Leuchtende Proteine im Nervensystem der Maus

Anja Scheller und Frank Kirchhoff

Zusammenfassung
Transgene Mauslinien mit zelltypspezifischer Expression fluoreszenter Proteine (FPs) im Nervensystem sind zu einem der wichtigsten Routine-Instrumente neurobiologischer Grundlagenforschung geworden. Gut charakterisierte regulatorische Genelemente steuern die FP-Expression in Neuronen, Astrozyten, Oligodendrozyten und Mikroglia. Darüber hinaus wurden genkodierte Bio-Sensoren und - Modulatoren entwickelt, die sowohl die Beobachtung intrazellulärer Signalwege *in vivo* erlauben, als auch die direkte Manipulation neuronaler Schaltkreise durch lokale Lichtreize.

Abstract
Fluorescent proteins in the nervous system of the mouse.
Transgenic mouse lines with cell type-specific expression of fluorescent proteins (FPs) in the nervous system became an important instrument of neurobiological research. Well characterized regulatory DNA elements control the expression of FPs in neurons, astrocytes, oligodendrocytes and microglia. In addition, genetically encoded bio-sensors and –modulators have been developed which not only allow the observation of intracellular signalling cascades, but also the direct manipulation of neuronal circuits by locally applied light pulses.

Key words: fluorescent proteins; GFP; channelrhodopsin; transgenic mouse; biosensor

Einleitung

Aus der modernen Neurobiologie sind gentechnisch veränderte Organismen mit einer Expression diverser fluoreszenter Proteine (FPs) nicht mehr wegzudenken. An dieser Stelle wollen wir einen Überblick über weit verbreitete bzw. interessante transgene Mauslinien mit FP-Expression im Nervensystem und ihre Einsatzgebiete anhand von Beispielen geben. Eine kurze Einführung in die drei unterschiedlichen Ansätze zur Herstellung genmodifizierter Mausmodelle ist im Exkurs beschrieben.

Der größte Vorteil der FPs ist ihre intrinsische Fluoreszenz, die es ermöglicht, ihre Expression nicht invasiv einfach durch Betrachten der Präparate mit geeigneten Lichtquellen zu untersuchen. Keine aufwendigen Färbetechniken werden benötigt. Die erste selektive Expression eines FP in Hirnzellen transgener Mäuse gelang Albee Messing und seinen Kollegen 1997. Sie ließen mit Hilfe einer Variante des grünen FP (hGFP-S65T) unter Kontrolle des humanen GFAP-Promotors (*glial fibrillary acidic protein*, saures Gliafaserprotein) den häufigsten Gliazelltyp des Gehirns, die Astroglia erstmalig aufleuchten (Zhuo et al. 1997).

Seither wurden zahlreiche transgene Mauslinien zur Markierung aller Zelltypen des zentralen und peripheren Nervensystems hergestellt. Am häufigsten werden FPs immer noch als Reporter zytosolisch exprimiert. Dies ermöglicht die Analyse der vollständigen Zellstruktur, im fixierten wie auch im lebenden Gewebe. Zunehmend spielt aber die Markierung von ausgewählten Proteinen wie z.B. Transmitterrezeptoren oder intrazellulären Signalproteinen mit FPs eine große Rolle. Varianten der FPs können selbst als Indikatoren von Signalkaskaden oder zur Modulation von Zelleigenschaften eingesetzt werden.

Analyse neuronaler Plastizität und Degeneration *in vivo*

Zur transgenen Expression von FPs in Neuronen hat das von Pico Caroni charakterisierte Thy1.2-Minigens die breiteste Anwendung gefunden (Caroni 1997). Dieses reduzierte Gen des murinen Thy1-Proteins zeichnet sich durch ein exklusiv neuronales Verteilungsmuster aus. Gleichzeitig ist der Thy1.2-Promotor aber sehr empfindlich gegenüber dem genomischen Integrationsort. Guoping Feng im Labor von Joshua Sanes und Jeff Lichtman machte sich diese Eigenschaft zunutze und bot im Jahr 2000 einen ganzen Katalog mit transgenen Mäusen an, in denen verschiedene, überlappende und nicht überlappende Subpopulationen mehrheitlich exzitatorischer Neurone durch Expression von FPs mit verschiedenen spektralen Eigenschaften (ECFP, *cyan*; EGFP, *green*; EYFP, *yellow* und DsRed, *red*) unterschieden werden konnten (Feng et al. 2000). Die *E*XFPs (enhanced XFPs) stellen die hellsten und am meisten verwendeten FPs dar. Für eine komplette Übersicht über die Vielfalt der FPs sei auf den ausgezeichneten Übersichtsartikel von Atsushi Miyawaki verwiesen (Miyawaki 2005). Inzwischen sind diese Mäuse auf der ganzen Welt verteilt und werden in einer Plethora neurobiologischer Fragestellungen eingesetzt. Die Gruppen von Wenbiao Gan und Karel Svoboda nutzen z.B. diese Mäuse, um sich die entwicklungs- und erfahrungsabhängige Plastizität der Dendriten mit ihren Spines bei Projektionsneuronen der Hirnrinde über viele Monate hinweg anzuschauen (Grutzendler et al. 2002; Trachtenberg et al. 2002). Martin Kerschensteiner und Thomas Misgeld hingegen beobachten die Degeneration einzelner Axone im Rückenmark (Misgeld et al. 2007b; Kerschensteiner et al. 2005).

Fluoreszente Mäuse und die Entwicklung, Heterogenität und Dynamik der Astroglia

Die Verwendung transgener Mäuse mit Astrozyten-spezifischer FP-Expression spielt aufgrund der deutlich vereinfachten Zellidentifizierung für die Beantwortung zahlreicher Fragen der Astrozyten-Biologie eine große Rolle. Am weitesten verbreitet sind neben der bereits oben erwähnten GFAP-GFPS65T-Mauslinie (Zhuo et al. 1997) Linien, die EGFP – ein noch helleres FP – exprimieren (Nolte et al. 2001). Diese Mauslinien werden insbesondere für elektrophysiologische und bildgebende Untersuchungen an akut isolierten Hirnschnitten, einzelnen Zellen oder auch *in vivo* eingesetzt. Sie spielten eine maßgebliche Rolle bei der Identifizierung der radialen Glia als neuronale Vorläuferzellen (Malatesta et al. 2003), der Identifizierung von NMDA-Rezeptoren auf Astrozyten (Schipke et al. 2001; Lalo et al. 2006) und der Untersuchung von viskoelastischen Eigenschaften (Lu et al. 2006). Aufgrund eines unterschiedlichen EGFP-Expressionsgrades konnten in der GFAP-EGFP-transgenen Maus erstmalig astrogliale Subpopulationen identifiziert werden. Im frisch isolierten Hippokampus-Schnitt findet man in hell fluoreszenten Astrozyten ausschließlich Glutamattransporter, während hingegen funktionelle AMPA-Rezeptoren in einer Astroglia-Population mit niedriger

