampus stark umstritten ist, ist es doch sehr wahrscheinlich, dass in dieser Region unter anderem Körnerzellen lebenslang durch Vorläuferzellen ersetzt werden. Diese Zellen stellen funktionelle Neurone da, wie in mehreren elektrophysiologischen Analysen gezeigt werden konnte (Ehninger und Kempermann 2008). Das Ausmaß, in dem dieser Ersatz stattfindet, kann durch Training des Arbeitsgedächtnisses erhöht werden (Emsley et al. 2005). Wird er pharmakologisch supprimiert, kommt es zur Minderung der Lernfähigkeit.

CA1-Pyramidenneurone werden nach Ischämie durch Vorläuferzellen ersetzt, die ebenfalls funktionelle Neurone bilden (Nakatomi et al. 2002). Ihre genaue Charakteristik ist unklar. Sie unterscheiden sich von den Vorläuferzellen des *Gyrus dentatus* (Becq et al. 2005; Seaberg et al. 2005).

Dies ist überraschend, existieren im ZNS doch zahlreiche inhibitorische Mechanismen, die die funktionelle Integration von neu gebildeten Neuronen ins Neuropil unterbinden. Dies mag eine Ursache dafür sein, dass Reparatur im ZNS im Vergleich zum PNS nur insuffizient stattfindet. Mechanische Läsionen werden durch die Ausbildung einer Gliaarbe beantwortet, die hauptsächlich aus reaktiven Astrozyten und Proteoglykanen besteht. Schließt die Läsion die Meningen ein, wandern zusätzlich Fibroblasten ein. Auch wenn man im Zusammenhang mit dieser Reaktion meist von „Reaktiver Gliose“ spricht, findet doch relativ wenig tatsächliche Zellteilung statt, die auf den Bereich der intermediären Penumbra um die Läsion beschränkt bleibt. Ein Großteil der „Gliose“ wird durch Hypertrophie und vermehrte

Expression von Intermediärfilamenten erzeugt. Dies kann unter anderem immunhistochemisch an Hand einer stark steigenden GFAP-Immunorektivität gezeigt werden (Liao et al. 2008).

In der vorgelegten Studie zeigt sich Astrogliose aber auch an der stark gestiegenen Aktivität des hGFAP/EGFP-Transgens (Abb. 15, 19). Dies ist in besonderem Maße interessant, haben doch mehrere Studien in den vergangenen Jahren gezeigt, dass GFAP-exprimierende Zellen bestimmte Populationen von Neuronen, darunter auch kortikale Projektionsneurone und wenige Interneurone bilden können (Kriegstein und Parnavelas 2003). Auch nach Induktion von mechanischen Läsionen konnten GFAP-positive Zellen in großer Zahl in der Glianarbe und in deren Umgebung gefunden werden, die zur Bildung zumindest unreifer Neurone beitragen. Ihre Rolle bei der Bildung funktionell integrierter Neurone bleibt jedoch unklar (Itoh et al. 2007).

In der vorliegenden Studie wurden NG2 - positive, doppeltransgene wie auch lediglich hGFAP/EGFP-positive Zellen in der Umgebung von Läsionen gefunden (Abb. 20). Es existieren zahlreichen Publikationen über die Hochregulation von NG2 in der Umgebung verschiedener pathologischer Prozesse in adulten Gehirnen (Dehn et al. 2006). Es gilt als Bestandteil der Glianarbe und hat ebenfalls axonrepulsive Eigenschaften (Abrous et al. 2005; Jones et al. 2002). Seine tatsächliche Funktion kommt in den letzten Jahren allmählich ans Licht. Es konnten verschiedene Arten NG2-positiver Zellen gefunden werden. In der Umgebung von Läsionen waren dies EGFP-positive und PLP-DsRed/GFAP-EGFP-positive Zellen (Abb. 20). Hieraus erwuchs auf dem Boden der dargelegten Datenlage die Hypothese, dass es sich bei diesen Zellen um pluripotente Zellen handele, die sich in alle drei ZNS-Zelltypen differenzieren können. Die Tatsache, dass NG2 drei Wochen nach der Operation

nicht mehr gefunden werden konnte, sprach dafür, dass sich in dieser Zeit eine Weiterdifferenzierung weg vom NG2-positiven Phänotyp abspiele.

Um dies zu belegen, wurde nach Markern gesucht, die eine Weiterdifferenzierung belegen könnten.

Bereits vier Tage nach der Läsion konnte in einigen hGFAP-EGFP/PLP-DsRed - doppeltransgenen Zellen die Expression eines Markers neuronaler Vorläuferzellen bzw. wachsender Neurone gefunden werden: TUC4b (Tonchev et al. 2003), (Abb. 21). TUC4b konnte in den Fortsätzen nachgewiesen werden. Zellen, die TUC4b in ihren Fortsätzen exprimierten, hatten gegenüber anderen hGFAP-EGFP/PLP-DsRed - doppeltransgenen Zellen auffallend lange Fortsätze (Abb. 21). Dieser Befund legte nahe, dass es sich bei einem Teil der PLP-DsRed/GFAP-EGFP-positiven Zellen um Vorläufer handelte, die sich in neuronaler Richtung differenzieren können. Zur Verifikation sind jedoch weitere Studien nötig.

