

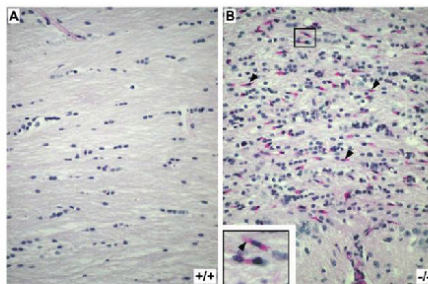



Corinna Lappe-Siefke (Autor)

Inaktivierung des CNP-Gens in der Maus und Expression der Cre-Rekombinase in myelinisierenden Gliazellen

Corinna Lappe-Siefke

**Inaktivierung des CNP-Gens in der Maus und
Expression der Cre-Rekombinase in
myelinisierenden Gliazellen**



 Cuvillier Verlag Göttingen

<https://cuvillier.de/de/shop/publications/3608>

Copyright:

Cuvillier Verlag, Inhaberin Annette Jentsch-Cuvillier, Nonnenstieg 8, 37075 Göttingen,
Germany

Telefon: +49 (0)551 54724-0, E-Mail: info@cuvillier.de, Website: <https://cuvillier.de>

I EINLEITUNG	9
1. Das Nervensystem und seine Entstehung	1
2. Neuroglia	2
2.1 Oligodendrozyten und Schwannzellen.....	2
2.2 Mikroglia	5
3. Das Myelin	5
3.1 Die 2',3'-zyklische Nukleotid 3'-Phosphodiesterase (CNP).....	7
3.2 Weitere Myelinproteine	11
4. Das Cre/loxP-System und seine Anwendungen	13
4.1 Die Zelltyp-spezifische Inaktivierung von Genen	13
4.2 Analysen zur Zellabstammung	15
5. Zielsetzung der Dissertation.....	17
II ERGEBNISSE.....	19
1. Herstellung einer Mauslinie mit einer Nullmutation des CNP-Gens	19
1.1 Klonierung eines CNP-Ersatzvektors zur homologen Rekombination	19
1.2 Homologe Rekombination in embryonalen Stammzellen	22
1.2.1 PCR-Etablierung zur Identifizierung homolog-rekombinanter ES-Zellklone	22
1.2.2 Isolierung homolog-rekombinanter ES-Zellklone.....	23
1.2.3 Keimbahntransmission des ES-Zellklons 13.1	24
2. Molekulare Analyse des veränderten CNP-Lokus	24
3. Phänotypanalyse der CNP-Nullmutante	26
3.1 CNPase-Aktivitätstest	26
3.2 Vergleichende Gehirnentwicklungsstudie von CNP-defizienten und Wildtypmäusen	27
3.3 Elektronenmikroskopische Analyse des Myelins 2,5 Monate alter CNP-defizienter Mäuse	28
3.4 Lipidanalyse von Myelinpräparationen.....	29
3.5 SDS-PAGE von Gehirnllysaten und Myelinpräparationen.....	30
3.6 Expression der Hauptmyelinproteine MBP und PLP im Gehirn CNP-defizienter Mäuse	30
3.7 Keine Erhöhung der MBP-RNA-Menge in CNP-defizienten Gehirnen.....	32
3.8 Entwicklung von CNP-defizienten primären Oligodendrozyten in Kultur	33
3.9 Analyse älterer CNP-defizienter Mäuse.....	34
3.9.1 Rotarod-Test.....	35
3.9.2 Stabtest.....	35

3.9.3 Sterblichkeit von CNP-Nullmutanten	36
3.9.4 CNP-defiziente Mäuse entwickeln einen Hydrocephalus.....	38
3.9.5 Der Nachweis phagozytotischer Aktivität.....	39
3.9.6 Immunhistochemische Analyse von Paraffinschnitten	40
3.9.7 Elektronenmikroskopische Analyse.....	43
4. Analyse des Cre/loxP-Systems unter der Kontrolle des CNP-Promotors	45
4.1 PCR-Analysen an doppeltransgenen CNP-Cre* <i>floxLacZ</i> -R Mäusen.....	45
4.2 X-Gal-Färbung von Organen doppeltransgener CNP-Cre* <i>floxLacZ</i> -R Mäuse	46
4.3 Immunhistochemische Analyse an CNP-Cre Mäusen	47
4.4 β -Galaktosidase-Färbung und Immunhistochemie an Gehirnschnitten von doppeltransgenen CNP-Cre* <i>floxLacZ</i> -R Mäusen	49
4.5 Immunhistochemie an doppeltransgenen CNP-Cre* <i>Z/EG</i> Mäusen	52
4.6 β -Galaktosidase-Färbung von Embryonen	53
4.7 Anwendung der CNP-Cre Mauslinie	54
III DISKUSSION	56
1. Inaktivierung des CNP-Gens	56
2. Die Funktion von CNP	57
2.1 Die Bedeutung von CNP bei der Oligodendrozyten-Entwicklung.....	58
2.2 CNP ist nicht essentiell für die Myelinisierung.....	58
2.3 Beeinflusst CNP die Zielfindung von MBP?	60
2.4 CNP spielt eine Rolle für den axonalen Erhalt	62
3. Die Eignung der CNP-Cre Mauslinie zur Zelltyp-spezifischen Inaktivierung von Genen.....	66
3.1 Spezifische Expression von Cre unter der Kontrolle des CNP-Promotors	66
3.2 Rekombinationsmuster in doppeltransgenen CNP-Cre* <i>floxLacZ</i> -R und CNP-Cre* <i>Z/EG</i> Mäusen	67
3.3 Anwendungen der CNP-Cre Mauslinie	70
4. Ausblick	71
IV MATERIAL	73
1. Chemikalien und Verbrauchsmaterial.....	73
2. Geräte.....	74
3. Lösungen, Puffer und Medien	75
3.1 Molekularbiologie und Proteinbiochemie	75