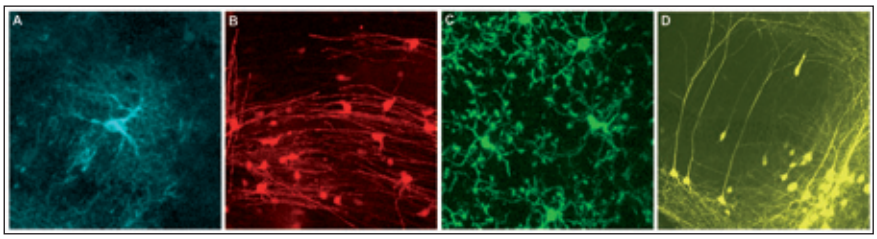


Abb. 1: Cytosolische Expression fluoreszenter Proteine unter Kontrolle neuraler Promotoren. (A) GFAP-Promotor-abhängige Expression des cyan-fluoreszenten ECFP in Astrozyten des Hirnparenchyms. (B) DsRed-exprimierende Oligodendrozyten in der weißen Substanz des Hirnstammes. (C) Grünfluoreszente Mikroglia patrouillieren ihre direkte zelluläre Nachbarschaft. (D) In Thy1-EYFP-Mauslinien sind immer nur Subpopulationen von Nervenzellen wie hier im Hippokampus durch ihre FP-Expression markiert.

Fluoreszenz vorkommen (Matthias et al. 2003). Die „hellen" Astrozyten sind morphologisch stark verzweigt, die „dunklen" Zellen hingegen haben lange Fortsätze mit deutlich weniger Ästen. Diese Zellen können auch das gliale Proteoglykan NG2 exprimieren und erfahren selbst synaptische Eingänge (Jabs et al. 2005). Eine ähnliche astrogliale Heterogenität wurde auch im Hirnstamm gefunden (Grass et al. 2004). Die GFAP-EGFP-Mäuse dienen häufig zur morphologischen Untersuchung von Neuron-Astroglia-Interaktionen *in situ*. Ein Teil der astroglialen Lamellipodien und Filopodien weisen eine hohe spontane Motilität an aktiven Synapsen auf (Hirrlinger et al. 2004), während sich bei Fortsätzen mit Kontakt zu neuronalen Zellkörpern keine Bewegungen dokumentieren ließ.

Neben dem GFAP-Promotor wurden inzwischen weitere Astrozyten-spezifische Promotoren eingesetzt, um eine selektive Expression fluoreszenter Proteine zu erreichen. Hierzu zählt der S100β-Promotor (Vives et al. 2003). Interessanterweise zeigen diese Mauslinien zum Teil auch eine Expression in einzelnen Gruppen von Oligodendrozyten und Nervenzellen. Noch ganz neu sind BAC-transgene Mäuse, die unter Verwendung der Glutamattransporter GLAST und GLT-1 hergestellt wurden. Analysen dieser Mäuse bestätigen, dass der häufig als Astroglia-spezifisch bezeichnete Glutamattransporters GLAST auch in Oligodendrozyten exprimiert werden kann .

Fluoreszente Mäuse und die Entwicklung, Heterogenität und Sensibilität der Oligodendrozyten

Oligodendrozyten sind die Myelin bildenden Gliazellen des zentralen Nervensystems. Neuere Arbeiten zeigen, dass sie nicht nur eine unumstrittene Rolle bei der elektrischen Isolation der Axone voneinander spielen und die Kaliumhomöostase regulieren, darüber hinaus scheinen sie maßgeblich die Gesundheit der Neurone zu beeinflussen (Lappe-Siefke et al. 2003). Für die Entwicklung von Mäusen mit der zelltypspezifischen Expression der FPs wurden bisher diverse Promotoren oligodendroglialer Gene verwendet. Die beiden wichtigsten sind der Proteolipid-Protein- (PLP)-Promotor sowie der CNP (*cyclic 3',5' nucleotide phosphohydrolase*)-Promotor. Während die erste PLP-transgene Maus mit fluoreszenten Oligodendrozyten sich zwar für FACS-Anreicherung von Oigodendrozyten und auch für elektrophysiologische Untersuchungen eignete, vermittelte das verwendete S65T-GFP nur eine relativ geringe Fluoreszenz (Fuss et al. 2000). Deutlich hellere Oligodendrozyten können jedoch in der PLP-EGFP-Maus untersucht werden (Mallon et al. 2002). In der Tat

Exkurs

Drei Wege zur Herstellung genetisch veränderter Mäuse mit fluoreszenter Protein-Expression

Den einfachsten Weg eine transgene Maus mit FP-Expression herzustellen, stellt die nicht-homologe Rekombination dar. Ein DNA-Fragment, das sich aus dem gewünschten Promotor (wenige kb eines zur zelltypspezifischen Expression nötigen Genabschnittes) und dem Gen des gewünschten FPs zusammensetzt (das Transgen-Konstrukt), wird in dem männlichen Vorkern einer befruchteten Eizelle injiziert. Das Transgen inkorporiert durch nicht-homologe Rekombination zufällig in das Mausgenom. Nach Injektion werden die so behandelten Oozyten in pseudoschwangeren Muttertieren ausgetragen. Eine einfache PCR-Analyse der genomischen DNA der geworfenen Mäuse zeigt die erfolgreiche Insertion in einem Foundertier an. Die Nachbarregionen des inserierten Transgens können einen großen Einfluss auf die erfolgreiche Expression des Proteins haben. Zahlreiche Foundertiere müssen auf ihr Expressionsmuster hin untersucht werden. Häufig beobachtet man daher, dass für integrationssensible Promotoren zahlreiche Linien mit stark variablem Expressionsmuster erhalten werden.

