



Sandra Göbbels (Autor)

Zelltyp-spezifische Expression der Rekombinase Cre im Nervensystem der Maus

Sandra Göbbels

Zelltyp-spezifische Expression der
Rekombinase Cre im Nervensystem der Maus



Cuvillier Verlag Göttingen

<https://cuvillier.de/de/shop/publications/3610>

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>

Inhaltsverzeichnis

| | |
|--|-----------|
| I Einleitung | 1 |
| 1. Das zentrale Nervensystem | 1 |
| 2. Die Entwicklung des ZNS | 2 |
| 3. Die Entwicklung von Oligodendrozyten | 5 |
| 4. Helix-Loop-Helix-Proteine | 6 |
| 5. "atonal" verwandte neurale HLH-Transkriptionsfaktoren | 9 |
| 6. Die Herstellung konditionaler Mausmutanten | 13 |
| 7. Anwendung des Cre/loxP-Systems für retrospektive klonale Analysen | 17 |
| 8. Zielsetzung | 19 |
| II Ergebnisse | 21 |
| 1 Herstellung und Analyse einer Mausmutante mit ZNS-spezifischer, neuronaler Cre-Rekombinase-Aktivität (NEXCre) | 21 |
| 1.1 Klonierung des NEXCre-Ersatzvektors zur homologen Rekombination | 22 |
| 1.2 Homologe Rekombination in embryonalen Stammzellen | 23 |
| 1.3 Keimbahntransmission des ES-Klons 22e und Etablierung der NEXCre-Mauslinie | 25 |
| 1.4 Spezifität der Cre-vermittelten Rekombination an loxP-Sequenzen | 25 |
| 1.4.1 Analyse der gewebsspezifischen Cre-Aktivität durch PCR..... | 26 |
| 1.4.2 Analyse der embryonalen Cre-Aktivität durch X-Gal-Histochemie | 27 |
| 1.4.3 X-Gal-histochemische Analyse adulter Mäuse..... | 29 |
| 1.5 Analyse der postnatalen und adulten Cre-Expressionsdomänen | 31 |
| 1.6 Reporter-Gen-Analysen zum zellulären Nachweis von NEX-Promotoraktivität..... | 35 |
| 1.6.1. Klassifizierung der Zellen mit NEX-Promotoraktivität..... | 35 |
| 1.6.2 Vergleich adulter NEX- und NeuroD-Expressionsdomänen | 38 |
| 1.7 Anwendung der NEXCre-mutanten Mauslinie..... | 42 |
| 1.7.1. Kooperationen | 42 |
| 1.7.2 Herstellung einer Mauslinie mit loxP-flankiertem NeuroD-Gen | 43 |
| 1.7.2.1 Klonierung des Ersatzvektors zur homologen Rekombination | 44 |
| 1.7.2.2 Homologe Rekombination in embryonalen Stammzellen | 45 |
| 1.7.2.3. Generierung chimärer, floxNeuroD-mutanter Mäuse..... | 46 |
| 2. Herstellung und Analyse einer transgenen Mauslinie mit oligodendroglialer Cre-Rekombinase-Aktivität (PLPCre) | 48 |
| 2.1 Klonierung des PLPCre-Transgenvektors | 48 |
| 2.2 Pronukleusinjektionen und Etablierung PLPCre-transgener Mauslinien | 50 |
| 2.3 Cre-immunhistochemische Analyse adulter PLPCre-transgener Mäuse..... | 50 |
| 2.4 Analyse der Cre-vermittelten Rekombination an loxP-Sequenzen | 52 |
| 2.4.1. PCR-Analyse | 52 |
| 2.4.2. X-Gal-histochemische Analyse | 54 |
| 2.5 Aktivierung des LacZ-Reportergens in Neuronen, aber nicht in Astrozyten | 56 |
| 2.6 Radiale Anordnung β -Gal exprimierende Neuronen im Cortex..... | 57 |