Zusammenfassend ergeben bisherige Erkenntnisse, dass es unter anderem auch im Kortex adulter Nager verschiedene Populationen ruhende Vorläuferzellen gibt, die zum Teil in der Lage sind, Neurone zu bilden.

Die morphologischen und elektrophysiologischen Befunde der PLP-DsRed/GFAP-EGFP-doppeltransgenen Zellen, über die hier berichtet wurde, zeigen, dass es sich offenbar um eine Zellpopulation mit mehreren Subpopulationen handelt. Eine Subpopulation dieser Zellen ist eventuell in der Lage, sich in neuronaler Richtung zu differenzieren. Dies zeigt sich zum einen in der Expression verschiedener Vorläufermarker der neuralen Linie (NG2 und TUC4b), aber auch an der Tatsache, dass Neurosphärenkulturen PLP-DsRed/GFAP-EGFP-positive Zellen enthalten.

Letzteres bedeutet an sich wie bereits ausgeführt, keinen eindeutigen Beweis der Pluripotenzialität, gibt aber im Verbund mit den Befunden der IHC einen deutlichen Hinweis in der genannten Richtung.

Da die Expression zumindest eines Transgens spätestens 21 Tage nach der Operation erlischt, konnten die endgültigen Phänotypen der Zellen nicht identifiziert werden. Wie ausgeführt, ist bekannt, dass im Rahmen verschiedener Läsionsparadigma trotz der oben angeführten widrigen Umstände der Glianarbe funktionelle Integration erfolgen kann. Die Identifizierung des letztlich funktionellen Phänotyps der PLP-DsRed/GFAP-EGFP-positiven Zellen ist also weiterhin ein interessantes Ziel, denn es stellt sich die Frage, ob die aus ihr hervorgehenden Zellen sich tatsächlich funktionell integrieren – sei es als Neurone oder als Gliazellen.

Kürzlich wurde ein Mausmodell entwickelt, das über die hGFAP-EGFP/PLP-DsRed-doppeltransgene Mauslinien hinausgeht. In diesem Modell werden anstelle von EGFP und DsRed sich funktionell komplementierende Fragmente der Cre-DNA-Rekombinase unter der Kontrolle der gleichen Promotoren exprimiert (Hirrlinger J et al. 2009). In Cre-Reportermausen werden nach Läsionen im Rückenmark doppeltransgene Zellen gefunden, die sich jedoch ausschließlich in Astrozyten differenzieren (Scheller 2009).

Unter diesem Aspekt erscheint die Differenzierung des in dieser Arbeit beschriebenen, hGFAP-EGFP/PLP-DsRed-doppeltransgenen Zelltyps in funktionelle Neurone *in vivo* unwahrscheinlich. Die Ergebnisse der dargestellten Neurosphärenkulturen weisen jedoch darauf hin, dass dieses Potenzial *in vitro* durchaus besteht.

5 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden zwei Mauslinien (PRDA und PRDB), in denen das rote fluoreszente Protein DsRed unter der Kontrolle des PLP-Promotors exprimiert wurde, charakterisiert. Beide Linien zeigten ein in jeder Hinsicht ähnliches Expressionsmuster.

DsRed wurde vom zweiten Postnataltag an im Hirnstamm exprimiert. Es fand sich in diesen beiden Linien nur Expression in Zellen, die den oligodendrozytären Marker CNPase exprimierten und eine für oligodendrozytäre Zellen typische Morphologie zeigten. Die Expression erreichte um den 10. Postnataltag das frontale Großhirn. Zwischen dem dritten und 14. Postnataltag kann die PLP-DsRed-Maus gut für entwicklungsbiologische Analysen genutzt werden, da die Zellen die typische Morphologie wachsender Oligodendrozyten zeigen. Es konnte eine langstreckige Anlagerung der Fortsätze an neuronale Fortsätze beobachtet werden. Die Expression wird durch die intrazelluläre Aggregation und wahrscheinlich auch durch die Kompaktierung des Myelins limitiert. Myelinisierende Oligodendrozyten exprimieren kein DsRed mehr in ihren Fortsätzen. DsRed-exprimierende Zellen zeigten keine elektrophysiologischen Besonderheiten. Die Expression erleichterte das Auffinden von Oligodendrozyten sehr.

Die PLP-DsRed-Maus kann also als Werkzeug für entwicklungsbiologische wie auch elektrophysiologische Studien an Oligodendrozyten genutzt werden.

Es wurde außerdem untersucht, wie transgen-exprimierende Zellen auf eine zerebrale Stichverletzung reagieren. Dabei konnte insbesondere das Auftreten einer hGFAP-EGFP/PLP-DsRed-positiven Zelle beobachtet werden, die zwischen dem vierten und 21. Tag nach der Operation detektierbar waren. Diese Zellpopulation

wurde immunhistochemisch, morphologisch und elektrophysiologisch als heterogen charakterisiert.

Zumindest für eine Subpopulation dieser Zellen konnte nachgewiesen werden, dass sie das Potenzial haben, sich in neuronaler Richtung zu differenzieren.

