

Molekulare und funktionale Charakterisierung der neuronalen bHLH Transkriptionsfaktoren NSCL-1 und NSCL-2

Dissertation

Zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor Rerum Naturalium
(Dr. rer. nat.)

vorgelegt der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen-Technischen Fakultät
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Marcus Krüger
geboren am 27.09.1970

Gutachter

1. Prof.Dr.Dr. Thomas Braun
2. Prof. Dr. Reuter
3. Prof. Dr. Gundelfinger, Magdeburg

Diese Dissertation ist von der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg genehmigt worden.

Hiermit versichere ich, dass die vorliegende Dissertation selbstständig verfasst und keine anderen als angegebenen Hilfsmittel verwendet wurden. Die Passagen der Arbeit, die anderen Schriften entnommen wurden, wurden unter Angabe der Quelle kenntlich gemacht.

Marcus Krüger

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung.....	1
1.1	Die Entwicklung des Nervensystems	1
1.2	Determinierung – Migration – Differenzierung, wichtige Schritte zur Generierung des Nervensystems.....	2
1.3	Das Gehirn reguliert den Energiehaushalt.....	6
1.4	Mehr Gewicht – weniger Reproduktivität ?.....	7
1.5	Die bhlh Superfamilie – von Arabidopsis thaliana bis zum Zebrafisch..	9
1.6	Die NSCL Subfamilie.....	14
1.7	Ziel der Arbeit.....	16
2.	Material und Methoden.....	17
2.1	Material.....	17
2.1.1	Chemikalien und Verbrauchsmaterial.....	17
2.1.2	Enzyme.....	18
2.1.3	Lösungen und Medien.....	18
2.1.4	Verwendete Kits.....	19
2.1.5	Bakterienstämme.....	20
2.1.6	Mausstämme.....	20
2.1.7	Verwendete Vektoren.....	20
2.1.8	Proben für in situ und whole mount Hybridisierungen.....	20
2.1.9	Verwendete Antikörper.....	21
2.1.10	Southern- Blot Hybridisierungsproben.....	22
2.1.11	Oligonukleotide.....	22
2.2	Methoden.....	22
2.2.1	Sterilisation von Lösungen und Geräten.....	23
2.2.2	Extraktion von Nukleinsäuren.....	23
2.2.2.1	Extraktion genomischer DNA aus Geweben.....	23
2.2.2.2	Präparation von RNA aus Geweben mittels LiCl-Harnstoff-Extraktion.	24

Inhaltsverzeichnis

2.2.2.3	Präparation von gewebespezifischer mRNA.....	25
2.2.3	Reinigung von Nukleinsäurelösungen.....	25
2.2.3.1	Chloroformextraktion.....	25
2.2.3.2	Ethanol-fällung.....	25
2.2.4	Konzentrationsbestimmung von wässrigen Nukleinsäurelösungen.....	26
2.2.5	Elektrophoresen von Nukleinsäuren.....	26
2.2.5.1	Agarosegelelektrophorese von DNA.....	26
2.2.6	Elution von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen.....	27
2.2.6.1	Elektroelution.....	27
2.2.7	Klonierung von DNA.....	27
2.2.7.1	Ligation von DNA-Fragmenten.....	27
2.2.7.2	Herstellung von PEG-transformationskompetenten E.coli Zellen.....	27
2.2.7.3	Transformation von E. coli-Zellen mit Plasmiden.....	28
2.2.8	Kultivierung von E. coli-Stämmen und Klonen.....	28
2.2.9	Präparation von Plasmid-DNA.....	29
2.2.9.1	Midi-Präparation von Plasmid-DNA.....	29
2.2.10	Sequenzierung doppelsträngiger DNA.....	29
2.2.11	Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	30
2.2.11.1	RT-PCR.....	30
2.2.12	Transfer von Nukleinsäuren auf Nylonmembranen.....	32
2.2.12.1	Transfer von DNA (Southern-Blotting).....	32
2.2.13	Markierung von Nukleinsäuren.....	33
2.2.13.1	Radioaktive Markierung von DNA-Fragmenten.....	33
2.2.13.2	In vitro Transkription zur Synthese von RNA-Proben.....	34
2.2.14	Hybridisierungstechniken.....	35
2.2.14.1	Hybridisierung membrangebundener Nukleinsäuren.....	35
2.2.14.2	Whole mount in situ Hybridisierung von Embryonen.....	36
2.2.14.3	Whole mount in situ Hybridisierung auf Gewebeschnitten.....	38
2.2.15	Autoradiographie.....	39
2.2.15.1	Autoradiographie von hybridisierten Membranen.....	39
2.2.16	Präparation von Embryonen und Geweben.....	39
2.2.16.1	Präparation von Embryonen.....	39
2.2.16.2	Kardiale Perfusion mit PFA.....	39
2.2.17	Histologische Methoden.....	40

Inhaltsverzeichnis

2.2.17.1	Vibratonschnitte.....	40
2.2.17.1.1	Gelatine/Albumin Einbettung.....	40
2.2.17.1.2	Agarose Einbettung – „ freischwimmende Schnitte“	40
2.2.17.2	Paraffin-Gewebeschnitte.....	41
2.2.17.3	Kryotomschnitte.....	42
2.2.18	Hämatoxylin/Eosin-Färbung.....	42
2.2.19	Immunhistochemische Anfärbung.....	43
2.2.19.1	Vorbereitung für Paraffin und Kryotomschnitten.....	43
2.2.19.2	Antikörperanfärbung – Protokoll.....	44
2.2.20	β-Galaktosidase Histochemie.....	45
2.2.21	Darstellung mitotisch aktiver Zellen mittels BrdU Inkorporation	46
2.2.22	Array-Hybridisierung	46
2.2.23	Genotypisierung von Embryonen.....	46
2.2.24	Photodokumentation.....	47
3.	Ergebnisse	48
3.1	Analyse der Funktion von Genen in der Mausentwicklung.....	48
3.2	NSCL-2 homozygote Mäuse sind infertil und zeigen eine adulte Obesität.....	48
3.2.1	Strategie zur Inaktivierung des NSCL-2 Gens.....	48
3.2.2	Genotypisierung von NSCL-2 Mausmutanten.....	49
3.2.3	Das inserierte β-Galaktosidase Gen spiegelt das endogene Expressionsmuster von NSCL-2 wieder.....	50
3.2.4	NSCL-2 wird in verschiedenen Bereichen des zentralen und peripheren Nervensystems exprimiert.....	50
3.2.5	Homozygote NSCL-2 Mutanten zeigen keine Veränderung des Expressionsmusters des markierten Gens.....	51
3.2.6	NSCL-2 ist stark in verschiedenen Bereichen des Hypothalamus während der Embryonalstadien E14,5 – E18,5 exprimiert	55
3.2.7	NSCL-2 defiziente Mäuse weisen eine reduzierte Anzahl Gonadotropin-Releasing Hormon positiver Neurone auf.....	58

Inhaltsverzeichnis

3.2.7.1	Embryonale Entwicklungsstadien.....	58
3.2.7.2	Postnale Verteilung GnRH positiver Zellen.....	62
3.2.8	NSCL-2 defiziente Mäuse zeigen nach der Pubertät einen erhöhten Nahrungsbedarf.....	65
3.2.9	Das Neuropeptid Y – NPY Y1 Rezeptor System.....	66
3.2.9.1	NSCL-2 ^{-/-} Mutanten zeigen nur im zerebralen Kortex eine reduzierte Anzahl NPY positiver Neurone.....	67
3.2.9.2	Reduktion des NPY Y1 Rezeptors in NSCL-2 defizienten Mutanten.....	71
3.2.9.3	NSCL-2 mutante Mäuse zeigen eine fehlende Anpassung der Expression von NPY Y1 Rezeptoren bei Nahrungsmangel.....	72
3.2.10	Reduktion POMC (ACTH) positiver Zellen im Nucleus arcuatus bei NSCL-2 homozygoten Mutanten.....	73
3.2.11	Analyse des Leptinrezeptors.....	75
3.3	Analyse des NSCL-2 Promotors.....	75
3.3.1	Ungerichtete Insertion des NSCL-2 Zielvektors.....	76
3.3.2	Hohe Konservierung des NSCL-2 Promotors zwischen Maus und Mensch.....	78
3.4	NSCL-1 homozygote Mutanten zeigen keinen offensichtlichen Phänotyp.....	79
3.4.1	Generierung homozygoter NSCL-1 Mutanten.....	79
3.4.2	Initiale NSCL-1 Expression ab dem Somitenstadium 12-14 (E8,75).....	81
3.4.3	Doppelmarkierung von mitotisch aktiven und NSCL-1/LacZ positiven Zellen.....	84
3.4.4	Die Differenzierung NSCL-1 exprimierender Neurone in NSCL-1 mutanten Embryonen zeigt keine Auffälligkeiten.	86
3.4.5	NSCL-1 und NSCL-2 zeigen unterschiedliche Expressionsmuster während embryonaler Entwicklungsstadien.....	87
3.4.5.1	NSCL-1 und NSCL-2 werden während der Entwicklung des Kortex in unterschiedlichen Domänen exprimiert.....	87
3.4.5.2	Analyse der Expression von NSCL-1 und NSCL-2 im Kleinhirn.....	89
3.4.5.3	Expression von NSCL-1 und NSCL-2 in der Retina.....	90
3.4.5.4	Expression von NSCL-1 und NSCL-2 im olfaktorischen Epithel.....	92
3.4.5.5	Expression von NSCL-1 und NSCL-2 im adulten ZNS.....	93