| | |
|--|-----------|
| 2.7 Neuronale Aktivierung eines EGFP-Reportergens | 58 |
| 2.8 Verwendung der PLPCre-transgenen Mauslinien in Kooperationen..... | 60 |
| III Diskussion..... | 61 |
| 1. Herstellung einer NEXCre-mutanten Mauslinie | 61 |
| 2. Cre-Expression und Cre-vermittelte Rekombination | 62 |
| 2.1 Cre-Expression ist ZNS-spezifisch..... | 62 |
| 2.2 Cre- und β -Gal-Expression reflektieren das endogene NEX-Expressionsmuster..... | 63 |
| 3. Der NEX-Promotor ist ausschließlich in pyramidalen Neuronen aktiv | 65 |
| 4. Vergleich der NEX- und der NeuroD-Promotor-Aktivität im adulten Gehirn | 68 |
| 5. Vergleich der NEXCre Mauslinie mit anderen Cre exprimierenden Mauslinien und Anwendung in Kooperationen..... | 71 |
| 6. Die konditionale Inaktivierung des NeuroD-Gens: ein Ausblick..... | 74 |
| 7. Herstellung PLPCre-transgener Mauslinien..... | 77 |
| 8. Analyse PLPCre-transgener Mauslinien | 77 |
| 9. Das Schicksal von Zellen mit PLP/DM20-Gen-Promotoraktivität..... | 81 |
| 10. Ausblick..... | 85 |
| IV Material | 87 |
| 1. Chemikalien und Verbrauchsmaterial | 87 |
| 2. Geräte..... | 88 |
| 3. Lösungen, Puffer und Medien | 89 |
| 3.1 Molekularbiologie | 89 |
| 3.2 Zellkultur..... | 91 |
| 3.3 Histochemie..... | 92 |
| Fixierungslösung für Immunhistochemie | 92 |
| 4. Antikörper, Enzyme und Reaktionskomplettausstattungen | 93 |
| 4.1 Primärantikörper..... | 93 |
| 4.2 Sekundärantikörper..... | 93 |
| 4.3 Enzyme..... | 93 |
| 4.4 Reaktionskomplettausstattungen | 94 |
| 5. Nukleinsäuren und Nukleotide | 94 |
| 5.1 Vektoren und Konstrukte | 94 |
| 5.2 Andere Nukleinsäuren und Nukleotide | 94 |
| 6. Eukaryontische Zelllinien und Bakterienstämme..... | 94 |
| 6.1 Zelllinien | 94 |
| 6.2 Bakterienstämme | 94 |
| 7. Tiere..... | 95 |
| 8. Radiochemikalien..... | 95 |
| 9. Oligonukleotide..... | 95 |
| 9.1 Primer zur Klonierung und Sequenzierung des NEXCre-Konstruktes | 95 |