6 Verzeichnisse

6.1 Abbildungen

Abb. 1	Aequorea victoria, GFP-Reifung, GFP-Struktur	Seite 8
Abb. 2	Discosoma species, DsRed-Struktur, DsRed-Reifung	Seite 11
Abb. 3	Spektren von DsRed und EGFP	Seite 12
Abb. 4	Expression von DsRed in der PRDB-Linie	Seite 27
Abb. 5	Zelluläres Expressionsmuster von DsRed	Seite 29
Abb. 6	DsRed - Expression in der Medulla oblongata	Seite 32
Abb. 7	DsRed - Expression im Mesenzephalon	Seite 33
Abb. 8	DsRed-Expression in Cerebellum und Hippocampus	Seite 34
Abb. 9	DsRed-Expression im Telenzephalon	Seite 35
Abb. 10	DsRed – NeuN und DsRed - GFAP Gegenfärbung	Seite 38
Abb. 11	DsRed – CNPase Gegenfärbung	Seite 39
Abb. 12	DsRed – NF200 Gegenfärbung	Seite 40
Abb. 13	Oligodendrozytenfortsatzausprossung	Seite 41
Abb. 14	Elektrophysiologie DsRed+ Oligodendrozyt	Seite 42
Abb. 15	GFAP-Aktivierung im Läsionsmodell	Seite 44
Abb. 16	Postoperativer, zeitlicher Verlauf der Transgenexpression	Seite 46
Abb. 17	Morphologie der doppeltransgenen Zelle	Seite 49
Abb. 18	CD11b-Färbung der doppeltransgenen Zelle	Seite 51
Abb. 19	GFAP-Färbung der doppeltransgenen Zelle	Seite 53
Abb. 20	AN2/NG2-Färbung der doppeltransgenen Zelle	Seite 55
Abb. 21	TUC4b-Färbung der doppeltransgenen Zelle	Seite 57
Abb. 22	PH3 Immunhistochemie im Läsionsmodell 8pOp	Seite 58
Abb. 23	BrdU-Markierung im Läsionsmodell 8pOp	Seite 59
Abb. 24	BrdU-Markierung im Läsionsmodell 21pOp	Seite 60
Abb. 25	Elektrophysiologische Analyse der doppeltransgenen Zelle	Seite 61
Abb. 26	Primäre Neurosphärenkultur aus der GCPB-Mauslinie	Seite 63

6.2 Abkürzungen

(Anm.: Die Abkürzungen für anatomische Strukturen wurden dem Mausgehirnatlas „The Mouse Brain in Stereotactic Coordinates“ (Paxinos G und Keith BJ, 2. Auflage, Academic Press, New Yorck, 2001) entnommen.)

Ac	<i>Commissura anterior</i>
ACSF	<i>artifizielle Zerebrospinalflüssigkeit</i>
BLBP	<i>brain lipid binding protein</i>
BrdU	Bromodesoxyuridin
CA	<i>Cornu ammonis</i>
Cc	<i>Corpus callosum</i>
CNPase	zyklische Nukleotid-Phosphatase
cp	<i>Pedunculus cerebraalis</i>
CPu	kaudales Putamen
DG	<i>Gyrus dentatus</i>
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagles Medium</i>
DIV	Tage in Kultur
EGFP	<i>enhanced green fluorescent protein</i>
exp	experimentell
f	Fornix
Fc	<i>Fimbria hippocampi</i>
GFAP	Saures Gliafaserprotein
GFP	Grünes fluoereszentes Protein
Grcb	<i>Stratum granulosum cerebelli</i>
Icp	<i>Pedunculus cerebellaris inferior</i>
IHC	<i>Immunhistochemie</i>
IO	<i>Oliva inferior</i>
lfp	<i>Fasciculus longitudinalis pontis</i>
LS	<i>Nucleus septalis lateralis</i>
LSM	<i>Laserscan- Mikroskop</i>
Lv	<i>Ventriculus lateralis</i>
Med	Medizin
MIP	Maximum Intensity <i>Projection</i>
Mlf	<i>Fasciculus longitudinalis medialis</i>

Mol	<i>Stratum moleculare hippocampi</i>
MolCb	<i>Stratum moleculare cerebelli</i>
MPI	Max-Planck-Institut
NGS	Ziegenserum
NSC	Neurale Stammzelle
Or	<i>Stratum oriens hippocampi</i>
PBS	phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PCR	Polymerasekettenreaktion
PFA	Paraformaldehyd
PLP	Proteolipid-Protein
Pr	<i>Nucleus praepositus</i>
Pr5	<i>Nucleus sensorius principalis nervi trigemini</i>
PurCb	Stratum der Purkinjezellen
py	Pyramidenbahn
Rad	<i>Stratum radiale hippocampi</i>
RMS	Rostraler Migratorischer Strang
rs	<i>Tractus rubrospinalis</i>
RT	Raumtemperatur
Scp	<i>Pedunculus cerebellaris superior</i>
Ser	Serin
SN	<i>Substantia nigra</i>
Sol	<i>Nucleus tractus solitarii</i>
sp5	<i>Tractus spinalis nervi trigemini</i>
SVZ	Subventrikularzone
ts	<i>Tractus tectospinalis</i>
Tyr	Tyrosin
VZ	Ventrikularzone
ZNS	Zentralnervensystem
2Cb	2. Kleinhirnwindung
6Cb	6. Kleinhirnwindung
7Cb	7. Kleinhirnwindung
9Cb	9. Kleinhirnwindung
10Cb	10. Kleinhirnwindung

