

Cordelia Schwarz  
Dr. med.

**Das Expressionsmuster von GABA<sub>A</sub>- Rezeptoruntereinheiten in GABAergen Interneuronen des Hippocampus und Entwicklung eines *in vitro* Testsystems für einen interneuronspezifischen "Knockout" einer GABA<sub>A</sub>-Rezeptoruntereinheit.**

geboren am 26.6.1972 in Würzburg

Reifeprüfung am 10.7.1991 in Würzburg

Studiengang der Fachrichtung Medizin vom WS 1991/1992 bis SS 1999

Physikum am 14.9.1993 an der Universität Würzburg

Klinisches Studium in Heidelberg und Montpellier/Frankreich

Praktisches Jahr in London und Heidelberg

Staatsexamen am 7.5.1999 an der Universität Heidelberg

Promotionsfach: Neurologie

Doktormutter: Prof. Dr. med. H. Monyer

Um die Bedeutung von 40 Hz- Oszillationen in Netzwerken von GABAergen Interneuronen zu untersuchen, sollen transgene Mäuse generiert werden. In diesen soll ein für die Entstehung der Oszillationen notwendiges mit *loxP* - Stellen versehenes Kandidatengen durch Kreuzung mit einer das Enzym Cre-Rekombinase in GABAergen Interneuronen exprimierenden Mauslinie selektiv in diesem Zelltyp ausgeschaltet werden.

In dieser Arbeit wurde ein Kandidatengen für einen interneuronspezifischen "Knockout" zur Unterbrechung der 40 Hz- Oszillationen in Mäusen bestimmt.

Dazu wurde mit Hilfe der Einzelzell-PCR die Untereinheitenzusammensetzung von GABA<sub>A</sub>- Rezeptoren in GABAergen Interneuronen sowie in Körnerzellen des Gyrus dentatus untersucht. In den AHIs waren vor allem die  $\alpha$ 2-,  $\beta$ 2-,  $\beta$ 3- und  $\gamma$ 2-Untereinheiten exprimiert, in den Körnerzellen bei den  $\alpha$ - Untereinheiten ausschließlich die  $\alpha$ 2-,  $\alpha$ 4- und die  $\alpha$ 5-Untereinheit, sowie stark die  $\beta$ 3- und die  $\gamma$ 2-Untereinheit. Ein besonderer Schwerpunkt lag auf dem Expressionsmuster von GABA<sub>A</sub>- Rezeptoruntereinheiten in Korbzellen, da diese hauptsächlich für die Generierung von 40 Hz- Oszillationen verantwortlich gemacht werden. Dabei wurde vor allem eine Expression der mRNA der  $\alpha$ 2-,  $\beta$ 2-,  $\beta$ 3-,  $\gamma$ 1- und  $\gamma$ 2- Untereinheiten

gefunden. Als Kandidatengen für einen interneuronspezifischen "Knockout" wurde dennoch die  $\alpha 1$ -Untereinheit bestimmt, die nur in 21% bzw. 38% der untersuchten Zellen exprimiert war, da unsere Daten darauf hinweisen, daß mindestens zwei verschiedene Subpopulationen von Korbzellen existieren, von denen die Subpopulation der parvalbuminpositiven Korbzellen die  $\alpha 1$ - Untereinheit exprimiert. Dieser Subtyp von Korbzellen ist für die Generierung der 40 Hz- Oszillationen verantwortlich.

Außerdem wurden die kinetischen und pharmakologischen Eigenschaften der GABA<sub>A</sub>- Rezeptoren von Korbzellen charakterisiert, über die bisher wenig bekannt war. Die Applikation von 1 mM GABA für 100 ms an "nucleated patches" führte zu einem Strom mit einem schnellen Aufstrich und einem deutlichen biexponentiellen Abfall. Dieser Abfall könnte auf einer starken Desensitisierung der Rezeptoren beruhen. Die Zugabe von Zn<sup>2+</sup> verursachte über einen nicht-kompetitiven Mechanismus einen deutlichen blockierenden Effekt auf den Spitzenstrom und die langsame Komponente. Die Zn<sup>2+</sup>- Sensitivität soll laut früheren Studien von der Abwesenheit von  $\gamma$ -Rezeptoruntereinheiten abhängen. In dieser Arbeit wurde jedoch mit Einzelzell-PCR und pharmakologischen Untersuchungen mit Flunitrazepam die Expression von funktionellen  $\gamma$ -Untereinheiten nachgewiesen, so daß zusätzliche Faktoren die Zn<sup>2+</sup>- Sensitivität von nativen GABA<sub>A</sub>- Rezeptoren zu bestimmen scheinen.

Ferner wurde ein Testsystem entwickelt, um zu zeigen, daß die Cre-Rekombinase über ein IRES-Element dicistronisch an die Expression von GAD67 gekoppelt und somit spezifisch in GABAergen Interneuronen exprimiert werden kann. Dazu wurde ein Testkonstrukt in dem Vektor pRK7 hergestellt, in dem ein IRES-Element, an dessen Ende die cDNS der Cre-Rekombinase gehängt wurde, unmittelbar hinter den Translationsstop der GAD67 cDNS kloniert wurde. Dieses Konstrukt wurde in die Indikatorzelllinie MS4pAM, eine embryonale Stammzelllinie, transfiziert und die Expression der Cre- Rekombinase mittels X-Gal Färbung nachgewiesen. Die Expression von GAD67 wurde in HEK293 Zellen durch indirekte Immunfluoreszenz gezeigt.

Zur Herstellung der Targeting-Vektoren für Mäuse, die die Cre-Rekombinase selektiv in GABAergen Interneuronen exprimieren, wurde genomische Sequenzinformation des 3'-Endes von GAD67 benötigt. Dazu wurde das 3'-Ende von GAD67 aus einer genomischen DNS-Bank isoliert und ein 11 kb großes Fragment um den Translationsstop mit Restriktionsverdau kartiert. Aus dem kartierten Fragment wurden die 800 bp direkt um den Translationsstop sequenziert.

Auf der Grundlage dieser Ergebnisse werden jetzt Mäuse für einen interneuronspezifischen "Knockout" zur Unterbrechung der 40 Hz- Oszillationen hergestellt