| | |
|--|------------|
| 9.2 Primer zur Verifizierung homologer Rekombination in NEXCre ES-Zellen und Mäusen | 95 |
| 9.3 Primer zur Analyse und Genotypisierung der NEXCre-Mauslinie | 96 |
| 9.4 Primer zur Genotypisierung und Rekombinationsanalyse der floxLacZ-Mauslinie | 96 |
| 9.5 Primer zur Genotypisierung der Z/EG-Mauslinie..... | 96 |
| 9.6 Primer zur Genotypisierung der NeuroD KO-Mauslinie | 96 |
| 9.7 Primer zur Genotypisierung der PLPCre-Mauslinie | 96 |
| 9.8 Primer zur Klonierung, Analyse und Sequenzierung des floxNeuroD-Konstrukts..... | 96 |
| 9.9 Primer zur Bestimmung der Länge der 5'-UTR von Exon 2 des NeuroD-Gens..... | 96 |
| 9.10 Primer zur Identifikation und Analyse von homolog rekombinierten floxNeuroD ES- Zellklonen | 97 |
| 9.11 Primer zur Genotypisierung der TNCR Mauslinie | 97 |
| 10. Hard- und Software | 97 |
| V Methoden..... | 98 |
| 1. Molekularbiologische Methoden..... | 98 |
| 1.1 Molekulare Klonierung | 98 |
| 1.1.1 DNA-Verdau mit Restriktionsendonukleasen | 98 |
| 1.1.2 Generierung von „blunt“-Enden | 98 |
| 1.1.3 Dephosphorylierung von DNA-Enden..... | 98 |
| 1.1.4 Ligation von DNA..... | 98 |
| 1.1.5 Klonierung von PCR-Produkten | 99 |
| 1.1.6 Klonierung von Oligonukleotiden | 99 |
| 1.1.7 Herstellung transformationskompetenter Zellen..... | 99 |
| 1.1.8 Transformation von Bakterien | 99 |
| 1.2 Präparation und Analyse von Nukleinsäuren | 100 |
| 1.2.1 Präparation von Plasmiden aus Bakterien | 100 |
| 1.2.2 Präparation genomischer DNA aus Geweben | 100 |
| 1.2.3 Präparation genomischer DNA aus kultivierten Zellen..... | 101 |
| 1.2.4 Phenol/Chloroform-Extraktion von DNA und RNA | 101 |
| 1.2.5 Aufreinigung synthetischer Oligonukleotide | 101 |
| 1.2.6 Präparation von Gesamt-RNA aus Mausgehirnen..... | 101 |
| 1.2.7 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren | 101 |
| 1.2.8 Agarose-Gelelektrophorese von DNA | 101 |
| 1.2.9 Elution von DNA aus Agarosegelen | 102 |
| 1.2.10 Polyacrylamid-Gelelektrophorese von DNA | 102 |
| 1.2.11 Radioaktive Markierung von DNA-Fragmenten..... | 103 |
| 1.2.12 Southernblot-Analyse | 103 |
| 1.2.13 Synthese von cDNA | 103 |
| 1.2.14 Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR)..... | 103 |
| 1.2.15 DNA-Sequenzierung | 104 |
| 2. Kultur und Analyse embryonaler Stammzellen | 104 |
| 2.1 Trypanblau-Lebendfärbung/Methylenblaufärbung | 105 |
| 2.2 Serumtoxizitätstest..... | 105 |
| 2.3 Antibiotikumtest..... | 105 |

| | |
|---|------------|
| 2.4 Mycoplasmentest | 105 |
| 2.5 Präparation embryonaler primärer Mausfibroblasten (EMFI) | 105 |
| 2.6 Passagieren, Einfrieren und Auftauen primärer EMFI | 105 |
| 2.7 Beschichtung von Zellkulturschalen mit Fibroblasten | 106 |
| 2.8 Kultivieren, Passagieren und Einfrieren von ES-Zellen | 106 |
| 2.9 Elektroporation und Antibiotikaselektion von ES-Zellen | 107 |
| 2.10 Isolierung und Analyse resistenter ES-Zellklone..... | 107 |
| 2.11 Vorbereitung von ES-Zellen zur Injektion in Blastozysten | 107 |
| 3. Manipulation und Zucht von Mäusen | 108 |
| 3.1 Blastozysteninjektion und Embryotransfer | 108 |
| 3.2 Mikronjektion von DNA in befruchtete Oozyten..... | 108 |
| 3.3 Markierung von Mäusen | 108 |
| 3.4 Schwanzbiopsien | 108 |
| 4. Histologische und immunhistochemische Methoden | 109 |
| 4.1 Ganzkörperperfexion von Mäusen durch Perfusion | 109 |
| 4.2 Herstellung von Paraffinschnitten | 109 |
| 4.3 Herstellung von Vibratomschnitten | 109 |
| 4.4 Herstellung von Kryostatsschnitten..... | 109 |
| 4.5 Hämatoxylin/Eosin-Färbung | 109 |
| 4.6 Nissl-Färbung | 110 |
| 4.7 X-Gal-Histochemie..... | 110 |
| 4.7.1 X-Gal-Histochemie auf Vibratomschnitten..... | 110 |
| 4.7.2 X-Gal-Histochemie an Embryonen | 110 |
| 4.8 Immunhistochemie auf Vibratomschnitten..... | 110 |
| 4.9 Dako-LSAB ₂ System an Paraffinschnitten..... | 112 |
| VI Zusammenfassung | 113 |
| VII Literatur | 114 |