7N	<i>Nervus facialis</i>
8N	<i>Nervus vestibulocochlearis</i>
12N	<i>Nervus hypoglossus</i>
vsc	<i>Tractus spinocerebellaris anterior</i>
3V	<i>Ventriculus tertius cerebri</i>
4V	<i>Ventriculus quartus cerebri</i>

6.3 Literaturverzeichnis

1. Abrous DN, Koehl M und Le MM (2005): Adult neurogenesis: from precursors to network and physiology. *Physiol Rev* 85, 523-569
2. Aguirre AA, Chittajallu R, Belachew S und Gallo V (2004): NG2-expressing cells in the subventricular zone are type C-like cells and contribute to interneuron generation in the postnatal hippocampus. *J Cell Biol* 165, 575-589
3. Aigner L und Bogdahn U (2008): TGF-beta in neural stem cells and in tumors of the central nervous system. *Cell Tissue Res* 331, 225-241
4. Avramescu S und Timofeev I (2008): Synaptic Strength Modulation after Cortical Trauma: A Role in Epileptogenesis. *J Neurosci* 28, 6760-6772
5. Baracskey KL, Kidd GJ, Miller RH und Trapp BD (2007): NG2-positive cells generate A2B5-positive oligodendrocyte precursor cells. *Glia* 55, 1001-1010
6. Becq H, Jorquera I, Ben-Ari Y, Weiss S und Represa A (2005): Differential properties of dentate gyrus and CA1 neural precursors. *J Neurobiol* 62, 243-261
7. Bergles, DE, Roberts JD, Somogyi P und Jahr CE (2000): Glutamatergic synapses on oligodendrocyte precursor cells in the hippocampus. *Nature* 405, 187-191
8. Besnard F, Brenner M, Nakatani Y, Chao R, Purohit HJ und Freese E (1991): Multiple interacting sites regulate astrocyte-specific transcription of the human gene for glial fibrillary acidic protein. *J Biol Chem* 266, 18877-18883
9. Bevis BJ und Glick BS (2002): Rapidly maturing variants of the *Discosoma* red fluorescent protein (DsRed). *Nat Biotechnol* 20, 83-87
10. Brenner M (1994): Structure and transcriptional regulation of the GFAP gene. *Brain Pathol* 4, 245-257
11. Brenner M und Messing A (1996): GFAP Transgenic Mice. *Methods* 10, 351-364

12. Brenner M, Johnson AB Boespflug-Tanguy, O Rodriguez D, Goldman JE und Messin A (2001): Mutations in GFAP, encoding glial fibrillary acidic protein, are associated with Alexander disease. *Nat Genet* 27, 117-120
13. Butt AM und Kalsi A (2006): Inwardly rectifying potassium channels (Kir) in central nervous system glia: a special role for Kir4.1 in glial functions. *J Cell Mol Med* 10, 33-44
14. Butt AM, Ibrahim M und Berry M (1998): Axon-myelin sheath relations of oligodendrocyte unit phenotypes in the adult rat anterior medullary velum. *J Neurocytol* 27, 259-269
15. Butt AM, Kirvell S und Ibrahim M (2002a): 20: NG2 glia (oligodendrocyte progenitor cells) and sodium channel clustering at developing nodes of Ranvier in the rat brain. *J Anat* 200, 206
16. Butt AM, Kiff J, Hubbard P und Berry M (2002b): Synantocytes: new functions for novel NG2 expressing glia. *J Neurocytol* 31, 551-565
17. Camara J, Wang Z, Nunes-Fonseca, C Friedman, HC Grove, M Sherman, DL Komiyama NH, Grant SG, Brophy PJ, Peterson A und Ffrench-Constant C (2009): Integrin-mediated axoglial interactions initiate myelination in the central nervous system. *J Cell Biol* 185, 699-712
18. Chen X, Tian Y, Yao L, Zhang J und Liu Y (2009): Hypoxia stimulates proliferation of rat neural stem cells with influence on the expression of cyclin D1 and c-Jun N-terminal protein kinase signaling pathway in vitro. *Neuroscience* 165, 705-714
19. Chirumamilla S, Sun D und Bullock MR (2002): Traumatic brain injury induced cell proliferation in the adult mammalian central nervous system. *Neurotrauma* 19, 693-703
20. Cody CW, Prasher DC, Westler WM, Prendergast FG und Ward WW (1993): Chemical structure of the hexapeptide chromophore of the Aequorea green-fluorescent protein. *Biochemistry* 32, 1212-1218
21. Day RN und Davidson MW (2009): The fluorescent protein palette: tools for cellular imaging. *Chem Soc Rev* 38, 2887-2921
22. Dayer AG, Cleaver KM, Abouantoun T und Cameron HA (2005): New GABAergic interneurons in the adult neocortex and striatum are generated from different precursors. *J Cell Biol* 168, 415-427