Inhaltsverzeichnis

3.4.6	NSCL-1 Nullmutanten zeigen keine offensichtlichen Malformationen im ZNS.....	95
3.5	NSCL-1 und NSCL-2 doppelt homozygote Mutanten sind nicht lebensfähig.....	97
3.5.1	NSCL-1xNSCL-2 Doppelmutanten zeigen keine Störungen früher Differenzierungsvorgänge des ZNS.....	97
3.5.2	Doppelt homozygote NSCL-1xNSCL-2 Mutanten sterben kurz nach der Geburt.....	98
3.5.3	Analyse von NSCL-1 x NSCL-2 Doppelmutanten durch in situ Hybridisierung und Immunhistochemie.....	99
3.5.3.1	Kleinhirn.....	99
3.5.3.2	Neokortex.....	104
3.5.3.3	Die Anzahl mitotisch aktiver Zellen in NSCL-1xNSCL-2 Doppelmutanten ist reduziert.....	105
3.5.3.4	Retina.....	107
3.5.3.5	Olfaktorisches Epithel.....	109
3.6	Die Analyse des Phänotyps NSCL-1xNSCL-2 doppelt mutanter Mäuse mittels DNA-Array-Hybridisierung.....	112
4.	Diskussion.....	117
4.1	NSCL-2/LacZ positive Zellen spiegeln das endogene NSCL-2 Expressionsmuster wieder.....	117
4.2	NSCL-1 und NSCL-2 sind nicht notwendig für die Differenzierung kranialer Ganglien.....	118
4.3	Expressionsanalyse von NSCL-1 und NSCL-2.....	122
4.3.1	NSCL-1 und NSCL-2 defiziente Mausmutanten zeigen keine Auffälligkeiten bei der Bildung und der Gewebsarchitektur des Kortex.	122
4.3.2	Die Rolle von NSCL-1 und NSCL-2 im Kleinhirn.....	124
4.3.3	Welche Funktion kommt NSCL-1 und NSCL-2 in der Retina und im Riechepithel zu.....	126
4.4	NSCL-2 defiziente Mutanten sind infertil und zeigen Störungen bei der Gewichtsregulation.....	127

Inhaltsverzeichnis

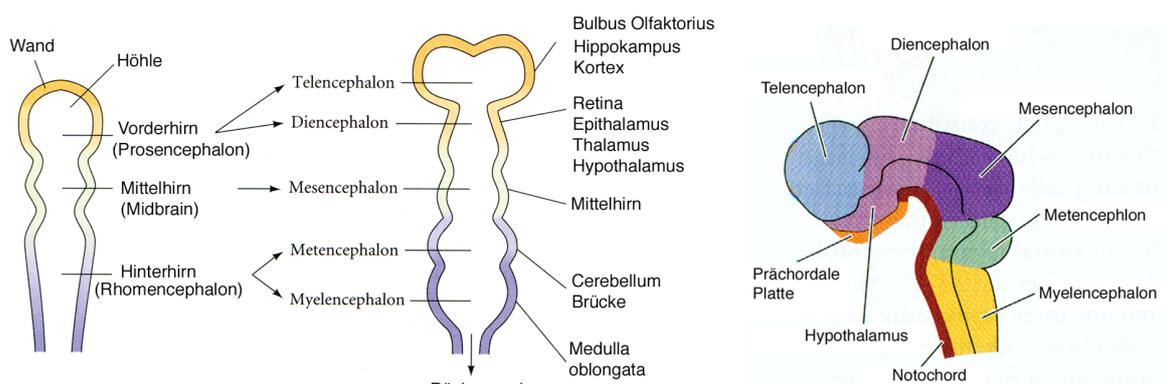
4.4.1	Die Entstehung eines hypogonadalen Hypogonadismus in NSCL-2 mutanten Mäusen.....	127
4.4.2	Störungen der Gewichtsregulation in NSCL-2 mutanten Mäusen.....	131
4.4.3	Die Analyse des Maus NSCL-2 Promotors ergab Homologien zum humanen NSCL-2 Promotor.....	137
4.5	Analyse der NSCL-1xNSCL-2 Doppelmutanten.....	138
4.5.1	Störungen der Differenzierung des olfaktorischen Neuroepithels bei NSCL-1xNSCL-2 Doppelmutanten.....	138
4.5.2	Geringe Störungen der Großhirnrinden- und Kleinhirn- Entwicklung bei NSCL-1xNSCL-2 doppelt mutanten Tieren.....	140
4.5.3	NSCL´s und Zellzyklusregulation.....	141
4.6	Ausblick.....	144
5.	Literatur	146
6.	Anhang.....	157
6.1	NSCL-2 Promotorsequenz.....	157
6.2	Tafeln verschiedener Antikörperanfärbungen.....	168
6.3	Abkürzungen.....	174
6.4	Curriculum vitae.....	176
6.5	Tagungsbeiträge und Publikationen.....	177
6.6	Zusammenfassung.....	178

1. Einleitung

1,5 kg Gehirnmasse und ca. 100 Milliarden Nervenzellen haben es der Art Homo Sapiens ermöglicht, durch gezielte Genmanipulation in die Evolution einzugreifen, auf den Mond spazierenzugehen sowie sich mit Kunst und Musik zu beschäftigen. Die Komplexität des Gehirns wird durch unzählige synaptische Verknüpfungen erreicht. So ist eine Nervenzelle in der Lage mehrere tausend synaptische Kontakte mit anderen Nervenzellen zu knüpfen. Die daraus resultierende Anzahl möglicher Kombinationen von synaptischen Verbindungen in einem einzelnen menschlichen Gehirn ist größer als die Gesamtzahl der Atome im ganzen bekannten Universum. Eine Möglichkeit, die komplexen Strukturen des Gehirns zu analysieren, bietet das Gehirn der Maus. Mit dem Einsatz molekularbiologischer Techniken, wurden in der Maus eine Reihe von Erkenntnissen gewonnen, die einen Einblick in die komplizierten Prozesse der Neurogenese ermöglichen. Die vorliegende Arbeit versucht, mittels molekularbiologischer Methoden, einen Beitrag zum Verständnis der Entwicklung von Nervenzellen zu leisten.

1.1 Die Entwicklung des Nervensystems

Nach Befruchtung der Eizelle und Durchlaufen der Gastrulation, besteht der Embryo aus drei Keimblättern. Während das Entoderm die inneren Organe, das Mesoderm Muskeln, Bindegewebe und Blutgefäße bildet, entwickelt sich aus dem äußersten Keimblatt, dem Ektoderm die Epidermis und das Nervensystem. Durch Wechselwirkungen von Mesoderm und Ektoderm beginnt ab dem Embryonaltag 7,5 der Maus die neuronale Induktion die zur Bildung von Neural epithel führt (Gilbert, 1997). Nach Faltung der Neuralplatte zum tubulären Neuralrohr, entstehen am rostralen Ende drei Gehirnbläschen, die zunächst Anlagen von Vorder- Mittel und Hinterhirn (Pros-, Mes- und Rhombencephalon) bilden. In der folgenden Abbildung ist die Entwicklung der einzelnen Gehirnstrukturen schematisch dargestellt.



Mit fortschreitender Entwicklung bildet sich aus dem Prosenzephalon, das Telenzephalon und Diencephalon. Im entwickelten Gehirn beherbergen diese Kompartimente Riechhirn, Hippokampus und Neokortex sowie Thalamus und Hypothalamus. Aus den anterioren Teil des Rhombenzephalon, dem Metenzephalon (Nachhirn), entwickeln sich Pons (Brücke) und Kleinhirn. Das Myelencephalon (Markhirn), auch als Schlundhirn bezeichnet, bildet schließlich die Medulla oblongata (verlängertes Rückenmark) (Rauber, 1987) .

Neben der Kompartimentierung des Gehirns, entwickelt sich aus mitotischen Vorläuferzellen, innerhalb ventrikulärer Schichten, eine Vielzahl von Nerven- und Gliazellen. Durch Migration neuraler Zellen an ihren jeweiligen Zielort und die darauf folgende Differenzierung bilden sich im Gehirn komplexe Strukturen und Verschaltungen.

Nachdem sich das Neuralrohr geschlossen hat, wandern aus seinem dorsalen Abschnitt Neuralleisten-Zellen aus und bilden die sensorischen und motorischen Neurone des peripheren Nervensystems. Neben Neuralleistenzellen tragen verschiedene Typen ektodermaler Plakoden zur Generierung des peripheren Nervensystems bei (Webb and Noden, 1993). So delaminieren ektodermale Zellen epibranchialer Plakoden nach innen und tragen neben Neuralleistenzellen ebenfalls zur Bildung kranialer Ganglien bei.

1.2 Determinierung – Migration – Differenzierung, wichtige Schritte zur Generierung des Nervensystems.

Die neurale Induktion wird teilweise durch Faktoren wie Follistatin, Noggin und Chordin gesteuert, die von mesodermalem Gewebe sezerniert werden. Diese blockieren die Funktion von BMP-4 im Ektoderm und sorgen somit für die Aktivierung des neuronalen Programms. Gleichzeitig findet eine erste Regionalisierung des Nervensystems statt (Weinstein and Hemmati-Brivanlou, 1999). Die Bestimmung der anterioren-posterioren Identität durch mesodermale Strukturen konnte durch Inaktivierung der Homeobox Gene *Lim1* und *Otx2* gezeigt werden (Acampora *et al.*, 1995), (Shawlot and R., 1995). *Lim1* und *Otx2* werden im anterioren Mesoderm exprimiert und eine Deletion eines der beiden Gene führt zu einem kompletten Verlust des Vorder,- und Mittelhirns. Kaudale Strukturen ab dem Rhombomer 2 des Hinterhirns sind hingegen vollständig entwickelt. Diese Studien und weitere Transplantations- und Rotationsexperimente (Rubenstein and Puellas, 1994) deuten auf eine Induktion der AP-Achse durch dorsale mesodermale Schichten hin. Neben der AP-Identität findet im Neuralrohr auch eine Kompartimentierung in dorsale und ventrale Bereiche statt.