BAC (bacterial artificial chromosome)-transgene Tiere werden ähnlich hergestellt. Der Unterschied liegt im verwendeten DNA-Abschnitt zur Expressionsregulation des Transgens. Ein BAC enthält meistens ein komplettes Gen (bis zu 100 kb) und nicht nur wenige kb einer Promotorregion. Durch die Größe wird eine stärkere Unabhängigkeit vom genomischen Insertionsort erreicht. Das Exon mit dem Startcodon wird dann durch die gewünschte FP-Sequenz ersetzt. BAC-transgene Tiere zeichnen sich im Allgemeinen durch ein dem natürlichen Gen weitestgehend ähnliches Expressionsmuster aus. Ebenso wie bei den einfachen transgenen Mäusen das Transgen-Konstrukt mehrfach (häufig hintereinander) in das Genom inseriert ist, so kann auch das BAC-Konstrukt mehrfach integriert sein. Auf diese Weise wird ein hoher Expressionsgrad erreicht.

Der dritte Weg zur Herstellung einer genetisch veränderten Maus ist die homologe Rekombination. Ein entsprechend konstruierter Vektor rekombiniert mit einer einzigartigen Sequenz des gewünschten Zielgens und ersetzt die Wildtypsequenz (*knockin*). Vorteil dieses Ansatzes liegt zum einen an der vollständigen Übereinstimmung des Expressionsmusters des gewünschten Proteins mit dem gewählten Gen; zum anderen müssen auch nicht mehrere transgene Mauslinienen wie oben beschrieben auf Expression hin untersucht werden. Der Nachteil ist häufig der niedrige Expressionsgrad des Reporterproteins (z.B. wenn das Wildtyp-Gen nur wenig exprimiert wird, wie einige Transkriptionsfaktoren oder Transmitterrezeptoren). Auch können nur heterozygote Tiere untersucht werden, da das Ersetzen der Wildtyp-Sequenz durch das Reportergen in homozygoten Tieren eine vollständige Deletion des Wildtyp-Gens ergibt.

Neue Lehrbücher
Psychologie – Neurowissenschaften

www.spektrum-verlag.de

Allgemeine Psychologie – eine moderne Einführung

2. Aufl. 2007, 1.000 S., 286 Abb., geb.
€ (D) 54,95 / € (A) 56,50 / sFr 85,–
ISBN 978-3-8274-1780-0
Erscheint Okt. 2007

Jochen Müsseler
Allgemeine Psychologie

Jochen Müsseler hat ein Lehrbuch herausgegeben, das ergänzend zum Prüfungsstoff moderne Sichtweisen einbezieht, die spannend sind und für die psychologische Praxis und Forschungspraxis Gewicht haben. In sechs Kapiteln zu

- Wahrnehmung, Aufmerksamkeit und Bewusstsein
- Motivation, Volition und Emotion
- Lernen und Gedächtnis
- Sprachproduktion und -verstehen
- Denken und Problemlösen
- Handlungsplanung und -ausführung

kommen insbesondere die aktuellen Forschungsfragen zur Bewusstseinsthematik, zur Künstlichen Intelligenz mit ihren neuen kognitiven Modellen sowie Exekutiv-Funktionen und der Wahrnehmungs-Handlungs-Zusammenhang zur Sprache, dargestellt von Spezialisten.

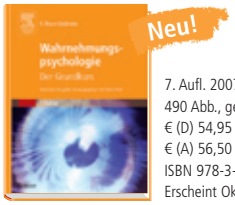
Dozentenstimmen zur 1. Auflage

„Endlich gibt es wieder eine umfassende Einführung in die Allgemeine Psychologie in deutscher Sprache. Sie ist aktuell, kompakt und erfreulich lesbar abgefasst."
Prof. Dr. H. Hecht, Universität Mainz

„Ein Buch, das für den deutschen Sprachraum schon lange überfällig war!"
Prof. Dr. Frank Rösler, Universität Marburg

„Fantastisch! Einfach nur fantastisch!"
Prof. Dr. Dr. Onur Güntürkün, Universität Bochum

Goldsteins Lehrbuchklassiker jetzt in Neuauflage



7. Aufl. 2007, 522 S.,
490 Abb., geb.
€ (D) 54,95 /
€ (A) 56,50 / sFr 85,–
ISBN 978-3-8274-1766-4
Erscheint Okt. 2007

Bruce E. Goldstein
Wahrnehmungspsychologie

In 16 Kapiteln beantwortet Goldsteins Lehrbuchklassiker u. a. die folgenden Fragen: Was ist Wahrnehmung? Was sind die neuronalen Mechanismen der Wahrnehmung? Inwieweit arbeitet das Gehirn ähnlich wie ein Computer? Wie wird das Netzhautbild verarbeitet? Wie nehmen wir Farbe wahr? Wie erkennen wir Objekte? Wie nehmen wir Tiefe und Größe von Objekten wahr? Wie erkennen wir Bewegung? Wie funktioniert unser Gehör? Wie nehmen wir Klänge und Lautstärken wahr? Wie erkennen und verstehen wir Sprache? Wie funktionieren unsere Sinne?

Wie das Gehirn das Verhalten steuert

2003, 496 S., 216 Abb., geb.
Früher € (D) 52,50,
jetzt € (D) 39,95 /
€ (A) 41,10 / sFr 62,–
ISBN 978-3-8274-0248-6

M. Pritzel / M. Brand / H. Markowitsch
Gehirn und Verhalten

Dieses Lehrbuch der Physiologischen Psychologie ist mit Blick auf die faszinierenden Prozesse in Körper und Hirn geschrieben, die unser Verhalten steuern. Beschrieben werden in fünf großen Abschnitten: die anatomischen und physiologischen Grundlagen, die Sinnessysteme und die Motorik, die Regulationsfunktionen von Gehirn und Körper wie Schlaf und Sexualität zusammen mit Hormon- und Immunsystem, höhere Funktionen des Bewusstseins, Funktionsstörungen bei neurologischen Erkrankungen, psychischen Störungen oder Sucht.

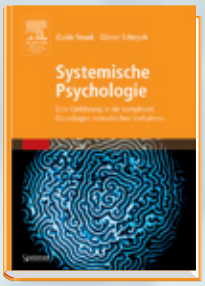
Komplett überarbeitet und auf dem neuestem Stand!

