



Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg
Medizinische Fakultät Mannheim
Dissertations-Kurzfassung

Tet-regulierte induzierbare Expression von Kandidatengen in serotonergen Neuronen von transgenen Mäusen

Autor: Verena Karola Huppert
Institut / Klinik: Zentralinstitut für Seelische Gesundheit Mannheim (ZI)
Doktorvater: Prof. Dr. D. Bartsch

Das serotonerge System hat in der Behandlung von neuropsychiatrischen Erkrankungen eine besondere Bedeutung. Durch psychopharmakologische Beeinflussung des zentralen serotonergen Systems ist es heute möglich, verschiedene psychiatrische Erkrankungen erfolgreich zu behandeln. Die Fortschritte in der Molekularbiologie ermöglichen neue tierexperimentelle Herangehensweisen zur Entschlüsselung der Zusammenhänge dieser komplexen neuronalen Funktionseinheit, um die Funktion einzelner Gene und den Zusammenhang mit psychischen Erkrankungen zu erforschen. Im Rahmen dieser Arbeit sollte durch das Tetrazyklin-regulierte Genexpressionssystem (Tet-System) die zeitlich und räumlich kontrollierte Expression zweier Ptet-regulierter Zielgene in serotonergen Neuronen von Mäusen untersucht werden. Das Ptet-regulierte Zielgen des Glutamate gated Chloride channel (Ptet-GluCl) und das Ptet-regulierte Zielgen des Serotonintransporters (Ptet-hSERT). Neue transgene Mauslinien wurden generiert durch DNA-Mikroinjektion von zwei Plasmiden (GluCl α CFP-Ptetbi-GluCl β YFP und LacZ-Ptetbi-hSERT), die die tet-regulierten Zielgene GluCl bzw. den humanisierten SERT unter der Kontrolle des bidirektionalen Promotors Ptet-bi trugen, um im Falle von Ptet-GluCl die gleichzeitige Expression beider mit den Reporterproteinen YFP bzw. CFP fusionierten Untereinheiten bzw. bei Ptet-hSERT die zusätzliche Expression des Reportergens LacZ zu gewährleisten. Anschließend erfolgte die Identifikation durch Genotypisierung mit spezifischen Primerpaaren und das in vitro Screening der Ptet-regulierten Expression der verschiedenen Founderlinien der beiden Konstrukte durch Ohrfibroblastenkultur. Durch Verpaarung der tet-response-Linien mit den gewebspezifisch serotonerg regulierenden TPH2-Transaktivatorlinien entstanden zwei neue doppelt-transgene Linien: TPH2-tTA/LacZ-Ptetbi-hSERT und TPH2-tTA/GluCl α -Ptetbi-GluCl β . Durch Analyse von Mausgehirnschnitten der generierten Linien mit lacZ-Färbung und immunhistochemischen Färbungen wurde das Expressionsmuster der doppelt-transgenen Linien dargestellt. Die Verpaarungen der tet-response-Linien mit den TPH2-tTA-Linien zeigten eine promotorspezifische (Raphekerne), aber sehr schwache Expression. Um die Funktionalität der Ptet-regulierten Linien zu überprüfen, wurden diese zusätzlich mit der CamKII α -tTA-Linie - einer etablierten und zuverlässigen Transaktivatorlinie - verpaart, wodurch zwei weitere doppelt-transgene Mauslinien entstanden: CamKII α -tTA/LacZ-Ptetbi-hSERT und CamKII α -tTA/GluCl α -Ptetbi-GluCl β . Die Analyse der Mausgehirnschnitte der generierten Linien mit lacZ-Färbung und immunhistochemischen Färbungen zeigten das für den CamKII α -Promotor spezifische Expressionsmuster im Vorderhirn, wobei bei den Nachkommen der verschiedenen Founder zum einen die Expressionsstärke variierte, zum anderen einzelne Nachkommen fehlende Expression in verschiedenen CamKII α -typischen Arealen zeigten. Durch diese Doktorarbeit konnte gezeigt werden, dass die TPH2-tTA/LacZ-Ptetbi-hSERT-Linien bzw. die TPH2-tTA/GluCl α -Ptetbi-GluCl β -Linien unzureichendes Expressionsniveau erlangen. Die Verpaarungen der tet-response-Linien mit der CamKII α -tTA-Linie (CamKII α -tTA/LacZ-Ptetbi-hSERT bzw. CamKII α -tTA/GluCl α -Ptetbi-GluCl β) zeigten - zumindest bei den Nachkommen je eines Founders - eine starke und weitestgehend promotorspezifische Expression im Vorderhirn. Somit wurden zwei neue funktionale doppelt-transgene Mauslinien generiert. Bei der LacZ-Ptetbi-hSERT-Linie scheint eine Expression im Vorderhirn nicht sinnvoll, da SERT natürlicherweise nur im serotonergen System vorkommt. Da der GluCl-Kanal der GluCl α -Ptetbi-GluCl β -Linie ermöglicht spezifische Ziel-Neuronen selektiv und reversibel still zu legen, könnten durch die CamKII α -tTA/Ptet-GluCl-Linie potenziell Neuronen im Vorderhirn abgeschaltet und dadurch deren Funktion erforscht werden.