Das von Notochord und Bodenplatte sezernierte Molekül Sonic hedgehog hat einen ventralisierenden Einfluß auf das Neuralrohr und bewirkt die spezifische Induktion von Motorneuronen innerhalb der Grundplatte (Ericson *et al.*, 1996). Weiterhin reprimiert Sonic hedgehog die dorsalisierenden Faktoren Pax-3, dorsalin und msx1. Die dorsale Identität der Flügelplatte wird durch BMP-4 und BMP-7 vermittelt (Liem *et al.*, 1995). Beide Gene werden im dorsalen Ektoderm exprimiert und bewirken die Induktion von msx1, Pax-3 und Pax-7. Die Aktivierung dieser Gene führt zur Generierung sensorischer Neurone im dorsalen Bereich des Neuralrohrs (Tanabe and Jessel, 1996). Das Neuralrohr besteht während früher embryonaler Entwicklungsstadien aus einem mehrreihigen Neuralepithel, dessen Zellkerne, in Abhängigkeit vom Zellzyklus, zwischen Außen- und Innenwand migrieren. In der S-Phase liegen die Kerne außen nahe der Membrana limitans externa. Nach Migration in Richtung Lumen, teilen sich die Zellen innerhalb der Ventrikularschicht. Die Tochterzellen migrieren schließlich wieder in die Außenzone und treten erneut in die S-Phase ein (Sauer, 1935). Die meisten Zellen des Nervensystems entstehen aus solchen multipotenten Stammzellen. Neben Vorläuferzellen für Neurone, den Neuroblasten, entstehen so auch unterschiedliche Vorläuferzellen für Gliazellen, wie die Oligodendroblasten, Astroblasten und Radialglioblasten.

Ein Modellsystem für den Verlauf verschiedener Determinierungs- Migrations und Differenzierungsprozesse bietet die Entwicklung des Neokortex. Die Rekrutierung neuronaler Vorläuferzellen beginnt mit einer asymmetrischen Zellteilung innerhalb ventrikulärer Schichten. In dieser Phase findet eine horizontale Teilung statt, so daß eine Tochterzelle den Kontakt zum Lumen verliert, an die Peripherie migriert und dort eine weitere intermediäre Schicht bildet. Die Zellen der intermediären Schicht differenzieren entweder zu Glia- oder Nervenzellen, die durch Aussendung von Axonen eine weitere kernlose, marginale Schicht bilden. Im Bereich des Rückenmarks werden diese drei Schichten während der Entwicklung und im adulten Organismus beibehalten, wobei die intermediäre Schicht eine schmetterlingsähnliche Struktur ausbildet. Im Gegensatz zum Rückenmark, findet bei der Entwicklung der Großhirnrinde eine Verdoppelung dieser drei Schichten statt. Durch Migration von weiteren postmitotischen ventrikulären Zellen durch die intermediäre Zone entsteht eine weitere Zellschicht, die kortikale Platte (weitere Bezeichnung hierfür: Rindenschicht oder neopallialer Kortex). Durch das Einwandern weiterer Neuroblasten aus der ventrikulären Schicht entsteht mit fortschreitender Entwicklung aus der Kortikalplatte die sechsschichtige Großhirnrinde. Dabei migrieren die neu hinzukommenden postmitotischen Neuroblasten entlang radialer Gliafasern durch die bereits bestehenden Zonen hindurch und

bilden so weitere periphere Schichten. Dieser „inside-out“ Mechanismus hat zur Folge, daß die Zellen mit einem frühen „Geburtstag“ in den inneren Zellschichten zu finden sind, wohingegen später rekrutierte Zellen die äußeren Schichten bilden. Nachdem die Nervenzellen ihren Zielort erreicht haben beginnt in der Regel die terminale Differenzierung, bei der neben der Generierung von Axonen und Dendriten auch synaptische Kontakte geknüpft werden. Durch den Zeitpunkt der letzten Zellteilung scheint nicht nur die Lage im Kortex determiniert zu werden, sondern auch die Fähigkeit synaptische Verbindungen zu knüpfen. So senden Neurone der inneren Schichten meist Axone in Regionen außerhalb des Kortex aus, spät geborene Nervenzellen hingegen in Regionen innerhalb des Kortex (Hatten, 1993). Wenn das Teilungspotential der ventrikulären Zone erschöpft ist, können keine neuen Nervenzellen mehr entstehen und es bleibt eine einschichtige Lage aus Ependymzellen, die die Ventrikel auskleidet, zurück. Zwar konnten in den letzten Jahren die Mechanismen dieser Wanderungen durch Zellmarkierungsexperimente gut beschrieben werden, dennoch bleiben viele Fragestellungen weitgehend unverstanden. So sind beispielsweise die Mechanismen der Zellzykluskontrolle und die zeitliche Regulation der letzten asymmetrischen Zellteilung nur lückenhaft verstanden. Weiterhin ist unklar, welche Faktoren für die korrekte Migration von Nervenzellen an ihre finale Position verantwortlich sind. Klar ist jedoch, daß vielfältige Kombinationen von zell-intrinsischen und extrinsischen Faktoren für eine korrekte Determinierung, Migration und Differenzierung zuständig sind. Ein wichtiger Faktor für die Aufrechterhaltung der Proliferation innerhalb ventrikulärer Schichten ist der Brain Factor-1 (BF-1). Homozygote Deletionsmutanten für BF-1 zeigen verkleinerte Großhirnhemisphären und eine deutliche Reduktion mitotisch aktiver Zellen in ventrikulären Schichten des Telenzephalons. Vermutet wird eine verfrühte Rekrutierung von mitotischen Vorläuferzellen (Xuan *et al.*, 1995).

Verpflanzt man junge, mitotisch aktive ventrikuläre Vorläuferzellen, die normalerweise Nervenzellen in tiefen Schichten bilden, in ältere weiterentwickelte ventrikuläre Schichten, so wandern diese Zellen entgegen ihres eigentlichen Schicksals, in periphere Schichten. Transplantiert man hingegen junge Zellen während der letzten Zellteilung, so wandern diese an ihre angestammte Position und bilden Nervenzellen innerhalb tiefer Schichten (McConnell und Kaznowski, 1991)

(Bohner *et al.*, 1997) (Übersicht: Edlund und Jessel, 1999). Durch diese Transplantationsexperimente konnte eindrucksvoll gezeigt werden, daß eine Spezifizierung ventrikulärer Vorläuferzellen während der letzten Zellteilung stattfindet. Welche Faktoren für diese laminare Spezifizierung verantwortlich sind, bleibt jedoch unklar. Durch

immunhistochemische Analysen konnte gezeigt werden, daß nach asymmetrischer Teilung in der postmitotischen Tochterzelle ein erhöhter Notch1 Anteil vorliegt. Es wird vermutet, daß das normalerweise inhibitorisch wirkende Notch1 Protein eine verzögernde Wirkung, hinsichtlich der neuronalen Differenzierung, auf die postmitotische Zelle hat (Chen und McConnell, 1995). Nach Verlassen der ventrikulären Zone migrieren die postmitotischen Nervenzellen entlang radialer Gliafasern an ihre finale Position. Während dieser Migration wird eine Vielzahl von möglichen Wegfindungs-Faktoren exprimiert. Ein Kandidat ist das Glykoprotein Reelin (D'Arcangelo *et al.*, 1995) (D'Arcangelo *et al.*, 1997). Das von Cajal-Retzius Zellen in der marginalen Schicht sekretierte Reelin Protein dient vermutlich als „Stop-Signal“ für migrierende Neurone und sorgt somit für die richtige Orientierung laminarer Schichten. In der Reeler Maus-Mutante sekretieren Cajal-Retzius Zellen kein Reelin, was zur Folge hat, daß die entstehenden Schichten von außen nach innen ausgebildet werden (Frotscher, 1998). Trotz dieser invertierten Laminierung enden thalamokortikale Fasern in den entsprechenden, hier verkehrt gelegenen Schichten der Großhirnrinde. Nach Eintritt der Zellen in ihre finale Position, beginnt die terminale Differenzierung, die neben dem Auswachsen der Axone auch die Synaptogenese beeinhaltet. Zwar sinkt die absolute Anzahl synaptischer Kontakte mit zunehmendem Alter, aber dennoch sind Nervenzellen in der Lage während ihres gesamten Lebens Synapsen zu bilden. Einen nicht unerheblichen Beitrag leisten dabei die Neurotrophine, die als extrinsische Faktoren zur Modulation der neuronalen Plastizität beitragen (Cannossa *et al.*, 1997).

Ein weiteres Modellsystem bietet die Entwicklung des Kleinhirns. Hier wandern mitotische Körner-Vorläuferzellen ab E14 aus der rhombischen Lippe und formen die zunächst einschichtige Extra-Granuläre-Schicht (EGL). Postnatal findet eine schnelle Proliferation dieser Zellen statt, so daß die EGL stark expandiert. Während dieser Expansion, migrieren postmitotische Körner-Vorläuferzellen nach innen und formen die Interne-Granuläre-Schicht (IGL), wobei die EGL an Zellen verarmt und schließlich verschwindet. In der ventrikulären Schicht der Kleinhirnanlage entstehen gleichzeitig Purkinje-Vorläuferzellen. Diese wandern, nach Verlassen des Zellzyklus, radial aus und bilden schließlich die Purkinje-Zellschicht. Ein wichtiger Migrations- und Differenzierungsfaktor während der Kleinhirnentwicklung ist das weaver Gen. In der sog. weaver Mausmutante ist, neben einer starken Einschränkung der Migrationsfähigkeit von Körner- und Purkinje-Zellen, die terminale Differenzierung gestört (Rezai and Yoon, 1972). Transplantationsexperimente von weaver defizienten Körnerzellen in die EGL von Wildtyp Tieren, zeigten jedoch ein normales Migrations- und Differenzierungsverhalten dieser weaver-/- Körner-Zellen während der Kleinhirnentwicklung. Diese „rescue-

Experimente“ deuten auf lokale Interaktionen zwischen Vorläuferzellen während früher Differenzierungsschritte hin (Gao *et al.*, 1992). Ebenfalls wichtig für eine Expansion von Körner-Vorläuferzellen ist das Cyclin D2. In der Maus führt die Inaktivierung von Cyclin D2 neben dem Verlust von Stelat-Neuronen, zu einer 50%igen Reduktion von Körnerzellen in der IGL. Es wird vermutet, daß Cyclin D2 neben der Expansion von proliferativen Körnerzellen auch für frühe Differenzierungsschritte verantwortlich ist (Huard *et al.*, 1999).

Die beschriebenen Mechanismen stellen nur einen kleinen Teil neuronaler Entwicklungsvorgänge dar. Der hohe Anteil an genetischer Information, Schätzungen gehen von ca. 30% aus, der für die Kodierung des ZNS und PNS aufgebracht wird, spiegelt die hohe Komplexität des neuronalen Systems wieder. Neben proliferativen Mechanismen haben auch apoptotische Vorgänge einen wesentlichen Einfluß auf die Anzahl von Zellen. Wahrscheinlich werden sog. „Selbstmordprogramme“ immer dann aktiviert, wenn neuronale Zellen nicht ihre richtige Position im neuronalen Netzwerk finden. Warum jedoch bis zu 50% aller angelegten neuronalen Zellen „sterben“ ist weitgehend unverständlich.