23. Dehn D, Burbach GJ, Schafer R und Deller T (2006): NG2 upregulation in the denervated rat fascia dentata following unilateral entorhinal cortex lesion. *Glia* 53, 491-500
24. Diers-Fenger M, Kirchhoff F, Kettenmann, H, Levine JM und Trotter J (2001): AN2/NG2 protein-expressing glial progenitor cells in the murine CNS: isolation, differentiation, and association with radial glia. *Glia* 34, 213-228
25. Dimou L, Klugmann M, Werner H, Jung M, Griffiths IR und Nave KA (1999): Dysmyelination in mice and the proteolipid protein gene family. *Adv Exp Med Biol* 468, 261-271
26. Doetsch F, Caille I, Lim DA, Garcia-Verdugo JM und Alvarez-Buylla A (1999): Subventricular zone astrocytes are neural stem cells in the adult mammalian brain. *Cell* 97, 703-716
27. Edgar JM und Nave KA (2009): The role of CNS glia in preserving axon function. *Curr Opin Neurobiol.* 19(5), 498-504
28. Ehninger D und Kempermann G (2008): Neurogenesis in the adult hippocampus. *Cell Tissue Res* 331, 243-250
29. Emsley JG, Mitchell BD, Kempermann G und Macklis,JD (2005): Adult neurogenesis and repair of the adult CNS with neural progenitors, precursors, and stem cells. *Prog Neurobiol* 75, 321-341
30. Fukushima S, Terasaki M, Sakata K, Miyagi N, Kato S, Sugita Y und Shigemori M (2009): Sensitivity and usefulness of anti-phosphohistone-H3 antibody immunostaining for counting mitotic figures in meningioma cases. *Brain Tumor Pathol* 26, 51-57
31. Fuss B, Mallon B, Phan T, Ohlemeyer C, Kirchhoff F, Nishiyama A und Macklin WB (2000): Purification and analysis of in vivo-differentiated oligodendrocytes expressing the green fluorescent protein. *Dev Biol* 218, 259-274
32. Gage FH (2000): Mammalian neural stem cells. *Science* 287, 1433-1438
33. Galou M, Pournin S, Ensergueix D, Ridet JL, Tchelingirian JL, Lossouarn L, Privat A, Babinet C und Dupouey P (1994): Normal and pathological expression of GFAP promoter elements in transgenic mice. *Glia* 12, 281-293

34. Gilmour D, Knaut H, Maischein HM und Nusslein-Volhard C (2004): Towing of sensory axons by their migrating target cells in vivo. *Nat Neurosci* 7, 491-492
35. Glass R, Synowitz M, Kronenberg G, Walzlein JH, Markovic DS, Wang LP, Gast D, Kiwit J, Kempermann G und Kettenmann H (2005): Glioblastoma-induced attraction of endogenous neural precursor cells is associated with improved survival. *J Neurosci* 25, 2637-2646
36. Goebbels S, Bormuth I, Bode U, Hermanson O, Schwab MH und Nave KA (2006): Genetic targeting of principal neurons in neocortex and hippocampus of NEX-Cre mice. *Genesis* 44, 611-621
37. Gorman L.K., Shook B.L. und Becker D.P. (1993): Traumatic brain injury produces impairment in long-term and recent memory. *Brain Res* 614, 29-36
38. Griffiths IR, Montague P und Dickinson P (1995): The proteolipid protein gene. *Neuropathol Appl Neurobiol* 21, 85-96
39. Gross LA, Baird GS, Hoffman RC, Baldrige KK und Tsien RY (2000): The structure of the chromophore within DsRed, a red fluorescent protein from coral. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000 97, 11990-11995
40. Gurskaya NG, Verkhusha VV, Shcheglov AS, Staroverov DB, Chepurnykh TV, Fradkov AF, Lukyanov S und Lukyanov KA (2006): Engineering of a monomeric green-to-red photoactivatable fluorescent protein induced by blue light. *Nat Biotechnol* 24, 461-465
41. Hardy RJ und Friedrich VL, Jr. (1996): Progressive remodeling of the oligodendrocyte process arbor during myelinogenesis. *Dev Neurosci* 18, 243-254
42. Hendzel MJ, Wei Y, Mancini MA, Van HA, Ranalli T, Brinkley BR, Bazett-Jones DP und Allis CD (1997): Mitosis-specific phosphorylation of histone H3 initiates primarily within pericentromeric heterochromatin during G2 and spreads in an ordered fashion coincident with mitotic chromosome condensation. *Chromosoma* 106, 348-360
43. Hirrlinger J, Scheller A, Hirrlinger PG, Kellert B, Tang W, Wehr MC, Goebbels S, Reichenbach A, Sprengel R, Rossner MJ und Kirchhoff F (2009): Split-cre complementation indicates coincident activity of different genes in vivo. *PLoS One* 4, e4286