6. Aufl. 2007, 606 S.,
200 Abb., geb.
€ (D) 44,95 /
€ (A) 46,30 / sFr 69,–
ISBN 978-3-8274-1743-5

John R. Anderson
Kognitive Psychologie
Deutsche Ausgabe herausgegeben von Joachim Funke

John R. Anderson hat in der aktuellen Auflage seines Lehrbuchklassikers die modernen Erkenntnisse der Gehirnforschung und der Kognitionswissenschaft zusammengeführt und aufgezeigt, wie sich Prozesse der Wahrnehmung und Verarbeitung von Reizinformation mit Gedächtnisprozessen verknüpfen, die ihrerseits die Grundlage geistiger Fähigkeiten wie Sprache, Schlussfolgern, Problemlösen und Fähigkeitserwerb bilden.
In den 13 Kapiteln ist der Prüfungsstoff kompakt und übersichtlich gegliedert, anschaulich illustriert und durch Merksätze zu jedem Themenabschnitt einprägsam zusammengefasst. Ideal zur Prüfungsvorbereitung!

Systemische Psychologie – eine gut verständliche Einführung



2006, 346 S., 95 Abb., geb.
€ (D) 35,– /
€ (A) 36,– / sFr 54,–
ISBN 978-3-8274-1710-7

Guido Strunk / Günter Schiepek
Systemische Psychologie

Systemische Psychologie ist eine systematische und verständliche Einführung in die Theorien komplexer Systeme – die sich insbesondere durch Selbstorganisation strukturieren und selbst steuern können. Das Verständnis selbstorganisierender Prozesse liefert nicht nur eine spannende theoretische Perspektive, um das komplexe menschliche Verhalten, Wahrnehmen, Denken und Fühlen zu verstehen, sondern es bietet auch methodische Ansätze, um Interaktionsprozesse zwischen Menschen zu beschreiben und zu analysieren.

„Das Buch von Strunk und Schiepek unterscheidet sich insofern von anderen Publikationen zu diesem Themengebiet, als es die schmale Gratwanderung zwischen Lesbarkeit und Verständlichkeit sowie wissenschaftlichem Anspruch optimal bewältigt."
systeme

Sämtliche Preise verstehen sich inkl. Umsatzsteuer, zzgl. Versandkosten – Preise unter Vorbehalt.

Spektrum AKADEMISCHER VERLAG

ist in dieser Maus die Fluoreszenzintensität so hoch, dass man auch Zellen mit relativ schwacher Fluoreszenz noch gut erkennen kann. Ähnlich wie in der GFAP-EGFP-Maus zwei verschiedene astrogliale Zellpopulationen nachgewiesen wurden, können in der PLP-EGFP-Maus mehrere oligodendrogliale Zellpopulationen im sich entwickelnden Neokortex unterschieden werden: reife Oligodendrozyten und potenzielle Vorläuferzellen. In einer weiteren Mauslinie wird das rote fluoreszente Protein DsRed durch den PLP-Promotor reguliert. Diese Maus eignet sich besonders, um mithilfe grün fluoreszenter Kalzium-Indikatoren *in situ* oligodendrogliale Kalziumänderungen zu untersuchen (Hirrlinger et al. 2005).

Transgene Mäuse, in denen der CNP-Promotor die Expression von EGFP kontrolliert, zeichnen sich nicht nur durch die Markierung von besonders vielen jungen Oligodendrozyten aus, gut sind auch die myelinisierenden Fortsätze erkennbar (Belachew et al. 2001; Yuan et al. 2002). Aufgrund dieser Eigenschaft konnten im optischen Nerv der Maus strukturelle Veränderungen der Oligodendroglia während einer Ischämie analysiert werden (Salter und Fern 2005).

In vivo-Beobachtungen der Dynamik in Mikroglia

Zwei verschiedene Mauslinien werden derzeit verwendet, um fluoreszente Mikroglia-Zellen im zentralen Nervensystem zu analysieren. Während die Iba1 (*ionized calcium binding adapter molecule 1*)-EGFP-Maus (Hirasawa et al. 2005) eine klassische transgene Maus ist, so stellt die CX3CR1-EGFP-Maus eine Knockin-Variante dar (Jung et al. 2000). Homozygote Mäuse dieser Linie sind defizient für CX3CR1, dem Rezeptor für das von Neuronen sezernierte Chemokin Fraktalkin. Mithilfe der Zwei-Photonen-Laserscanmikroskopie (2P-LSM) konnte an dieser Maus erstmalig zum einen die enorme Ruhe-Motilität *in vivo* und zum anderen die schnellen Reaktionen der Mikroglia auf minimale nekrotische Läsionen des Hirnparenchyms oder der Blutgefäße gezeigt werden (Nimmerjahn et al. 2005; Davalos et al. 2005). Mikrogliazellen orten und untersuchen permanent ihre benachbarte Umgebung mit ihren Fortsätzen und sind so in der Lage, sofort auf Verletzungen zu reagieren. Unverzüglich nach einer Schädigung der Blut-Hirn-Schranke schalten sie ihrerseits von der reinen Überwachung des Nachbargewebes auf Einwandern in das Verletzungsgebiet um.