1.3 Das Gehirn reguliert den Energiehaushalt

Neben einer Vielzahl von Aufgaben, wie beispielsweise die Verarbeitung visueller und auditiver Signale, wird das adulte Gehirn auch für die Regulierung von Stoffwechselprozessen benötigt. Aufgrund einer steigenden Anzahl von Menschen mit Gewichtsproblemen in den westlichen Ländern, haben in den letzten Jahren Untersuchungen der Gewichtsregulation immer mehr an Bedeutung gewonnen. Vor allem durch eine Vielzahl von Mausmodellen konnten einige Aspekte dieser Regulation aufgeklärt werden (Übersicht: Robinson *et al.*, 2000). Anatomisch lassen sich die Prozesse der Gewichtsregulation innerhalb thalamischer und hypothalamischer Kerngebiete lokalisieren. Eine wichtige Schlüsselfunktion nehmen dabei die Kerngebiete des Nucleus arcuatus (ARC) und Nucleus paraventricularis (PVN) im Hypothalamus ein (Beck, 2001).

Das wohl eindrucksvollste Modell stellt die sog. ob/ob (obesity/obesity) Mausmutante dar, bei der Fettzellen kein Leptin produzieren (Ingalls *et al.*, 1950) (Schwartz *et al.*, 2000). ob/ob Mausmutanten wiegen durchschnittlich 70g im Gegensatz zu 20-30g in der Wildtyp Situation. Nach Überschreiten der Blut-Hirnschranke fungiert Leptin als Sättigungsfaktor innerhalb hypothalamischer Kerngebiete. Externe Zugabe von Leptin resultiert in ob/ob Mausmutanten in einer Gewichtsreduktion. In der Mausmutante db/db (diabetes /diabetes), die ebenfalls eine deutliche Gewichtszunahme zeigt, wirkt eine externe Leptin Zugabe hingegen nicht

gewichtsreduzierend, da hier eine Mutation im Leptinrezeptor vorliegt und somit eine Blockierung des Sättigungssignals eintritt (Coleman, 1978).

Pharmakologische Studien konnten zeigen, daß das Melanocortin-System ebenfalls eine kritische Rolle bei der Gewichtsregulation spielt. Die ektopische Überexpression des Agouti Gens, welches normalerweise nur in der Haut exprimiert wird, führt bei Mäusen zu einer deutlichen Gewichtszunahme (Yen *et al.*, 1994). Das Agouti Protein kompetiert die Bindung des α -Melanocytenstimulierenden Hormons (α -MSH) an den Melanocortin Rezeptor 4 (MC4-R) und blockiert dabei das Sättigungssignal des α -MSH (Fan *et al.*, 1997). Eine Deletion des MC4 Rezeptors in der Maus führt ebenfalls zum Agouti-Phänotyp, mit Ausnahme der gelben Fellfarbe (Huszar *et al.*, 1997). Die Synthese des Melanocortins α -MSH verläuft über das Prohormon Proopiomelanocortin (POMC). Eine Mutation im POMC Gen führt beim Menschen schon im Kindesalter zu einer deutlichen Gewichtszunahme. Die POMC Mutation resultiert weiterhin in einer Hypophysen-Vorderlappen Insuffizienz, hervorgerufen durch das Fehlen von ACTH (Adrenocorticotropes Hormon) und in einer roten Haarfarbe, welche durch das Fehlen von Melanocortin in der Haut zu erklären ist (Krude *et al.*, 1998), (Yaswen *et al.*, 1999).

Als Stimulator für die Nahrungsaufnahme wirkt das Neuropeptid Y (NPY). Injiziert man Mäusen das Neuropeptid Y in den Nucleus paraventricularis, führt dies zu einer erhöhten Nahrungsaufnahme (Stanly and Leibowitz, 1984). Überraschenderweise zeigen dagegen NPY defiziente Mausmutanten weder eine Gewichtabnahme noch einen reduzierten Nahrungsbedarf (Palmitier *et al.*, 1998). Daß NPY dennoch eine wichtige Funktion bei der Gewichtsregulation spielt, konnte durch die Generierung von ob/ob und NPY Doppelmutanten nachgewiesen werden. Diese NPY^{-/-} x ob/ob Doppelmutanten zeigen gegenüber ob/ob eine 20-40%ige Gewichtsreduktion und einen deutlich geringeren Nahrungsbedarf (Erickson *et al.*, 1996). Die Lokalisierung von Leptinrezeptoren auf NPY positiven Zellen, läßt vermuten, daß nach Bindung von Leptin an den Leptinrezeptor eine Inhibierung des NPY-Systems stattfindet.

Die Wirkungsweise von Neuropeptid Y wird durch entsprechende Neuropeptid Y Rezeptoren vermittelt. Bisher konnten 6 verschiedene Subtypen (NPY Y1R- Y6R) identifiziert werden (Beck, 2001). In der Maus resultiert die Inaktivierung der Rezeptoren Y1R, Y2R und Y5R in einer deutlichen Gewichtszunahme. Überraschenderweise führt die Deletion des Y1R nur in weiblichen und die des Y5R nur in männlichen Tieren zu einer Gewichtszunahme. Zwar konnten mit den verschiedenen Mausmodellen einige Mechanismen der Gewichtsregulation

aufgeklärt werden, aber dennoch bleiben bisher viele Mechanismen unklar. So zeigt gerade der fehlende Phänotyp in der NPY-defizienten Maus, wie komplex diese Prozesse sind.

1.4 Mehr Gewicht – weniger Reproduktivität ?

In den meisten Modellen korreliert die Gewichtszunahme mit einer deutlichen Abnahme der Reproduktionsfähigkeit. So sind ob/ob und db/db Mausmutanten neben ihrer Fettleibigkeit auch infertil. Wie im Fall der Gewichtsregulation, wird auch die Reproduktionsfähigkeit durch Neurone in hypothalamischen Kerngebieten gesteuert. Das Gonadotropin-Releasing Hormon, (GnRH) welches von Neuronen in präoptischen Kerngebieten pulsativ sezerniert wird, reguliert die Freisetzung von Luteinisierendem (LH) und Folikelstimulierendem Hormon (FSH) in der Hypophyse. In der sog. „hypogonadal“-Maus (auch hpg) führt eine Deletion des Gonadotropin-Releasing Hormons zu einer deutlichen Reduktion des Luteinisierenden (LH) und Folikelstimulierenden (FSH) Hormonspiegels. Homozygote hpg-Mausmutanten sind aufgrund deutlich unterentwickelter Gonaden infertil (Mason *et al.*, 1986). GnRH-Vorläuferzellen entstehen zunächst außerhalb des Gehirns, in der olfaktorischen Plakode und wandern entlang des Riechnervs über den Bulbus olfactorius in die präoptischen Bereiche des Hypothalamus. Nach Migration und terminaler Differenzierung sezernieren weniger als 2000 Neurone das Gonadotropin-Releasing Hormon; dies gilt für Mensch und Maus. Welche Faktoren die Entwicklung dieser „extern“ rekrutierten GnRH positiven Neurone regulieren, ist weitgehend unverstanden. Ebenfalls unklar ist die Steuerung der pulsatilen Ausschüttung des GnRH. Bisher konnten auf GnRH positiven Neuronen γ -Aminobuttersäure Rezeptoren ($GABA_A$ -Subtyp) und Glutamat Rezeptoren der NMDA und AMPA Klasse identifiziert werden. Weitere synaptische Kontakte bestehen zu dopaminergen, noradrenergen und serotonergen Neuronen sowie mit Neuronen die β -Endorphin, Corticotropin-Releasing Hormon (CRH), Vasopressin, Neurotensin und Substanz P enthalten. Neben diesen Faktoren, die als mögliche Modulatoren der GnRH Sekretion in Frage kommen, spielen negative Rückkopplungsregulierungen eine wichtige Rolle. So wird die GnRH Sekretion durch Leydig-Zellen, welche Testosteron und Östradiol ausschütten, gehemmt. In den Sertolli-Zellen des Hodens wird das Polypeptid Inhibin gebildet, das die FSH-Sekretion in der Hypophyse hemmt. Die große Anzahl von positiven und negativen Regulatoren macht deutlich, wie komplex die Mechanismen des reproduktiven Systems sind. Daneben haben äußere Faktoren wie Nahrungsangebot, Streß und Temperatur ebenfalls einen Einfluß auf die Reproduktionsfähigkeit. In welcher Form Reproduktionsfähigkeit und das gewichts-

regulierende Leptin-NPY System miteinander verbunden sind, ist zum gegenwärtigen Zeitpunkt jedoch unklar.

1.5 Die bHLH Superfamilie – von *Arabidopsis thaliana* bis zum Zebrafisch.

Transkriptionsfaktoren der basischen Helix-Loop-Helix Familie (bHLH) spielen in vielen Organismen eine wichtige Rolle (Weintraub, 1993) (Jan and Jan, 1993). Durch die Klonierung einer Vielzahl von bHLH Genen in Pflanzen, Insekten und Säugetieren wurde deutlich, daß es sich um eine sehr heterogene Familie von Proteinen handelt, die innerhalb verschiedener Gewebe an der Regulation von Determinierungs- und Differenzierungsprozessen beteiligt ist. Bisher konnten mehr als 350 bHLH Gene isoliert werden, wobei die meisten Gene in Säugetieren gefunden wurden. Vergleichende Sequenz-Analysen von den bisher mehr als 350 identifizierten bHLH Genen ergaben insgesamt 44 orthologe Familien, von denen 36 nur in Tieren vertreten sind (Ledent and Vervoort, 2001) (Atchley and Fitch, 1997).