44. Hirrlinger PG, Scheller A, Braun C, Quintela-Schneider M, Fuss B, Hirrlinger J und Kirchhoff F (2005): Expression of reef coral fluorescent proteins in the central nervous system of transgenic mice. *Mol Cell Neurosci* 30, 291-303
45. Horner PJ, Thallmair M und Gage FH (2002): Defining the NG2-expressing cell of the adult CNS. *J Neurocytol* 31, 469-480
46. Itoh T, Satou T, Nishida S, Hashimoto S und Ito H (2007): Immature and mature neurons coexist among glial scars after rat traumatic brain injury. *Neurol Res* 29, 734-742
47. Jessen KR und Mirsky R (1985): Glial fibrillary acidic polypeptides in peripheral glia. Molecular weight, heterogeneity and distribution. *J Neuroimmunol* 1985 8, 377-393
48. Jessen KR, Morgan L, Stewart HJ und Mirsky R (1990): Three markers of adult non-myelin-forming Schwann cells, 217c(Ran-1), A5E3 and GFAP: development and regulation by neuron-Schwann cell interactions. *Development* 109, 91-103
49. Jones LL, Yamaguchi Y, Stallcup WB und Tuszynski MH (2002): NG2 is a major chondroitin sulfate proteoglycan produced after spinal cord injury and is expressed by macrophages and oligodendrocyte progenitors. *J Neurosci* 22, 2792-2803
50. Karim SA, Barrie JA, McCulloch MC, Montague P, Edgar JM, Kirkham D, Anderson TJ, Nave KA, Griffiths IR und McLaughlin M (2007): PLP overexpression perturbs myelin protein composition and myelination in a mouse model of Pelizaeus-Merzbacher disease. *Glia* 55, 341-351
51. Kim KK, Adelstein RS und Kawamoto S (2009): Identification of neuronal nuclei (NeuN) as Fox-3, a new member of the Fox-1 gene family of splicing factors. *J Biol Chem* 284, 31052-31061
52. Kriegstein A und Parnavelas JG (2003): Changing concepts of cortical development. *Cereb Cortex* 13, 541
53. Lee DS, Yu K, Rho JY, Lee E, Han JS, Koo DB, Cho YS, Kim J, Lee KK und Han YM (2006): Cycloamine treatment of human embryonic stem cells followed by culture in human astrocyte medium promotes differentiation into nestin- and GFAP-expressing astrocytic lineage. *Life Sci* 80, 154-159

54. Leif RC, Stein JH und Zucker RM (2004): A short history of the initial application of anti-5-BrdU to the detection and measurement of S phase. *Cytometry A* 58, 45-52
55. Leoni G, Rattray M und Butt AM (2009): NG2 cells differentiate into astrocytes in cerebellar slices. *Mol Cell Neurosci* 42, 208-218
56. Levine JM und Nishiyama A (1996): The NG2 chondroitin sulfate proteoglycan: a multifunctional proteoglycan associated with immature cells. *Perspect Dev Neurobiol* 3, 245-259
57. Liao CW, Fan CK, Kao TC, Ji DD, Su KE, Lin YH und Cho WL (2008): Brain injury-associated biomarkers of TGF-beta1, S100B, GFAP, NF-L, tTG, AbetaPP, and tau were concomitantly enhanced and the UPS was impaired during acute brain injury caused by *Toxocara canis* in mice. *BMC Infect Dis* 8, 84
58. Liem RK und Messing A (2009): Dysfunctions of neuronal and glial intermediate filaments in disease. *J Clin Invest* 119, 1814-1824
59. Lin SC und Bergles DE (2002): Physiological characteristics of NG2-expressing glial cells. *J Neurocytol* 31, 537-549
60. Linington C und Waehnelde TV (1990): Conservation of the carboxyl terminal epitope of myelin proteolipid protein in the tetrapods and lobe-finned fish. *J Neurochem* 1990 54, 1354-1359
61. Liu Y und Rao MS (2004): Olig genes are expressed in a heterogeneous population of precursor cells in the developing spinal cord. *Glia* 45, 67-74
62. Lukyanov KA, Chudakov DM, Fradkov AF, Labas YA, Matz MV und Lukyanov S (2006): Discovery and properties of GFP-like proteins from nonbioluminescent anthozoa. *Methods Biochem Anal* 47, 121-138
63. Mallon BS, Shick HE, Kidd GJ und Macklin WB (2002): Proteolipid promoter activity distinguishes two populations of NG2-positive cells throughout neonatal cortical development. *J Neurosci* 22, 876-885
64. Masood K, Besnard F, Su, Y und Brenner M (1993): Analysis of a segment of the human glial fibrillary acidic protein gene that directs astrocyte-specific transcription. *J Neurochem* 61, 160-166

65. Messing A, Goldman JE, Johnson AB und Brenner M (2001): Alexander disease: new insights from genetics. *J Neuropathol Exp Neurol* 60, 563-573
66. Michailov, GV, Sereda, MW, Brinkmann, BG, Fischer, TM, Haug, B, Birchmeier, C, Role, L, Lai, C, Schwab, MH und Nave, KA (2004): Axonal neuregulin-1 regulates myelin sheath thickness. *Science* 304, 700-703
67. Milanese M, Bonifacino T, Zappettini S, Usai C, Tacchetti C, Nobile M und Bonanno G (2009): Glutamate release from astrocytic gliosomes under physiological and pathological conditions. *Int Rev Neurobiol* 85, 295-318
68. Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G und Erlich H (1992): Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. 1986. *Biotechnology* 24, 17-27
69. Nakatomi H, Kuriu T, Okabe S, Yamamoto S, Hatano O, Kawahara N, Tamura A, Kirino T und Nakafuku M (2002): Regeneration of hippocampal pyramidal neurons after ischemic brain injury by recruitment of endogenous neural progenitors. *Cell* 110, 429-441
70. Nampiaparampil DE (2008): Prevalence of chronic pain after traumatic brain injury: a systematic review. *J Am Med Assoc* 300, 711-9
71. Niehaus A, Stegmüller J, Ers-Fenger M und Trotter J (1999): Cell-surface glycoprotein of oligodendrocyte progenitors involved in migration. *J Neurosci* 19, 4948-4961
72. Nishiyama A (2007): Polydendrocytes: NG2 cells with many roles in development and repair of the CNS. *Neuroscientist* 13, 62-76
73. Nolte C, Matyash M, Pivneva T, Schipke CG, Ohlemeyer C, Hanisch UK, Kirchhoff F und Kettenmann H (2001): GFAP promoter-controlled EGFP-expressing transgenic mice: a tool to visualize astrocytes and astrogliosis in living brain tissue. *Glia* 33, 72-86
74. Ong WY und Levine JM (1999): A light and electron microscopic study of NG2 chondroitin sulfate proteoglycan-positive oligodendrocyte precursor cells in the normal and kainate-lesioned rat hippocampus. *Neuroscience* 92, 83-95