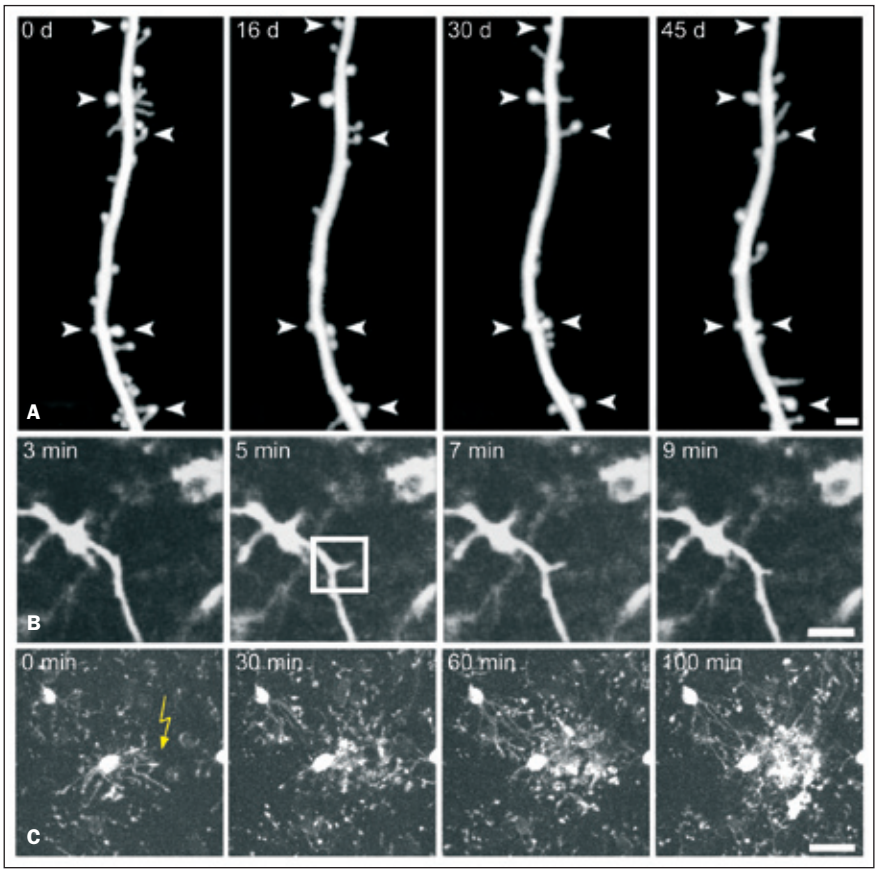


Abb. 2: Plastizität und Motilität neuraler Zellen *in vivo*.
(A) In der Hirnrinde transgener Thy1-EYFP-Mäuse kann über viele Tage hinweg Dynamik der Spines beobachtet werden. Zwischen der ersten Abbildung (direkt nach der Implantation des Glasfensters in die Schädeldecke) und der letzten Abbildung liegen 45 Tage. Mit den Pfeilen sind Spines markiert, die in allen Abbildungen vorliegen. Maßstab 2 µm. (B) Astrozyten zeigen ähnliche Bewegungen an ihren Fortsätzen wie Neurone. Innerhalb von Minuten kann in transgenen Mäusen der Auswuchs wie auch die Rückbildung eines Spine ähnlichen Filopodiums beobachtet werden (weißes Quadrat). Maßstab 5 µm. (C) Mikrogliazellen zeigen im Vergleich zu Neuronen und Astrozyten eine deutlich erhöhte Motilität. Diese Bewegungen können durch das Setzen einer Laserläsion (Zeitpunkt 0, gelber Pfeil) gesteigert werden. In wenigen Minuten bewegen sich die Fortsätze der Mikroglia auf die Verletzung zu. Maßstab 20 µm. Abbildung modifiziert nach Xu et al. 2007; Hirrlinger et al. 2004; Nimmerjahn et al. 2005.

Transgene Expression fluoreszenter Proteine in Zellorganellen des ZNS

Für die Neurobiologie sind zwei Zellorganellen von besonderer Bedeutung: zum einen die Mitochondrien als Kraftwerke von Neuronen oder Gliazellen und zum anderen synaptische Terminalen, die Orte der Neurotransmitter-Ausschüttung.

Thomas Misgeld und Martin Kerschensteiner haben sogenannte MitoMäuse hergestellt, in denen cyan- bzw. gelb-fluoreszente Proteine selektiv mittels einer Zielsequenz der mitochondrialen Cytochrom- C-Oxidase (cox8) in Mitochondrien exprimiert sind. Die Expression wird gesteuert durch den Thy1- bzw. den NSE (Neuron-spezifische Enolase 2, Eno2)-Promotor (Misgeld et al. 2007a). Sie konnten in akuten Nerv-Muskel-Explantaten beobachten, dass sich die Anzahl der transportierten Mitochondrien in großen und kleinen motorischen Axonen nicht unterscheidet. Vorher wurde vermutet, dass der Mitochondrientransport eine Funktion des Axondurchmessers sei. Diese Resultate deuten daraufhin, dass der Umsatz in kleinen Motorneuronen höher sein muss als in größeren Neuronen. Es wurde auch gezeigt, dass der anterograde Transport deutlich häufiger stattfindet als der retrograde. Daraus folgt, dass die Mitochondrien entweder während des anterograden Transports oder aber in den Synapsen teilweise abgebaut werden müssen. Diese Beobachtung weist den Synapsen wichtige metabolische Funktion zu.

Zukünftige Arbeiten müssen zeigen, welche Konsequenzen dieser Befund für Erkrankungsmodelle haben kann.

Die selektive Markierung von synaptischen Terminalen gelang durch einen selektiven Knockin eines Fusionsproteins zwischen dem Synapsenprotein Munc13-1 und EYFP in den *munc13-1*-Locus (Kalla et al. 2006). Das volle Potenzial dieser genmodifizierten Mäuse in Bezug auf die möglichen Anwendungen können bisher nur abgeschätzt werden. Die fluoreszenten Terminalen können z.B. per FACS sortiert werden und für Proteomik-Ansätze verwendet werden. In Neuronenkulturen dieser Mäuse gelang bereits die Dynamik des Munc13-1-EYFP-Fusionsproteins, das sich wie Wildtyp-Munc13-1 verhält, aufzuzeigen. Die Möglichkeit der direkten Beobachtung in lebenden Präparaten wie akut isolierte Hirnschnitte wird ein weiteres zukünftiges Betätigungsfeld sein.