Die HLH Domäne besteht aus zwei amphipatischen α -Helizes mit einer dazwischenliegenden variablen Loop Region. Hydrophobe Wechselwirkungen vermitteln die Dimerisierung zweier HLH Domänen, wobei entweder Homo- oder Heterodimere gebildet werden (Ferre-D´Amare *et al.*, 1993). Die 5´ zur HLH –Domäne gelegene basische Region, sorgt für die Bindung an spezifische DNA Sequenzen. Eine Bindung an sog. E-Box Konsensus-Sequenzen (CANNTG; N entspricht beliebige Base) erfolgt jedoch nur als Homo- oder Heterodimer (Murre *et al.*, 1989a) (Dang *et al.*, 1992). Als erster Transkriptionsfaktor mit einer bHLH Domäne, wurde in der Maus, das ubiquitär exprimierte bHLH Gen E12 identifiziert (Murre *et al.*, 1989b). Weitere Mitglieder dieser Gruppe (A) sind die bHLH Gene E47 und E2A. Neben ubiquitären Transkriptionsfaktoren, wurde eine Reihe weiterer gewebsspezifischer bHLH Gene isoliert. Die bekanntesten Vertreter dieser Gruppe (B) sind sicherlich die Mitglieder der MyoD Familie, die spezifisch in myogenen Zellen exprimiert werden. Durch Hetero-Dimerisierung mit ubiquitären bHLH Genen der Gruppe A, wirken diese als Transkriptionsaktivatoren (Arnold and Braun, 2000). Mitglieder der Gruppe C inhibieren nach Dimerisierung und Bindung an sog. N-Boxen (CACNAG) die Aktivität der Transkription (Paroush *et al.*, 1994) (Massari and Murre, 2000). Diese Repression findet vor allem durch Mitglieder der HES-Familie (hairy- enhancer of split Homologe) statt (Van Doren *et al.*, 1994). Bisher wurden 5 HES bHLH Gene identifiziert (HES 1-5). Eine weitere Untergruppe bilden die dominant negativen-Id Gene (Inhibitor of Differentiation) (Benzera *et al.*, 1990). Diese Faktoren

besitzen keine basische Domäne, können aber über Ihre HLH Domäne Dimerisierungen mit anderen bHLH Proteinen eingehen. Durch die fehlende zweite basische Domäne wird die Bindung an die DNA verhindert. Ein solcher Komplex sequestriert gleichzeitig die ubiquitär exprimierten bHLH Proteine, so daß diese nicht mehr als Bindungspartner für gewebsspezifisch exprimierte bHLH Proteine zur Verfügung stehen (Duncan *et al.*, 1992). In der Maus konnten bisher 4 Id Gene (Id1 –Id4) isoliert werden (Riechmann *et al.*, 1994) (Norton, 2000).

Eine weitere Gruppe innerhalb der bHLH Superfamilie bilden die bHLH Gene mit einer 3' zur HLH gelegen Leuzin-Zipper Region (bHLH-Zip). Dieses zusätzliche Strukturmotiv ist an der Dimerisierung der bHLH-ZIP Proteine beteiligt und sorgt zusätzlich für die Interaktion mit bZIP Proteinen. Neben bHLH-ZIP Proteinen, gibt es eine weitere Gruppe von bHLH Proteinen, die zusätzlich eine PAS-Domäne besitzen. Das PAS Strukturmotiv besteht aus 260-310 Aminosäuren und ist in der Lage mit anderen bHLH-PAS Proteinen zu interagieren. Weiterhin bindet die PAS-Domäne kleinere Moleküle wie z.B. Dioxin. Der Name rührt von den ersten drei identifizierten bHLH-PAS Genen: Drosophila Period (Per), human ARNT und Drosophila Single minded (Sim) (Crews, 1998). Berücksichtigt man neben der hohen Anzahl von reprimierenden und aktivierenden bHLH Genen noch die möglichen Kombinationen durch Heterodimerisierungen, so ergeben sich vielfältige Möglichkeiten einer Genregulation. Besonders eingehend sind die Prozesse an Muskelzellen untersucht worden. Den gewebsspezifisch exprimierten Mitgliedern der MyoD Familie kommt hier eine besonders kritische Rolle zu (Übersichtsartikel: (Arnold and Braun, 2000)). Wird eines der Familienmitglieder (MyoD, Myf-5, Myogenin, Myf-6) ektopisch in Nicht-Muskelzellen exprimiert, so führt dies zur Aktivierung des myogenen Programms (Davis and Weintraub, 1992). Die Inaktivierung von Myf-5 oder MyoD in Mäusen, führt hingegen zu einem nur geringen Phänotyp, wobei die Myf-5 Mutation zu einem Ausfall der ersten Welle der myogenen Differenzierung führt (Braun *et al.*, 1992). Die Ausschaltung beider Gene resultiert in einem kompletten Ausfall der Myogenese (Rudnicki *et al.*, 1993). Die vergleichsweise geringen Phänotypen in den Einzelmutanten lassen sich durch die jeweils überlappende Funktion von Myf-5 und MyoD erklären. Neuere Untersuchungen zeigen jedoch, daß sowohl in MyoD als auch in Myf-5 defizienten Mäusen die myogene Regenerationsfähigkeit gestört ist.

Weitaus komplizierter scheint die Aktivierung und Aufrechterhaltung des neuronalen Programms zu sein. Ausgehend von Drosophila-Mutanten, die Defekte während der Neurogenese zeigten, wurden die ersten neuronalen bHLH Faktoren identifiziert. Eine

bedeutende Rolle bei der Entwicklung sensorischer Neurone in *Drosophila* kommt dabei den proneuralen Genen des Achaete-Scute Komplex zu (Jan and Jan, 1993) (Campos-Ortega, 1998). Die Genprodukte des AS-C Komplex dimerisieren mit dem ubiquitär exprimierten Daughterless Protein und aktivieren spezifische neuronale Zielgene. Die korrekte Musterbildung sensorischer Sinnesorgane wird durch den Mechanismus der lateralen Inhibition reguliert, bei dem die membranständigen Proteine Notch (Rezeptor) und Delta (Ligand) eine wichtige Rolle spielen (Kageyama *et al.*, 1997). Negativ auf die Neurogenese wirken die Proteine Extramacrochaetae (EMC), Hairy (H) und die Genprodukte des Enhancer of split Komplexes (E(spl)-C) (Ohsaka *et al.*, 1994).

Die Identifizierung der entsprechenden homologen Gene in der Maus weist darauf hin, daß ähnliche Vorgänge die Neurogenese in *Drosophila* und Vertebraten kontrollieren. In der folgenden Tabelle sind einige Mitglieder verschiedener neuronaler bHLH Subfamilien aufgeführt.

NeuroD Gruppe:	NeuroD / Beta 2 Math2 / Nex-1 Math3, NeuroM NeuroD2 / mNDRF/ KW8
Math-1 Gruppe:	<i>Drosophila</i> atonal Math-1 Math-5 Math-6
Neurogenin-Gruppe:	Neurogenin-1 / Math-4C Neurogenin-2 / Math-4A Neurogenin-3 / Math4B
Mash-1 Gruppe:	<i>Drosophila</i> acheate-scute Mash-1 Mash-2
NSCL Gruppe:	NSCL-1 / Hen-1 / Nhlh-1 NSCL-2 / Hen-2 / Nhlh-2

Tabelle: Gruppierung verschiedener bHLH Proteine in die NeuroD-, Math-1 -, Ngn-, Mash- und NSCL Gruppe.

Die meisten Vertreter weisen innerhalb der bHLH-Domäne Homologien zu den *Drosophila* Genen atonal und acheate-scute auf. Eine Ausnahme bilden die Gene NSCL-1 und NSCL-2. Beide Faktoren wurden über das SCL-Gen (Stem Cell Leukemia), welches in hämatopoetischen Stammzellen exprimiert wird, isoliert.

Mash-1 (mammalian acheate-scute homolog-1) ist das Homolog zu den *Drosophila* Achaete-Scute Genen. Mash-1 wird hauptsächlich in olfaktorischen Neuronen und im autonomen Nervensystem exprimiert (Guillemot and Joyner, 1993) (Cau *et al.*, 1997). Die Inaktivierung in der Maus führt zu einem Verlust von Neuronen des autonomen Nervensystems (Lo *et al.*, 1994). Weitere Versuche in Huhn und *Xenopus* Embryonen konnten für Mash-1 eine Funktion als proneurales Gen bestätigen.

Ein weiteres wichtiges proneurales Gen in *Drosophila* ist *atonal*. Dieses bHLH Protein aktiviert die Bildung von Chordotonalorganen und Photorezeptoren. Eine Inaktivierung des Gens führt zum Verlust der Chordotonalorgane und des Auges (Jarman *et al.*, 1993). In den letzten Jahren wurde in der Maus eine Vielzahl von *atonal* homologen Genen isoliert, die an Determinierungs- und Differenzierungsprozessen beteiligt sind. Zur Familie der *atonal*-verwandten Gene gehört die Neurogenin Subfamilie die drei Mitglieder *Ngn-1*, *Ngn-2* und *Ngn-3* umfasst. Erste Transkripte von *Ngn-1* und *Ngn-2* lassen sich ab E8 in proliferierenden Vorläuferzellen des peripheren und zentralen Nervensystem detektieren (Sommer *et al.*, 1996) (Ma *et al.*, 1996) (Gradwohl *et al.*, 1996). Innerhalb des zentralen Nervensystems werden die Neurogenine in ventrikulären Schichten exprimiert. Ab E16 nimmt das Expressionsniveau deutlich ab und im adulten Gehirn sind keine *Ngn-1* und *Ngn-2* Transkripte nachweisbar. Durch Geninaktivierungen in der Maus konnte gezeigt werden, daß *Ngn-1* und *Ngn-2* unterschiedliche Zellpopulationen innerhalb sensorischer Ganglien determinieren. So führt die Inaktivierung von *Ngn-1* zum Verlust von proximalen kranialen Ganglien (Ma *et al.*, 1998). Die Nullmutation von *Ngn-2* resultiert hingegen in einem Verlust distaler Ganglien (Fode *et al.*, 1998). Weiterhin wird vermutet, daß *Ngn-1* und *Ngn-2* unterschiedliche Subpopulationen von Neuronen in den dorsalen Wurzelganglien bilden. So wird *Ngn-2* für die Generierung von großen (*trkC* und *trkB* positiv) propriozeptiven und mechanozeptiven Neuronen benötigt. *Ngn-1* wird hingegen von später differenzierenden kleinen (*trkA* positiv) nocizeptiven Neuronen eingesetzt. Zumindest in *Ngn-2* defizienten Mäusen konnte gezeigt werden, daß die Blockierung der Differenzierung *trkC* und *trkB* positiver Neurone, nach zeitlicher Verzögerung, von *Ngn-1* kompensiert werden kann (Ma *et al.*, 1999). Ob die sequenziell exprimierten Determinierungsfaktoren *Ngn-1* und *Ngn-2* als Zeitgeber für neuronale Entwicklungsvorgänge fungieren ist jedoch noch unklar (Anderson, 1999). Die Funktion von *Ngn-1* und *Ngn-2* wird oft mit den myogenen Determinierungsfaktoren *Myf-5* und *MyoD* verglichen. Die funktionelle Redundanz von *Myf-5* und *MyoD* sowie die Expression in unterschiedlichen myogenen Subpopulationen deuten auf analoge Mechanismen bei der Generierung myogener und neuronaler Zellpopulationen hin (Braun and Arnold, 1996). Das *atonal* homologe Gen *Math-1* wird ab E13 von Vorläuferzellen der externen Körnerschicht innerhalb der rhombischen Lippe exprimiert (Akazawa *et al.*, 1995) (Ben-Arie *et al.*, 1996). Eine *Math-1* Inaktivierung in der Maus führt zu einem Arrest während der Körnerzellentwicklung und *Math-1* defiziente Mäuse werden ohne EGL geboren (Ben-Arie *et al.*, 1997) (Helms and Johnson, 1998). Ähnlich wie *Math-1*, ist *Math-1* essentiell für die

