

Tobias Haas  
Dr. med.

## **Herstellung einer transgenen Mauslinie für die konditionale Ausschaltung markierter Gene in parvalbuminergen Interneuronen**

Geboren am 01.02.1974 in Esslingen am Neckar  
Reifeprüfung am 13.05.1993 in Esslingen am Neckar  
Studiengang Fachrichtung Medizin vom WS 1994 bis SS 2002  
an der Universität Heidelberg  
Physikum am 10.09.1996 an der Universität Heidelberg  
Klinisches Studium in Heidelberg und Montpellier/Frankreich  
Praktisches Jahr in Heidelberg, Paris, New York und Madrid  
3.Abschnitt der Ärztlichen Prüfung am 07.06.2002 an der Universität Heidelberg  
Promotionsfach: Neurologie  
Betreuerin: Frau Prof. Dr. med. H. Monyer

Macht man die elektrische Aktivität der Großhirnrinde eines Säugetiers, die summierend die Aktivität der Einzelneurone widerspiegelt, auf einem Bildschirm sichtbar (EEG), so erkennt man, je nach Ort der Ableitung, neben scheinbar ungeordneten Ereignissen, mehr oder weniger häufig wiederkehrende, oszillatorisch synchronisierte Entladungen ganzer Nervenzellpopulationen. Man beobachtet sie in verschiedenen Frequenzbereichen und stellt fest, daß sie von der Art der Aktivität des Versuchsobjekts beeinflußt werden. Es wird vermutet, daß oszillatorisch synchronisierte Entladungen, insbesondere des  $\gamma$ - bzw. 40 Hz-Frequenzbereichs, eine Rolle bei der Informationsverarbeitung spielen, wobei synchron feuernde Nervenzellen in einer von der jeweiligen Aufgabenstellung abhängigen, spezifischen anatomischen Zusammensetzung zeitlich koordinierte Neuronensembles bilden würden.

Die Ergebnisse zahlreicher Arbeiten deuten darauf hin, daß Interneurone, experimentell herausgelöst aus ihrer Vernetzung mit Prinzipalzellen und untereinander lediglich über hemmende GABAerge Synapsen kommunizierend, aufgrund ihrer intrinsisch, resonanten Eigenschaften nach tonischer Erregung synchrone Oszillationen im erweiterten 40 Hz-Bereich auszubilden vermögen und damit die Aktionspotentiale von wieder ins neuronale Netz eingegliederten Prinzipalzellen in der von ihnen vorgegebenen Frequenz rhythmisieren können.

Von besonderer Wichtigkeit für den Vorgang der Synchronisation scheinen die in einer eigenen Klasse zusammengefaßten parvalbuminergen Korb- und Kandelaberinterneuronen zu sein, die ihre hemmende Wirkung untereinander und am Zellsoma bzw. Axonhügel von Prinzipalzellen entfalten.

Um die tatsächliche Bedeutung dieser Interneurone und einzelner ihrer physiologischen Parameter für die  $\gamma$ -Oszillationen, über die experimentelle Reichweite von Computersimulationen und pharmakologischen Manipulationen an in vitro-Hirnschnitten hinausgreifend, an einem Versuchstier analysieren zu können, wurde im Rahmen dieser Arbeit eine genetisch manipulierte Mauslinie hergestellt, die in ihren parvalbuminergen Korb- und Kandelaberinterneuronen von etwa dem 8. postnatalen Tag an eine spezifische Expression des Rekombinationsenzym Cre-Rekombinase besitzen soll (Parvalbumin-Cre-Mauslinie). Dieses Enzym entfernt in den Zellen, in denen es exprimiert wird, selektiv mit *loxP*-Stellen markierte Abschnitte aus dem DNS-Doppelstrang (Cre-*loxP*-System der genetischen Rekombination).

So läßt sich theoretisch jedes beliebige Gen, nach Markierung mit *loxP*-Stellen in einer individuellen Mauslinie, durch Verpaarung mit der Parvalbumin-Cre-Mauslinie aus dem Genom der Nachkommenschaft im Sinne eines konditionalen, räumlich und zeitlich definierten knock-outs, entfernen.

Zu diesem Zweck wurde dem Stop-Codon der endogenen Parvalbuminsequenz mittels homologer Rekombination folgende genetische Neuinformation hintangefügt: Ein IRES-Element, welches die 5'cap-unabhängige Translation polycistronischer RNS ermöglicht, das Cre-Rekombinasegen einschließlich eines Polyadenylierungssignals sowie ein Neomycin-Resistenzgen für die Selektion der Rekombinanten in Mausstammzellen.

Da eine verlässliche Cre-Indikatormauslinie bis zum Zeitpunkt der Abfassung dieser Arbeit noch nicht verfügbar war, steht der Nachweis einer funktionellen Cre-Expression in den parvalbuminergen Interneuronen der Parvalbumin-Cre-Mauslinie noch aus. Erste immunhistochemische Analysen einer Verpaarung der Parvalbumin-Cre-Mauslinie mit der GluR-A<sup>2lox</sup>-Linie scheinen jedoch auf eine funktionelle Cre-Rekombinaseexpression in diesen Zellen hinzudeuten. Robuste Cre-Expression vorausgesetzt, ließen sich in Anwendung des Cre/*loxP*-Systems der genetischen Rekombination weitere zeitlich definierte knock-outs von mit *loxP*-Stellen zur Exzision markierten Genen in Parvalbumin-positiven Korb- und Kandelaberinterneuronen herstellen. Wichtig für die Ausprägung des  $\gamma$ -Entladungsrhythmus scheinen neben metabotropen Glutamatrezeptoren für die tonische Erregung besonders interneuronale Rezeptorstrukturen für die ionotrope synaptische Hemmung, GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren, und für die schnelle ionotrope synaptische Erregung, AMPA-Rezeptoren, zu sein. Anhand konditionaler knock-outs der Gene dieser Rezeptorproteine könnten die physiologischen Parameter der oszillatorischen Synchronisation am Lebewesen untersucht, die spezifische Rolle parvalbuminergere Interneurone bei diesem Vorgang definiert und letztlich die Bedeutung der  $\gamma$ -Oszillationen für die Funktionsfähigkeit des Säugerhirns evaluiert werden.