3.2 Zellkultur	79
3.3 Histologie und Immunhistochemie	81
3.4 Elektronenmikroskopie	82
4. Antikörper, Enzyme und Reaktionskomplettausstattungen	83
4.1 Antikörper	83
4.1.1 Primärantikörper	83
4.1.2 Sekundärantikörper	84
4.2 Enzyme	84
4.3 Reaktionskomplettausstattungen	84
5. Nukleinsäuren und Nukleotide	84
5.1 Vektoren und Konstrukte	84
5.2 Andere Nukleinsäuren und Nukleotide	85
6. Eukaryontische Zelllinien und Bakterienstämme	85
6.1 Zelllinien	85
6.2 Bakterienstämme	85
7. Tiere	85
8. Radiochemikalien	85
9. Oligonukleotide	85
9.1 Primer zur Klonierung des CNP-Cre Konstruktes	86
9.2 Primer zur Identifikation von homolog rekombinierten ES-Zellklonen	86
9.3 Primer zur Genotypisierung der CNP-Cre Mauslinie	86
9.4 Primer zur Genotypisierung der flox <i>LacZ</i> -R Mauslinie	86
9.5 Primer zur Genotypisierung der Z/EG Mauslinie	86
10. Hard- und Software	86
V METHODEN	87
1. Molekularbiologische Methoden	87
1.1 Molekulare Klonierung	87
1.1.1 DNA-Verdau mit Restriktionsendonukleasen	87
1.1.2 Generierung von „blunt“-Enden	87
1.1.3 Dephosphorylierung von DNA-Enden	87
1.1.4 Ligation von DNA	87
1.1.5 Klonierung von PCR-Produkten	87
1.1.6 Klonierung von Oligonukleotiden	88

1.1.7 Herstellung transformationskompetenter Zellen	88
1.1.8 Transformation von Bakterien	88
1.2 Präparation und Analyse von DNA und RNA	88
1.2.1 Plasmidpräparationen aus Bakterien	88
1.2.2 Präparation genomischer DNA aus Geweben.....	89
1.2.3 Phenol/Chloroform-Extraktion von DNA und RNA	89
1.2.4 Aufreinigung synthetischer Oligonukleotide für PCR- und Sequenzierreaktionen.....	89
1.2.5 Präparation von Gesamt-RNA aus Gehirnen	89
1.2.6 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	89
1.2.7 Agarose-Gelelektrophorese von DNA.....	90
1.2.8 Denaturierende Formaldehyd-Agarose-Gelelektrophorese von RNA	90
1.2.9 Elution von DNA aus Agarosegelen.....	90
1.2.10 Radioaktive Markierung von DNA-Fragmenten.....	91
1.2.11 Southern Blot.....	91
1.2.12 Northern Blot	91
1.3 Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	91
1.4 cDNA-Synthese.....	92
1.5 DNA-Sequenzierung	92
2. Proteinbiochemische Methoden	92
2.1 Proteingewinnung aus Gehirnen	92
2.2 Myelinpräparation aus Gehirnen	93
2.3 Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen	93
2.4 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese	93
2.5 Coomassiefärbung von SDS-Polyacrylamidgelen.....	93
2.6 Western Blot.....	94
2.7 Immunologische Detektion von Proteinen auf einer PVDF-Membran.....	94
2.8 CNPase-Aktivitätstest	94
2.9 Dünnschichtchromatographie.....	95
2.10 Immunzytochemie.....	95
3. Zellkulturmethoden	96
3.1 Präparation und Kultur primärer Oligodendrozyten.....	96
3.2 Kultur und Analyse embryonaler Stammzellen.....	96
3.2.1 Trypanblau-Lebendfärbung/Methylenblaufärbung	96
3.2.2 Serumtoxizitätstest.....	96
3.2.3 Antibiotikatest	97
3.2.4 Mycoplasmentest	97
3.2.5 Präparation embryonaler primärer Mausfibroblasten (EMFI).....	97
3.2.6 Passagieren, Einfrieren und Auftauen von EMFI	97

3.2.7 Herstellung von Fibroblasten-beschichteten Zellkulturschalen.....	97
3.2.8 Kultivieren, Passagieren und Einfrieren von ES-Zellen	98
3.2.9 Elektroporation und Antibiotikaselektion von ES-Zellen.....	98
3.2.10 Isolierung und Analyse Puromycin-resistenter ES-Zellklone	99
3.2.11 Injektion von ES-Zellen in Blastozysten und Embryotransfer	100
4. Histologische und immunhistochemische Methoden	100
4.1 Ganzkörperfixierung von Mäusen durch Perfusion	100
4.2 β -Galaktosidase-Färbung	100
4.2.1 β -Galaktosidase-Histochemie auf Vibratomschnitten	100
4.2.2 β -Galaktosidase-Färbung von Embryonen	100
4.3 Immunhistochemie an Vibratomschnitten.....	100
4.4 Herstellung von Paraffinschnitten	101
4.5 Hämatoxylin/Eosin-Färbung	101
4.6 Nissl-Färbung	101
4.7 Versilberung von Myelin nach Gallyas (1979).....	102
4.8 Dako-LSAB ₂ System an Paraffinschnitten.....	102
4.9 PAS-Reaktion an Paraffinschnitten.....	103
4.10 Elektronenmikroskopie	103
5. Verhaltenstests.....	104
5.1 Rotarod.....	104
5.2 Stabtest	104
VI ZUSAMMENFASSUNG.....	105
VII LITERATUR.....	106