Entwicklung einer bestimmten Subpopulation von Neuronen. Ob Math-1 die Proliferation und/oder die Spezifikation bestimmter Zelllinien steuert ist jedoch noch unklar.

Ein weiteres bHLH Gen ist Math-2/Nex1 (neuronal helix loop helix protein-1). Es wird ab E11,5 in der Mantelzone der Hirnvesikel und des Neuralrohrs exprimiert. Ähnlich wie bei NeuroD, finden sich im adulten Gehirn Nex1 Transkripte in Neuronen des Hippokampus, des Kleinhirns und in verschiedenen neokortikalen Regionen, die mit Lernfunktionen in Zusammenhang gebracht werden (Bartholoma and Nave, 1994). Nex-1 defiziente Mausmutanten sind verhaltensunauffällig und zeigen keine offensichtlichen Neurulationsstörungen. Möglicherweise kompensieren überlappend exprimierte Faktoren, wie NeuroD und/oder NeuroD2 die Funktion von Nex-1 (Schwab *et al.*, 1998). Erste Hinweise auf mögliche kompensatorische Effekte, geben Nex-1/NeuroD Doppelmutanten. Der Verlust beider Gene resultiert in einer deutlich stärkeren Störung bei der terminalen Differenzierung von Körnerzellen im Hippokampus (Schwab *et al.*, 2000).

Der wohl bekannteste Vertreter der bHLH Familie, ist der neuronale Differenzierungsfaktor NeuroD (neurogenic differentiation) (Kume *et al.*, 1996). In der Maus wird NeuroD in kranialen und dorsalen Wurzelganglien, otischen Vesikeln, Retina, olfaktorischen Epithelium, Bulbus olfaktorius, Kleinhirn, Hippokampus und Kortex exprimiert (Lee, 1997) (Lee *et al.*, 2000). Im peripheren Nervensystem wird NeuroD transient während embryonaler Entwicklungsstadien exprimiert. In verschiedenen ZNS Strukturen, wie Hippokampus, Kortex und Kleinhirn, lassen sich jedoch auch in adulten Stadien NeuroD Transkripte detektieren. Dieses biphasische Expressionsmuster deutet darauf hin, daß NeuroD während früher Entwicklungsprozesse und in reifen Nervenzellen eine wichtige Rolle spielt. Überraschenderweise induziert NeuroD nach Injektion in Xenopus Embryonen die ektopische Bildung von Neuronen (Lee *et al.*, 1995) (Anderson, 1995). Neben der Expression in neuronalen Zellen, wurde NeuroD auch in beta-Zellen des Pankreas detektiert (Beta-2 b-cell E-Box transactivator 2). Aufgrund massiver Differenzierungsstörungen der Beta-Zellen des Pankreas sterben NeuroD defiziente Mäuse kurz nach der Geburt durch eine Stoffwechselentgleisung als Folge des Fehlens von Insulin (Naya *et al.*, 1997). Um dennoch die Rolle von NeuroD während postnataler Stadien zu untersuchen, generierten Miyata und Kollegen eine transgene Mauslinie, bei der NeuroD unter transkriptioneller Kontrolle des Insulin-Promotors steht. Solche NeuroD-/-Tg Mausmutanten zeigen, während postnataler Stadien, deutliche Störungen in der Entwicklung von Körnerzellen des Kleinhirns und Hippokampus (Miyata *et al.*, 1999), die ohne diesen Kunstgriff nicht analysierbar gewesen wären. Eine weitere Möglichkeit frühlethale Phänotypen von Mutanten zu umgehen, besteht

in der Anlage von sog. Explantat-Kulturen *in vitro*. Die Kultivierung von NeuroD-/- Retina-Explantaten führt zu einer deutlich gesteigerten Anzahl von Gliazellen gegenüber Nervenzellen im Vergleich zu Wildtyp Explantaten. Im Gegensatz dazu resultiert eine retrovirale Überexpression von NeuroD in einer kompletten Blockierung der Gliazellentwicklung und einer erhöhten Anzahl von amakrinen Interneuronen (Morrow *et al.*, 1999). Diese Experimente bestätigen, daß NeuroD sowohl Zellschicksale sowie Determinierungs- und Differenzierungsvorgänge steuert.

Wie NeuroD wird auch NeuroD2/NDRF (NeuroD related Factor) während früher Entwicklungsprozesse und in adulten Nervenzellen benötigt (Schwab *et al.*, 1998). In der Maus finden sich Transkripte in postmitotischen Neuronen der kortikalen Platte des Neokortex, im Mittelhirn, im Hippokampus und im Kleinhirn. Aufgrund der späteren Expression in postmitotischen Neuronen und seiner Fähigkeit neuronale Markergene wie GAP-43 zu aktivieren, wird NeuroD2 in die Klasse neuronaler Differenzierungsfaktoren gruppiert (McCormick *et al.*, 1996). Die Inaktivierung von NeuroD2 in der Maus führt ab P14 zu Störungen in der Kleinhirnentwicklung. Neben einer deutlich erhöhten Apoptoserate, zeigen Körnerzellen des Kleinhirns ein reduziertes Expressionsniveau von neuronalen Differenzierungsfaktoren wie BDNF (brain-derived neurotrophic factor) und Neurofilament (Olson *et al.*, 2001). Interessanterweise führt die NeuroD2 Deletion zu massiven Entwicklungsstörungen der Körnerzellen des Kleinhirns, wohingegen Purkinje-Zellen und kortikale Neurone nicht betroffen sind.

1.6 Die NSCL Subfamilie

NSCL-1 und NSCL-2 (neurological stem cell leukemia) wurden ausgehend vom SCL-Gen, welches in hämatopoetischen Stammzellen vorkommt, kloniert (Begley *et al.*, 1992) (Lipkowitz *et al.*, 1992). Beide Gene werden spezifisch im Nervensystem exprimiert. Eine vergleichende Sequenzanalyse zeigt eine nahe Verwandtschaft zu den bHLH Genen Lyl-1 und Twist. Untereinander zeigen NSCL-1 und NSCL-2 eine Identität von 98% innerhalb der bHLH Region. Die NSCL-1 Expression ab dem Embryonalstadium 8,5 geht der NSCL-2 Expression bei E9,0 kurz voraus (Murdoch *et al.*, 1999). Die höchste Expression findet man am Tag 10,5-12,5. NSCL-1 und NSCL-2 zeigen während embryonaler Stadien ein breites Expressionsmuster innerhalb des zentralen und peripheren Nervensystems. Beide Gene werden in definierten Regionen des Met-, Mes- und Dienzephalons sowie im Neuralrohr exprimiert. Im peripheren Nervensystem finden sich NSCL-1 und NSCL-2 positive Neurone

im Bereich der dorsalen Wurzelganglien, innerhalb cranialer Ganglien, in der Retina und im olfaktorischen Neuroepithel. Im Bereich des sich entwickelnden Kleinhirns wird NSCL-1 in migrierenden Körnerzellen exprimiert (Uittenbogaard *et al.*, 1999). Postnatal lassen sich NSCL-1 Transkripte in der proliferierenden und prä migratorischen Zone der EGL sowie in der sich bildenden IGL detektieren. NSCL-2 wird ebenfalls in der EGL exprimiert, jedoch beschränken sich hier die NSCL-2 Transkripte auf die prä migratorische Schicht der EGL (Haire and Chiaramello, 1996). NSCL-2 wird während embryonaler Stadien in verschiedenen thalamischen und hypothalamischen Kerngebieten exprimiert. Im adulten Gehirn wurde kein NSCL-1 und NSCL-2 nachgewiesen. Die Inaktivierung von NSCL-2 resultiert in einer, nach der Pubertät auftretenden, Gewichtszunahme (Good *et al.*, 1997). Weiterhin sind männliche und weibliche NSCL-2 defiziente Mäuse infertil. Neben einer 4 fachen Abnahme des Serum FSH-Spiegels, konnte eine Reduktion GnRH positiver Nervenfasern im Bereich des Arcuatus Nucleus detektiert werden. Weiterhin ist die Anzahl POMC (ACTH) positiver Neurone im Bereich des Hypothalamus reduziert. In NSCL-2^{-/-} Mutanten wird eine Störung der Hypothalamus-Hypophysen Achse vermutet, die genaue Funktion von NSCL-2 ist jedoch noch unklar. In *Xenopus* konnte eine Interaktion von XHEN1 (Homolog zu NSCL-1) mit XLMO-3 (Lim only Protein-3) nachgewiesen werden (Bao *et al.*, 2000). Ferner führte eine Überexpression von XHEN1 und XLMO-3 in *Xenopus* Embryonen zu einer Induktion von XNGNR-1 und XNeuroD. Auch für SCL konnte eine Interaktion mit LMO-2 und GATA-1 nachgewiesen werden. Vermutlich stabilisiert die cysteinreiche LIM Domäne von LMO-1 und LMO-2 die Heterodimerisierung von HEN-1 mit anderen HLH Proteinen.