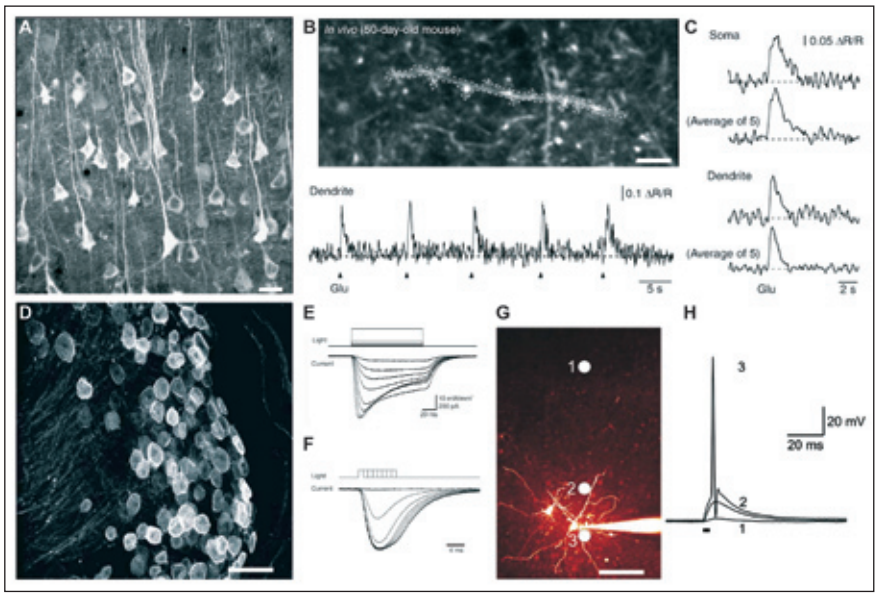


Abb. 3: Transgene Expression fluoreszenter Bio-Sensoren und -Modulatoren (A – C): Kalzium-Imaging in transgenen Mäusen mit Expression eines Troponin-C-basierten CFP/YFP-Biosensors. (A) 2-Photonen-Anregung in akut isolierten Schnitten zeigt eine starke Expression des CerTN-L15 in Neuronen in den Schichten 2 und 3 der Hirnrinde. Maßstab 20 µm. (B) *In vivo*-Messungen der Kalzium-Änderungen in Spines. Das gemessene Gebiet ist mit den gestrichelten Linien angezeigt. Deutliche Kalzium-Transienten können durch kurze, iontophoretische Glutamatapplikationen (40 ms) induziert werden. Maßstab 5 µm. (C) Individuelle und gemittelte Kalzium-Transienten können simultan im Soma (obere Spuren) und im Dendriten eines Neurons gemessen werden. (D – H): Lichtstimulation in Channelrhodopsin 2-transgenen Mäusen. (D) Die Abbildung zeigt eine starke Chop-2-EYFP-Expression in Neuronen der Hinterwurzelganglien. Maßstab 50 µm. (E) Belichtung transgener Zellen führt zu lichtinduzierten Strömen in Chop-2-positiven Neuronen des Kortex. Die Amplitude der lichtinduzierten Ströme (untere Kurven) ist positiv abhängig von der Intensität des Lichtes. (F) Lichtinduzierte Ströme variieren mit der Dauer der Belichtung. (G)/(H) Lichtstimulation wurde an drei verschiedenen Punkten an einem während der Patch clamp-Analyse mit Alexa 594 gefüllten Neuron gemessen. Nur die Stimulation im Soma (Punkt 3) führt zu einem messbaren Aktionspotenzial. Maßstab 100 µm. Abbildung modifiziert nach Wang et al. 2007; Heim et al. 2007.

Verwendung genetisch kodierter Kalziumindikatoren für *in vivo*-Untersuchungen

Kalzium-Konzentrationsänderungen stellen einen der wichtigsten intrazellulären Signalwege dar. In den vergangenen Jahren gelang die Herstellung zweier Klassen fluoreszenter Kalziumindikatorproteine (FCIPs), die auch den Einsatz in transgenen Tieren erlauben. Prinzipiell basieren FCIPs auf der Veränderung des Fluoreszenzenergietransfers von dem Donor-Protein CFP auf das Akzeptor-Protein YFP nach Bindung an eine geeignete Proteindomäne zwischen den beiden FPs. Während für die ersten FCIPs die Ca^{2+}-Bindungsregion des Calmodulins verwendet wurde (Cameleons, Nagai et al. 2004), besitzen neuere FCIP-Varianten eine ähnliche Region aus dem Muskelprotein Troponin C (Heim et al. 2007). Gerade letztere sind für Analysen im Nervensystem besonders geeignet, da Troponin C ausschließlich im Muskel exprimiert wird und nicht mit neuralen Calmodulin-bindenden Proteinen wechselwirkt.

FCIPs sind wie herkömmliche fluoreszente Proteine genetisch kodiert und können gewebe- und zelltypspezifisch exprimiert werden. CerTnC-L15 ist ein Ca^{2+}-Biosensor, der auf Troponin C basiert und die CFP-Variante Cerulean als Donor sowie die YFP-Variante Citrine als Akzeptor nutzt (Heim et al. 2007). Die Gruppe um Oliver Griesbeck verwendete die Thy-1-Kassette, um das Protein neuronal in transgenen Mäusen zu exprimieren. Sie erhielten 17 Mauslinien mit verschiedenen Expressionsmustern. Mithilfe dieser Mäuse können sekundenschnelle Kalziumsignale in so winzigen Strukturen wie Spines aufgelöst werden.

Manipulation transgener Mäuse durch licht-aktivierbare Ionenkanäle

Eine vollständig neue Kategorie lichtsensibler Proteine wurde von Georg Nagel, Ernst Bamberg und Kollegen entdeckt. Bei der Charakterisierung von Rhodopsinen aus Grünalgen erkannten sie, dass zwei dieser Proteine durch Lichtpulse aktivierbare Ionenkanäle waren, die sie Channelrhodopsine nannten (Nagel et al. 2003). Während Channelrhodopsin-1 ein Protonenkanal ist, so ist Channelrhodopsin-2 (Chop-2) ein nicht selektiver Kationenkanal. Karl Deisseroth und Ed Boyden ließen Chop-2-EYFP-Fusionsproteine funktionell in primären Neuronen exprimieren. Kurze Lichtblitze von Millisekunden-Dauer konnten Aktionspotenziale in ihnen auslösen (Boyden et al. 2005). Kürzlich präsentierte Guoping Feng, der auch die ersten Thy1-FP-Mäuse hergestellt hatte, sieben verschiedene transgene Mauslinien mit neuronaler Chop-2-EYFP-Expression. Durch Lichtpulsserien mit einer Frequenz von bis zu 30 Hertz können *in vivo* Nervenzellen zum schnellen repetitiven Feuern gebracht werden. Variieren der Amplitude und Frequenz dieser Lichtpulse erlaubt eine sehr genau Kontrolle der neuronalen Aktionspotenzialrate. In ersten Experimenten konnten Details der Verschaltung zwischen dem piriformen Kortex und den Mitral-Zellen im Bulbus Olfactorius aufgeklärt werden (Arenkiel et al. 2007). Die Aufklärung weiterer Schaltkreise der Hirnrinde *in vivo* wird sicher folgen.