75. Ormo M, Cubitt AB, Kallio K, Gross LA, Tsien RY und Remington SJ (1996): Crystal structure of the *Aequorea victoria* green fluorescent protein. *Science* 273, 1392-1395
76. Pluschke, G, Vanek, M, Evans, A, Dittmar, T, Schmid, P, Itin, P, Filardo, EJ und Reisfeld, RA (1996): Molecular cloning of a human melanoma-associated chondroitin sulfate proteoglycan. *Proc Natl Acad Sci USA* 93, 9710-9715
77. Raff MC, Miller RH und Noble M (1983): A glial progenitor cell that develops in vitro into an astrocyte or an oligodendrocyte depending on culture medium. *Nature* 303, 390-396
78. Reynolds BA und Weiss S (1992): Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. *Science* 255, 1707-1710
79. Rodriguez D, Gauthier F, Bertini E, Bugiani M, Brenner M, N'guyen S, Goizet C, Gelot A, Surtees R, Pedespan JM, Hernandorena X, Troncoso M, Uziel G, Messing A, Ponsot G, Pham-Dinh D, Dautigny A und Boespflug-Tanguy O (2001): Infantile Alexander disease: spectrum of GFAP mutations and genotype-phenotype correlation. *Am J Hum Genet* 69, 1134-1140
80. Rosenbluth J, Stoffel W und Schiff R (1996): Myelin structure in proteolipid protein (PLP)-null mouse spinal cord. *J Comp Neurol* 371, 336-344
81. Rosenbluth J, Schiff R und Lam P (2009): Effects of osmolality on PLP-null myelin structure: implications re axon damage. *Brain Res* 1253, 191-197
82. Sakmann B, Edwards F, Konnerth A und Takahashi T (1989): Patch clamp techniques used for studying synaptic transmission in slices of mammalian brain. *Q J Exp Physiol* 74, 1107-1118
83. Seaberg RM, Smukler SR und van der KD (2005): Intrinsic differences distinguish transiently neurogenic progenitors from neural stem cells in the early postnatal brain. *Dev Biol* 278, 71-85
84. Scheller A, MPI Exp. Med., Göttingen: Persönliche Mitteilung 2009
85. Sherman DL und Brophy PJ (2005): Mechanisms of axon ensheathment and myelin growth. *Nat Rev Neurosci* 6, 683-690

86. Shimomura O (2009): Discovery of green fluorescent protein (GFP) (Nobel Lecture). *Angew Chem Int Ed Engl* 48, 5590-5602
87. Snapp EL, Altan N und Lippincott-Schwartz J (2003): Measuring protein mobility by photobleaching GFP chimeras in living cells. *Curr Protoc Cell Biol* Unit 21.1, Kapitel 21
88. Stallcup WB (1981): The NG2 antigen, a putative lineage marker: immunofluorescent localization in primary cultures of rat brain. *Dev Biol* 83, 154-165
89. Staugaitis SM und Trapp BD (2009): NG2-positive glia in the human central nervous system. *Neuron Glia Biol* 1-10
90. Stegmüller J, Werner H, Nave KA und Trotter J (2003): The proteoglycan NG2 is complexed with alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid (AMPA) receptors by the PDZ glutamate receptor interaction protein (GRIP) in glial progenitor cells. Implications for glial-neuronal signaling. *J Biol Chem* 2003 278, 3590-3598
91. Strack RL, Bhattacharyya D, Glick BS und Keenan RJ (2009): Noncytotoxic orange and red/green derivatives of DsRed-Express2 for whole-cell labeling. *BMC Biotechnol* 9, 32
92. Su M, Hu H, Lee Y, d'Azzo A, Messing A und Brenner M (2004): Expression specificity of GFAP transgenes. *Neurochem Res* 29, 2075-2093
93. Tonchev AB, Yamashima T, Zhao L, Okano HJ und Okano H (2003): Proliferation of neural and neuronal progenitors after global brain ischemia in young adult macaque monkeys. *Mol Cell Neurosci* 23, 292-301
94. Tsien RY (1998): The green fluorescent protein. *Annu Rev Biochem* 67, 509-544
95. Tsien RY (2009): Constructing and exploiting the fluorescent protein paintbox (Nobel Lecture). *Angew Chem Int Ed Engl* 48, 5612-5626
96. Tubbs JL, Tainer JA und Getzoff ED (2005): Crystallographic structures of Discosoma red fluorescent protein with immature and mature chromophores: linking peptide bond trans-cis isomerization and acylimine formation in chromophore maturation. *Biochemistry* 44, 9833-9840