1.7 Ziel der Arbeit

Ziel der Arbeit war die Untersuchung der Funktion der neuronalen bHLH Transkriptionsfaktoren NSCL-1 und NSCL-2. Mittels homologer Rekombination wurden die Gene NSCL-1 und NSCL-2 in der Maus inaktiviert und in die Genloci β -Galaktosidase Reportergene inseriert. Mit Hilfe dieses Reportergens, sollte eine Vergleichende Analyse des räumlichen und zeitlichen Expressionsmusters von NSCL-1 und NSCL-2 während embryonaler und postnataler Entwicklungsstadien vorgenommen werden. Aufgrund der Expression innerhalb hypothalamischer Kerngebiete von NSCL-2 sollte zunächst eine mögliche Rolle des NSCL-2 Gens bei der Regulation des neuroendokrinen Systems untersucht werden.

Durch die kombinierte Inaktivierung von NSCL-1 und NSCL-2 sollten weiterhin mögliche kompensatorische Prozesse zwischen beiden Genen analysiert werden. Weiterhin sollten die Expressionsmuster von Genen, welche zu NSCL-1/2 ein räumlich/zeitlich überlappende oder komplementäre Domänen aufweisen in den Einzelmutanten sowie in den Doppelmutanten bestimmt und miteinander verglichen werden.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien und Verbrauchsmaterial

Soweit nicht anders erwähnt, wurden handelsübliche Chemikalien in Analysequalität und Biochemikalien der Firmen Merck (Darmstadt), Serva (Heidelberg), Sigma (Deisenhofen), New England Biolabs (Schwalbach), Invitrogen (Leek, NL), Promega (Mannheim), Stratagene (Heidelberg) und Boehringer (Mannheim) verwendet. Radioaktive Substanzen wurden von Amersham Buchler (Braunschweig) und NEN Life Science (Köln) bezogen.

Anti-Digoxigenin-AP Fab Fragmente 150 U (200 μ l)	Boehringer (Mannheim)
Avertin (Tri-Brom-Ethanol)	Sigma (Deisenhofen)
BCIP	Boehringer (Mannheim)
Blottingpapier GB-003	Schleicher & Schüll (Dassel)
Blutlaugensalz $K_3[Fe(CN)_6]$, $K_4[Fe(CN)_6]$	Sigma (Deisenhofen)
Bromdesoxy-Uridin (BrdU)	Sigma (Deisenhofen)
Diaminobenzidin (DAB)	Sigma (Deisenhofen)
Digoxigenin-11-UTP	Boehringer (Mannheim)
Dimethylsulfoxid, Dimethylformamid	Sigma (Deisenhofen)
Einmalfilter Minisart NML (0.2 und 0.45 μ m)	Sartorius (Göttingen)
Entellan	Merck
Faltenfilter	Schleicher & Schüll (Hannover)
Hefe-tRNA	Boehringer (Mannheim)
NBT	Boehringer (Mannheim)
Nitrocellulosefilter BA 85	Schleicher & Schüll
Mowiol	Merck
Objektträger und Deckgläser	Schütt (Göttingen)
Reaktionsgefäße	Schütt (Göttingen)
Ribonukleotid Triphosphate	Boehringer (Mannheim)
Röntgenfilme	Kodak (Frankfurt am Main)
SDS	Bio-Rad (München)
Tween-20	USB (Bad Homburg)
Vectabond - Reagent	Camon (Wiesbaden)
X-Gal 2[5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl- β -D-Galaktopyranosid]	Sigma (Deisenhofen)

Plastik-Gefäße

Nunc (Roskilde, Dänemark)

Verbrauchsmaterialien, die nicht gesondert aufgeführt sind, wurden von der Firma Wilke & Witzel (Hamburg) und Firma Heinemann (Göttingen) bezogen.

2.1.2 Enzyme

AMV-Reverse Transkriptase	Promega (Heidelberg)
Alkalische Phosphatase	Promega (Heidelberg)
Polynukleotid-Kinase	New England Biolabs (Schwalbach)
Proteinase K	Boehringer (Mannheim)
Restriktionsendonukleasen	Boehringer (Mannheim)
	New England Biolabs (Schwalbach)
Reverse Transkriptase Superscript™	Gibco BRL (Eggenstein)
RNase A	Boehringer (Mannheim)
RNase H	Promega (Heidelberg)
RNasin (RNase Inhibitor)	Promega (Heidelberg)
Taq-DNA-Polymerase	Promega (Heidelberg)
T3-RNA-Polymerase	Promega (Heidelberg)
T4-DNA-Ligase	Boehringer (Mannheim)
T7-RNA-Polymerase	Promega (Heidelberg)
Terminale Desoxynukleotidyl Transferase (TdT)	Gibco BRL (Eggenstein)

2.1.3 Lösungen und Medien

Alle in dieser Arbeit verwendeten Lösungen und Puffer wurden mit bidestilliertem H₂O aus einer Reinstwasseranlage (Bi-Dest 2304; GFL) angesetzt.

- Ampicillin-Stammlösung: 50 mg/ml H₂O
- BrdU- Stammlösung: 10x 72mg/ml BrdU in 1xPBS lösen; bis zur weiteren Verwendung bei -20°C lagern.
- Chloroform-Lösung : 50 ml Tris-HCl, pH 8,0; 250 ml Phenol; 240 ml Chloroform; 10 ml Isoamylalkohol; 0,5 g 8-Hydroxychinolin, im Scheidetrichter mischen, mit je 250 ml der folgenden Lösungen extrahieren: 2 x mit Tris-HCl, pH 8,0; 1 x mit TE, Phasentrennung im

Dunkeln bei RT über Nacht, wäßrige Phase verwerfen, organische Phase mit TE überschichten und bei 4°C lichtgeschützt lagern.

- DNA-Ladepuffer (10 ml): 1 ml Bromphenolblau, 2,5%ig in H₂O; 1 ml Xylencyanol, 2,5%ig in H₂O; 2,5 g Ficoll Type 4000
- Ethidiumbromid-Lösung (0,01%): 10 mg Ethidiumbromid in 100 ml bidest. H₂O
- Herings-Sperma-DNA: 1g DNA in 50 ml H₂O (EK 20 mg/ml) lösen und in einem Ultraschall Homogenisator (2x 10 min) sonizieren, 10 min kochen und in Aliquots bei -20°C lagern. DNA vor Gebrauch erneut 5 min kochen.
- LB-Agar: LB-Medium mit 15 g/l Agar
- LB-Amp.-Selektivmedium bzw. -Agar: LB-Medium bzw. LB-Agar wird nach Abkühlung auf 60°C Ampicillin in einer Endkonzentration von 50 mg/l zugegeben.
- LB-Medium: 10 g/l Casein, enzymat. hydrolysiert; 5 g/l Hefeextrakt; 5 g/l NaCl: mit NaOH auf pH 7,5 eingestellt.
- Mowiol: 2,4g Mowiol (Merck) + 6g Glycerol + 6ml H₂O; mehrere Std. bei RT. rühren. + 12ml 0,2 M Tris pH 8,5. Aliquotieren und bei -20°C lagern.
- PBS 10x: 1,5 M NaCl; 0,03 M KCl; 0,08 M Na₂HPO₄ x 2H₂O; 0,01 M KH₂PO₄ pH 7,5
- SSC-Puffer 20x: 3 M NaCl; 0,3 M tri-Natriumcitrat pH 7,0
- SSPE-Puffer 20x: 0,16 M NaOH; 0,2 M Natriumdihydrogenphosphat; 0,02 M EDTA pH 7,2
- TAE-Puffer 50x: 2 M Tris-Base; 1 M CH₃COOH; 0,1 M EDTA, mit Essigsäure auf pH 8,3 eingestellt
- TE-Puffer (10/1): 10 mM Tris-HCl, pH 8,0; 0,1 mM EDTA, pH 8,0

2.1.4 Verwendete "Kits"

- DNA Cycle Sequencing Kit (Abi, Weiterstadt)
- Qiagen Plasmid Mini- und Maxi-Kit (Qiagen, Hilden)
- Atlas cDNA Expression Array PT3140 (Clontech, Palo Alto)
- Atlas Pure Total RNA labeling System PT3231-1 (Clontech, Palo Alto)
- BrdU Staining Kit (Calbiochem,)

2.1.5 Bakterienstämme

XL1-Blue (supE44 hsdR17 recA1 endA1 gyrA46 thi relA1 lac-; F-[proAB+ lacIq lacZdeltaM15 Tn10(tetr)]); (Bullock et al., 1987; Stratagene; Heidelberg)

2.1.6 Mausstämmen

- Mäuse der Stämme *ICR* und *C57BL/6J* wurden von der Firma Harlan-Winkelmann (Paderborn) bezogen.

2.1.7 Verwendete Vektoren

pBluescript KSII+ (*pKSII+*) (GenBank-Nr.:X52327 [KS(+)]; Stratagene, Heidelberg)

pGEM-T-Vektor (Promega, Heidelberg)

2.1.8 Proben für *in situ* und *whole mount* Hybridisierungen

Die unten aufgeführten cDNA-Subklone dienen als Matrize zur Herstellung von antisense-Proben mittels *in vitro* Transkription. Die Plasmid-Konstrukte wurden mit den angegebenen Restriktionsendonukleasen linearisiert und der entsprechenden Polymerase *in vitro* transkribiert.