Ausblick

Gerade einmal vor zehn Jahren wurde die erste transgene Mauslinie mit FP-Expression im Nervensystem beschrieben. Seither sind

Tab.: Mauslinien mit spezifischer Expression fluoreszenter Proteine im Nervensystem

Promotor/ Gen	fluoreszentes Protein	Transgen-Typ	Haupt-Expressionsmuster	Referenz
Zytosolische Expression				
Thy1.2	CFP, GFP, RFP, YFP	transgen	neuronal	Feng et al. 2000
Thy1.2	EYFP, HcRed	transgen	neuronal	Hirrlinger et al. 2005
GFAP	S65T-GFP	transgen	astroglial	Zhuo et al. 1997
GFAP	EGFP	transgen	astroglial, NG2-glial	Nolte et al. 2001
GFAP	EGFP, AmCyan, mRFP1, ECFP	transgen	astroglial	Hirrlinger et al. 2005
GLAST	DsRed	BAC	astroglial, gering oligodendroglial	Regan et al. 2007
GLT-1	EGFP	BAC	astroglial	Regan et al. 2007
PLP	EGFP	transgen	oligodendroglial, NG2-glial	Mallon et al. 2002
PLP	S65T-GFP	transgen	oligodendroglial	Fuss et al. 2000
PLP	DsRed	transgen	oligodendroglial	Hirrlinger et al. 2005
CNP	EGFP	transgen	oligodendroglial, NG2-glial	Yuan et al. 2002
NG2	DsRed	BAC	NG2-glial	Wigley et al. 2007
CX3CR1	EGFP	knockin	microglial	Jung et al. 2000
Iba1	EGFP	transgen	microglial	Hirasawa et al. 2005
Expression in Zellorganellen				
Thy1.2	mitoCFP	transgen	Mitochondrien, neuronal	Misgeld et al. 2007a
NSE	mitoYFP	transgen	Mitochondrien, neuronal	Misgeld et al. 2007a
Munc13-1	EYFP	knockin	synaptische Terminalen	Kalla et al. 2006
Bio-Sensoren und -Modulatoren				
Thy1.2	CerTnC-L15	transgen	neuronal	Heim et al. 2007
Thy1.2	Chop-2-EYFP	transgen	neuronal	Arenkiel et al. 2007

Dutzende neuer Linien hinzugekommen. Nahezu täglich werden die Ergebnisse neuer fluoreszenzmikroskopischer Untersuchungen dieser Mäuse publiziert. Inzwischen werden nicht nur mit hoher räumlicher und zeitlicher Auflösung die Bildung synaptischer Kontakte und Signale aufgezeichnet, es können sogar gezielt Neurone durch Lichtpulse im Gehirn angeregt oder gehemmt werden. Neue fluoreszente Proteine mit perfekt geschneiderten Eigenschaften, die Weiterentwicklung der bildgebenden Verfahren und gezielte Herstellung entsprechender transgener Mausmodelle werden weiterhin die Aufklärung der Wirkungsweise des Gehirns beschleunigen.

Literatur

Arenkiel, B.R., Peca, J., Davison, I.G., Feliciano, C., Deisseroth, K., Augustine, G.J., Ehlers, M.D. und Feng, G. (2007): *In vivo* light-induced activation of neural circuitry in transgenic mice expressing channelrhodopsin-2. *J Neurosci* 54: 205-218.

Feng, G., Mellor, R.H., Bernstein, M., Keller-Peck, C., Nguyen, Q.T., Wallace, M., Nerbonne, J.M., Lichtman, J.W. und Sanes, J.R. (2000): Imaging neuronal subsets in transgenic mice expressing multiple spectral variants of GFP. *J Neurosci* 28: 41-51.

Heim, N., Garaschuk, O., Friedrich, M.W., Mank, M., Milos, R.I., Kovalchuk, Y., Konnerth, A. und Griesbeck, O. (2007): Improved calcium imaging in transgenic mice expressing a troponin C-based biosensor. *Nat Methods* 4: 127-129.

Jung, S., Aliberti, J., Graemmel, P., Sunshine, M.J., Kreutzberg, G.W., Sher, A. und Littman, D.R. (2000): Analysis of fractalkine receptor CX(3)CR1 function by targeted deletion and green fluorescent protein reporter gene insertion. *Mol Cell Biol* 20: 4106-4114.

Miyawaki, A. (2005): Innovations in the imaging of brain functions using fluorescent proteins. *J Neurosci* 48: 189-199.

Nimmerjahn, A., Kirchhoff, F. und Helmchen, F. (2005): Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo. *Science* 308: 1314-1318.

Nolte, C., Matyash, M., Pivneva, T., Schipke, C.G., Ohlemeyer, C., Hanisch, U.K., 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.

Zhuo, L., Sun, B., Zhang, C.L., Fine, A., Chiu, S.Y. und Messing, A. (1997): Live astrocytes visualized by green fluorescent protein in transgenic mice. *Dev Biol* 187: 36-42.

Eine vollständige Literaturliste kann bei den Autoren angefordert werden.

Kurzbiografien

Anja Scheller: geb. 1979, 1999-2004 Studium der Biochemie an der Freien Universität Berlin; 2004 Diplomarbeit „Herstellung und Charakterisierung transgener Mauslinien mit rot-fluoreszenter Proteinexpression im zentralen Nervensystem als Modelle der Neuron-Glia-Interaktion“; seit 2004 Doktorandin am MPI für experimentelle Medizin in der Forschungsgruppe von PD Dr. Frank Kirchhoff.

PD Dr. rer.nat. Frank Kirchhoff: geb. 1960, 1981-1985 Studium der Biochemie an der Universität Hannover, 1990 Promotion an der Universität Heidelberg, 1991 bis 1994 Universität Heidelberg (Institut für Neurobiologie), 1995-1999 Max-Delbrück-Centrum für molekulare Medizin (Zelluläre Neurowissenschaften), 1997 Habilitation an der Freien Universität, seit 2000 Forschungsgruppenleiter (Glial Physiology and Imaging) am Max-Planck-Institut für experimentelle Medizin, Abteilung Neurogenetik.

Korrespondenzadresse

PD Dr. rer. nat. Frank Kirchhoff
Neurogenetik
Max-Planck-Institut für
experimentelle Medizin
Hermann-Rein-Str. 3
37075 Göttingen
Tel.: + 49 (0) 551 3899 770
Fax: + 49 (0) 551 3899 758
E-Mail: kirchhoff@em.mpg.de

Fehlende Mitgliederadressen

Von folgenden Mitgliedern fehlt uns die korrekte Anschrift:

Dressel, Diana (vormals: Kaiserslautern)
Kasper, Dr. Ekkehard (vormals: Freiburg)
Köglsperger, Thomas (vormals: Freiburg)
Neumann, Dr. Nicola
(vormals: Greifswald)
Rillich, Jan (vormals: Leipzig)
Werner, Sandra Yvonne (vormals: Bonn)
Zur Nieden, Robin
(vormals: Kaiserslautern)

Für Hinweise sind wir dankbar.

