

Lars Tönges  
Dr. med.

## **Generierung und Analyse transgener Mäuse mit Fluoreszenz-markiertem N-Methyl-D-Aspartat-Rezeptor 2D**

Geboren am 08.07.1974 in Fritzlar  
Staatsexamen am 16.05.2003 an der Universität Heidelberg

Promotionsfach: Neurologie  
Doktorvater: Prof. Dr. med. Hannah Monyer

Glutamat ist der bedeutendste exzitatorische Neurotransmitter im zentralen Nervensystem. Seine Funktionen im Gehirn der Säugetiere werden durch verschiedene Glutamatrezeptoren reguliert. Die NMDA-Rezeptoren besitzen eine Schlüsselposition bei der glutamatergen Signalübertragung und stellen zusammen mit den AMPA-Rezeptoren die große Gruppe der ionotropen Glutamat-Rezeptoren dar. Ein NMDA-Rezeptor besteht aus mehreren Untereinheiten (NR1, NR2 und NR3), von denen vor allem die verschiedenen NR2-Untereinheiten über die funktionellen Eigenschaften des Rezeptors entscheiden.

NR1/NR2D-Rezeptor-Komplexe wurden bisher vor allem *in vitro* untersucht. Die Markierung des NR2D-Rezeptors mit einem fluoreszierenden Protein würde eine Detektion NR2D-enthaltender Zellen und Experimente im akuten Hirnschnitt ermöglichen.

Die NR2D-Rezeptor-Gensequenz wurde anhand von verschiedenen Lambda-Klonen einer genomischen Maus-DNA Bibliothek entschlüsselt. Mit einem Testkonstrukt wurde in HEK293-Zellen nachgewiesen, dass die physiologischen Eigenschaften der NR2D-Rezeptor-Untereinheit nach Fusion mit dem grün fluoreszierendem Protein (EGFP) unverändert bleiben. Zur spezifischen Markierung NR2D-enthaltender Kanäle wurden transgene Mäuse generiert, die ein Fusionsprotein aus EGFP und NR2D cDNA unter der Kontrolle des NR2D Promotors exprimieren. Verwendet wurde ein 160kb großer Maus-BAC-Klon, in den das Fusionskonstrukt nach dem translationalen Start des NR2D-Gens eingefügt wurde.

Die Expression der EGFP-NR2D-Rezeptoren auf mRNA Ebene korrespondiert anhand *in-situ*-Hybridisierungen bezüglich der örtlichen und zeitlichen Differenzierung nahezu vollständig mit der endogenen NR2D-Rezeptor Expression von P14 und P21 alten wildtyp Mäusen. Eine ausgeprägte Expression ist vor allem in Mittelhirnstrukturen mit Betonung der thalamischen und hypothalamischen Kerngebiete zu finden. Im akuten Hirnschnitt fluoreszieren die Zellkörper betont granulär und zytoplasmatisch. Nervenfortsätze sind insgesamt schwach markiert. In anti-EGFP-DAB-Übersichtsfärbungen zeigt sich ein Interneuron-artiges Verteilungsmuster im Hippocampus. Ein Großteil der NR2D-positiven Neurone in CA1 ist positiv für Parvalbumin.

Die EGFP-Fluoreszenzmarkierung der NR2D-Rezeptoren ermöglicht erstmals die Analyse der NR2D-Rezeptor-Funktion im akuten Hirnschnitt und eine elektronenmikroskopische Analyse der NR2D-Lokalisation auf synaptischer Ebene. Immunhistochemische und elektrophysiologische Untersuchungen legen eine rein interneuronale Expression des NR2D-Rezeptors nahe und lassen aufgrund seiner einzigartigen funktionellen Eigenschaften eine entscheidende Rolle im Rahmen interneuronaler Netzwerke vermuten.