97. Vijayan VK, Lee YL und Eng LF (1990): Increase in glial fibrillary acidic protein following neural trauma. *Mol Chem Neuropathol* 13, 107-118
98. Wachter RM (2006a): The Family of GFP-Like Proteins: Structure, Function, Photophysics and Biosensor Applications. Introduction and Perspective. *Photochem Photobiol* 82, 339-344
99. Wachter RM (2006b): The family of GFP-like proteins: structure, function, photophysics and biosensor applications. Introduction and perspective. *Photochem Photobiol* 82, 339-344
100. Wall MA, Socolich M und Ranganathan R (2000): The structural basis for red fluorescence in the tetrameric GFP homolog DsRed. *Nat Struct Biol* 7, 1133-1138
101. Weiss S, Dunne C, Hewson J, Wohl C, Wheatley M, Peterson AC und Reynolds BA (1996): Multipotent CNS stem cells are present in the adult mammalian spinal cord and ventricular neuroaxis. *J Neurosci* 16, 7599-7609
102. Wekerle H (1991): Immunopathogenesis of multiple sclerosis. *Acta Neurol (Napoli)* 13, 197-204
103. Wilson HC, Scolding NJ und Raine CS (2006): Co-expression of PDGF alpha receptor and NG2 by oligodendrocyte precursors in human CNS and multiple sclerosis lesions. *J Neuroimmunol* 176, 162-173
104. Yampolsky IV, Balashova TA und Lukyanov KA (2009): Synthesis and spectral and chemical properties of the yellow fluorescent protein zFP538 chromophore. *Biochemistry* 48, 8077-8082
105. Yang F, Moss LG und Phillips GN Jr. (1996): The molecular structure of green fluorescent protein. *Nat Biotechnol* 14, 1246-1251
106. Yarbrough D, Wachter RM, Kallio K, Matz MV und Remington SJ (2001a): Refined crystal structure of DsRed, a red fluorescent protein from coral, at 2.0-Å resolution. *Proc Natl Acad Sci USA* 98, 462-467
107. Yarbrough D, Wachter RM, Kallio K, Matz MV und Remington SJ (2001b): Refined crystal structure of DsRed, a red fluorescent protein from coral, at 2.0-Å resolution. *Proc Natl Acad Sci USA* 98, 462-467

108. Yoshida M und Macklin WB (2005): Oligodendrocyte development and myelination in GFP-transgenic zebrafish. *J Neurosci Res* 81, 1-8
109. Zhou M und Kimelberg HK (2001): Freshly isolated hippocampal CA1 astrocytes comprise two populations differing in glutamate transporter and AMPA receptor expression. *J Neurosci* 21, 7901-7908
110. Zhu H und Zon LI (2004): Use of the DsRed fluorescent reporter in zebrafish. *Methods Cell Biol* 76, 3-12
111. Zimmer M (2009): GFP: from jellyfish to the Nobel prize and beyond. *Chem Soc Rev* 38, 2823-2832

Nachwort und Danksagung

Wissenschaftliches Arbeiten ist für einen Studenten der Humanmedizin in vielen Fällen ein schwieriges, wenn nicht gar unmögliches Unterfangen. Seit die Hochschulen landauf, landab den Studiengang Humanmedizin mit Lehrveranstaltungen vom frühen Morgen bis zum Abend geradezu vollgestopft haben, fehlen den Studenten Zeit und Freiheit zur Entwicklung eines eigenen wissenschaftlichen Profils.

Das war 2001, als die Arbeit an dem hier dargestellten Projekt geplant wurde, noch nicht so. Aber auch zu dieser Zeit kamen nur für wenige Kommilitonen die glücklichen Umstände zusammen, die diese Arbeit zwischen 2002 und 2006 begleitet haben.

Zuerst - der Chronologie wegen - möchte ich Herrn Prof. Dr. med. Pedro Mestres-Ventura danken, dem diese Arbeit gewidmet ist. Er führte mich in die Neuroanatomie ein, bot mir einen herzlichen Empfang in die akademische Welt und begeisterte mich für wissenschaftliches Arbeiten. Er war es auch, der mich dem Graduiertenkolleg „Neuroplasticity – from Molecules to Systems“ der Georg-August-Universität zu Göttingen vorschlug, dessen Stipendiat ich sein durfte, und dem ich viele Anregungen, vor allem aber die Vermittlung an die großartige Abteilung Neurogenetik des Max-Planck-Instituts für Experimentelle Medizin zu Göttingen verdanke. Ich danke ihrem Leiter, Herrn Prof. Dr. rer. nat. K.A. Nave für viele Anregungen, guten Rat und finanzielle Unterstützung. Das Max-Planck-Institut für Experimentelle Medizin war mir zwischen 2001 und 2006 eine wissenschaftliche Heimat, wie ich sie mir besser nicht hätte wünschen können.

Ob seiner Bedeutung als letzten nenne ich Herrn Prof. Dr. rer. nat. Frank Kirchhoff, der mir mehr war als ein Betreuer in wissenschaftlichen Fragen. Auch ihm ist diese Arbeit gewidmet.

London, 07.12.2009