Call for Symposia

Symposia dealing with all areas of neuroscience research are invited. The applicant should submit a proposal containing the title of the symposium planned, the name(s) and addresse(s) of the organizer(s), a short description of the aims of the symposium and the names and addresses of the speakers to be invited. The necessary symposium proposal form can be obtained from the German Neuroscience Society or from the Society's website: http://nwg.glia.mdc-berlin.de

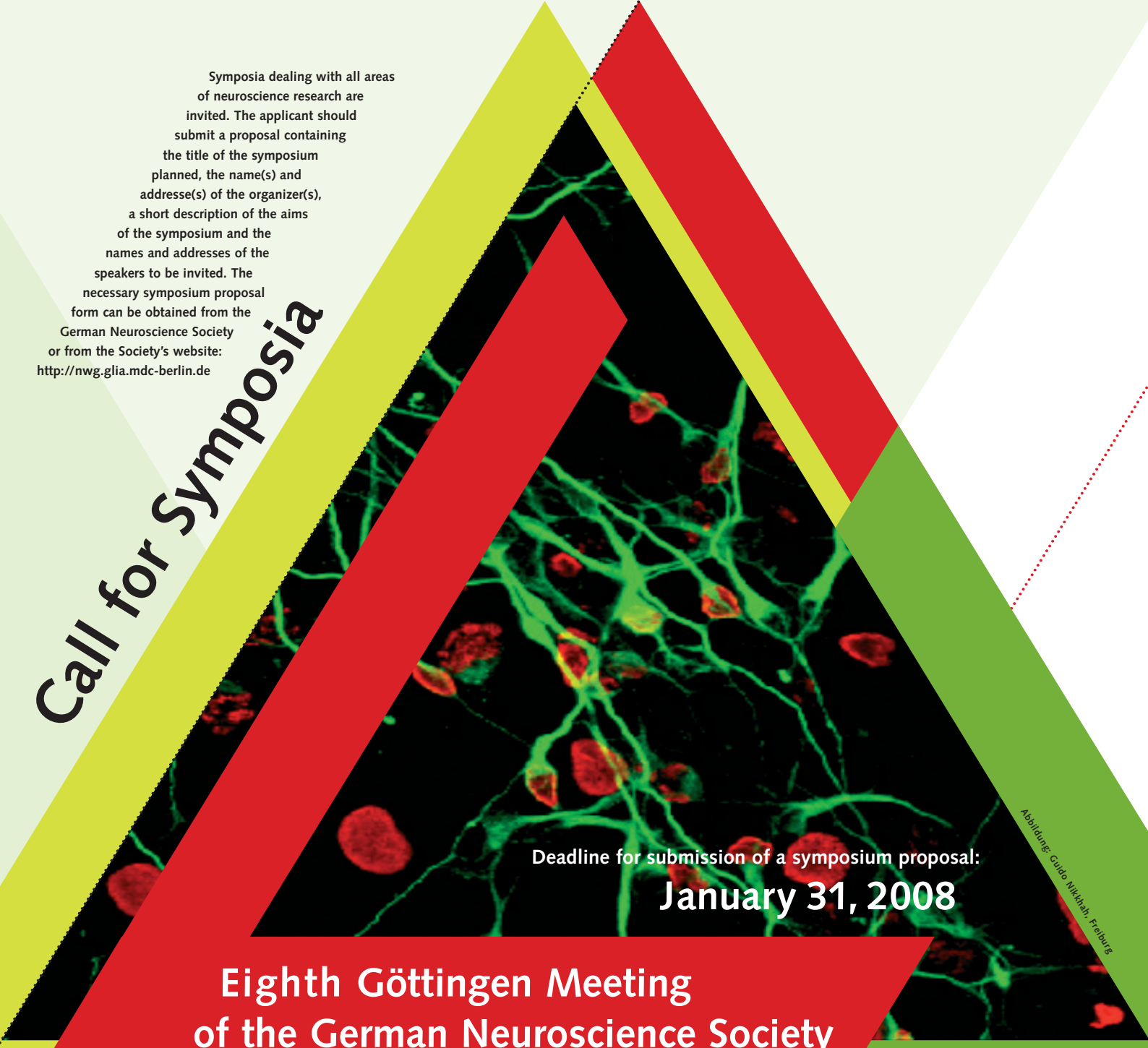


Abbildung: Guido Nikkhah, Freiburg

Deadline for submission of a symposium proposal:

January 31, 2008

Eighth Göttingen Meeting of the German Neuroscience Society

March 25–29, 2009

Stipends:
The German Neuroscience Society will provide stipends for young qualified researchers. Details will be announced at http://www.neuro.uni-goettingen.de.

Neurowissenschaftliche Gesellschaft

Programme Committee:
Prof. Dr. Mathias Bähr (Chair)
Prof. Dr. Ad Aertsen
Prof. Dr. Niels Birbaumer
Prof. Dr. Ulrich Dirnagl
Prof. Dr. Andreas Draguhn
Prof. Dr. Ulf Eysel
Prof. Dr. Michael Frotscher
Prof. Dr. Eckart Gundelfinger
Prof. Dr. Hanns Hatt
Prof. Dr. Hans-Peter Hartung
Prof. Dr. Klaus-Peter Hoffmann
Prof. Dr. Uwe Homberg
Prof. Dr. Sigrun Korsching
Prof. Dr. Kerstin Krieglstein
Prof. Dr. Erwin Neher
Prof. Dr. Rainer Schwarting

Local Organizer:
Prof. Dr. Kerstin Krieglstein
Bereich Humanmedizin
Georg-August Universität
Abt. Neuroanatomie
Kreuzbergring 36
D-37075 Göttingen
Phone: +49 551 377052
Fax: +49 551 3914016
eMail: nbc@uni-goettingen.de
Homepage: http://www.neuro.uni-goettingen.de;
http://www.neuroanatomie.uni-goettingen.de/home.htm

Organization:
Neurowissenschaftliche Gesellschaft e. V.
Max Delbrueck Center for Molecular Medicine
Robert-Roessle-Str. 10
D-13092 Berlin
Phone: +49 30 9406 3133
Fax: +49 30 9406 3819
eMail: gibson@mdc-berlin.de
Homepage: http://nwg.glia.mdc-berlin.de

The programme of the last meeting (2007) is still available at http://www.neuro.uni-goettingen.de/

Gestaltung: Eta Friedrich, www.et-a.de