- Maus NSCL-1 cDNA

1,9kbp Sal-Fragment in pKS

Antisense-Probe: Linearisierung mit PstI, Transkription mit T3

- Maus NSCL-2

1,6 kbp BamHI Fragment in pKS

Antisense-Probe: Linearisierung mit NaeI, Transkription mit T7-Polymerase (500 bp)

- Maus Id2

736 bp HindIII- XbaI cDNA Fragment in pks

Antisense-Probe: Linearisierung mit XhoI, Transkription mit T3

- Maus Id1

922 bp BamHI cDNA Fragment in pKS

Antisense-Probe: Linearisierung mit XbaI, Transkription mit T7

- Ratte SCG-10-8.6

1,9kbp EcoRI Fragment in pKS

Antisense-Probe: Linearisierung mit BamHI, Transkription mit SP6

- Maus NeuroD

1,3kbp EcoRI cDNA Fragment in pKS

Antisense-Probe: Linearisierung mit XhoI, Transkription mit T7

- Maus Math-1

600 bp PCR Fragment in pCR II

Antisense-Probe: Linearisierung mit XhoI, Transkription mit SP6

- Maus NeuroD2

1,0 kbp PvuII-ApaI cDNA Fragment in pKS

Antisense-Probe: Linearisierung mit EcoRI, Transkription mit T3

- Maus Neurogenin-2

1,4 kbp cDNA Fragment in pKS

Antisense- Probe: Linearisierung mit SacII, Transkription T3

- Maus Reelin

1,0 kbp Fragment in pKS

Antisense- Probe: Linearisierung mit EcoRI, Transkription mit T3

2.1.9 Verwendete Antikörper

- anti- beta-Tubulin III (1:400, BAbCO)
- anti- Calbindin D28K (1:4000, Sigma)
- anti- Calretinin (1:2000, Swant)
- anti- GFAP (1:500, DAKO)
- anti-N-CAM (Neural Cell Adhesion Molecule, clone NCAM OB11, 1:100 Sigma)
- anti- Neurofilament 200 (1:400, Sigma)
- anti- LR-1 (1:1000, von Prof. Benoit (Kanada) zur Verfügung gestellt)
- anti-NPY (1:250, von A.F. Parlow zur Verfügung gestellt harbor UCLA Medical Center)
- anti ACTH (POMC) (1:500, von A.F. Parlow zur Verfügung gestellt harbor UCLA Medical Center)
- anti NPY Y1 Rezeptor von Helen Chu Wong zur Verfügung gestellt (CURE Digestive Diseases Research Programme, Los Angeles)

- anti-Leptin-Rezeptor (1:2000, Santa-Cruz)
- anti PCNA (Proliferating cellular nuclear antibody) („Ready to use“ Lösung, DAKO)

Als 2. Antikörper wurden biotinylierte Spezies-Antikörper gegen Maus, Kaninchen und Meerschwein verwendet (Vectastain Elite Kit, Vector).

2.1.10 Southern- Blot Hybridisierungsproben.

NSCL-1 Probe für Genotypisierung

1,5 kbp BamHI / NcoI Fragment

NSCL-2 Probe für Genotypisierung

1,4 kbp ScaI / SalI Fragment

2.1.11 Oligonukleotide

Oligonukleotide für PCR-Anwendungen und Sequenzierungsreaktionen wurden von der Firma Roth bezogen.

Bezeichnung	Sequenz (5'→3')	Name	Position cDNA
NSCL-1 Pr. (a) f	GACTCCAGTCTGGACTAAGTAAG	a	(+) 45-69
NSCL-1 Pr.(b) b	GGACCACTCCTGGATCCCCGGATC	b	(-) 578-553
NSCL-1 Pr.(c) b	GCATGGACTCCATTCTGACCACTC	c	(-) 1104-1080
NSCL-1 UTR f	TGTTCCGGCCTAGCTTGGTTCAGAG	6842D	(+) 1046-1070
NSCL-1 UTR b	TAGCCGGCACAGGGAAAGGGAGAA	6843D	(-) 1570-1546
NSCL-2 UTR f	CCCGAGGGTGGTTGGTTTA	6840E	(+) 1215-1233
NSCL-2 UTR b	AATAGACGGGGTGTTTTTG	6841D	(-) 1697-1678
NSCL-2 530b	GCTTGGTCCGGACTCAGCATC	1701E	(-) 547-527
NSCL-2 610b	CCGACACGCTGCCAGAACC	1700	(-) 633-614
NSCL-2 90b	GGGAAGCAGAGAAAGGGGAGC	1705	(-) 84- 64
NSCL-2 10f	CCTCCAGGCTAAATCAATTGG	1704	(+) 9-35
NSCL-2 410f	GCGAATGTAATAAATATTGGC	1703	(+) 404-424
NSCL-2 510f	CGAAAAGATTATCGACAGGGC	1702	(+) 488-509
NSCL-2 Exon 1	CCAGCATCTCCAAGCTACTGAC	1343D	(+) 152-173

Verwendete Oligonukleotide für die Sequenzierung des 6,64kbp stromaufwärts 5' Fragments

NSCL-2 w	GCCCGAAGGATGGATGCATC
NSCL-2w1	CAGAGATGTACACACAGATGCGC
NSCL-2w2	GGATGGGAAAGAGGATGCTC
NSCL-2w3	GCATATTCATAAATTAATAC
NSCL-2w4	CAAGCTTGCTGTGACACTCAACG

NSCL-2 w5	GACCATAACTCCAGTCGAGGTG
NSCL-2 w6	CTGCTGCCCTGTTTTATATATAG
NSCL-2 intron 1	CTTGGTCTAAGGAAAATAATTGACTG
NSCL-2 intron 1	GACAAGGTCTCACTATGCAGCC

Sonstige Oligonukleotide

T3	ATTAACCCTCACTAAAG
T7	CGCGCGTAATACGACTCACTTATAG
SP6	CATACGATTTAGGTGACACTATAG
GAPDH for	GTGGCAAAGTGGAGATTGTTGGC
GAPDH back	GATGATGACCCGTTTGGCTCC

(+) kennzeichnet den Plus Strang

(-) kennzeichnet den Minus Strang

2.2 Methoden

Sofern nicht näher erwähnt, wurden alle Standardtechniken der Molekularbiologie nach „Molecular Cloning“ (Sambrook et al., 1989) oder „Current Protocols in Molecular Biology“ (Ausubel et al. 1992) durchgeführt.

2.2.1 Sterilisation von Lösungen und Geräten

Die Sterilisation von Lösungen, Medien und Labormaterialien (z.B. Reaktionsgefäße, Pipettenspitzen, Glaswaren), die für die Arbeiten mit RNA, DNA, Zellkulturen sowie für enzymatische Reaktionen benötigt wurden, erfolgte in feuchter Hitze bei 134°C und 2,2 bar Druck für 30 min in einem Autoklaven der Firma Sauter und Fedegari. Glaswaren wurden auch in trockener Hitze bei 180°C in einem Trockenschrank sterilisiert. Lösungen mit hitzesensitiven Stoffen wurden durch 0,2 μm bzw. 0,45 μm Cellulose-Acetat Sterilfilter (Sartorius) entkeimt.

2.2.2 Extraktion von Nukleinsäuren

2.2.2.1 Extraktion genomischer DNA aus Geweben.

Die Isolierung genomischer DNA erfolgte modifiziert nach Laird und Mitarbeitern (Laird et al., 1991). Diese Methode wurde für die gleichzeitige Analyse großer Probenanzahlen konzipiert und im Rahmen dieser Arbeit hauptsächlich zur Genotypisierung von Mäusen eingesetzt. Die DNA bleibt bei dieser Methode durch den Verdau endogener Nukleasen durch ProteinaseK intakt.

Zur Genotypisierung von Mäusen wurde diesen ein kurzes Gewebestück der Schwanzspitze abgeschnitten, in 500 μ l Lysis-Puffer überführt und über Nacht bei 55°C unter Schütteln inkubiert. Am darauffolgenden Tag wurden nicht-lysierte Gewebestandteile durch 10-minütige Zentrifugation in einer Eppendof-Tischzentrifuge sedimentiert. Die im Überstand befindliche DNA wurde nach einer Chloroform-Extraktion (optional) durch Zugabe von 500 μ l Isopropanol bei Raumtemperatur präzipitiert. Das DNA-Präzipitat wurde entweder durch 10-minütige Zentrifugation sedimentiert, anschließend mit 70% EtOH gewaschen und in 100 μ l TE-Puffer resuspendiert oder mittels einer Kanüle direkt in TE-Puffer überführt und über Nacht bei 55°C gelöst. Die Lagerung der DNA erfolgte bei 4°C.

- DNA-Lysispuffer: 100 mM Tris-HCl (pH 8,5); 5 mM EDTA; 0,2% SDS; 200 mM NaCl
100 μ g/ ml Proteinase K

2.2.2.2 Präparation von RNA aus Geweben mittels LiCl-Harnstoff-Extraktion

Die Präparation von Gesamt-RNA aus Geweben mittels LiCl-Harnstoff-Extraktion (Auffray und Rougeon, 1980) beruht auf einer Denaturierung der im Gewebe vorhandenen Proteine und ihrer Entfernung durch Phenol/Chloroformextraktion, sowie einer selektiven RNA-Präzipitation in Gegenwart hoher LiCl Ionen Konzentrationen. Infolge der hohen Harnstoffkonzentration werden die im Gewebe vorhandenen RNasen und DNasen gehemmt, die Isolierung intakter RNA ist daher auch aus Geweben mit einem relativ hohen RNase-Gehalt möglich. Die so gewonnene RNA ist spektrophotometrisch sehr rein und läßt sich für die meisten molekularbiologischen Anwendungen einsetzen. Ein geringer Anteil an DNA erfordert je nach Anwendung eine anschließende Behandlung mit DNaseI .

Die in physiologischer Kochsalzlösung präparierten Gewebe wurden unmittelbar nach der Entnahme in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur RNA-Präparation bei -80°C

gelagert. Zu jedem Gramm der tiefgefrorenen Gewebe wurden 10 ml sterile 8 M Harnstoff/ 4 M LiCl Lösung gegeben und der Ansatz mit einem Ultraturrax (T25, Janke & Kunkel) homogenisiert. Das Homogenat wurde dann für 24 h bei 4°C inkubiert. Es schloß sich eine Zentrifugation von 30 min bei 4°C mit 12000 rpm an. Das Sediment wurde in 8 M Harnstoff/ 4 M LiCl Lösung resuspendiert und erneut zentrifugiert. Zur Abdauung der Proteine wurde das Sediment in 6 ml (je Gramm an eingesetztem Gewebe) einer 10 mM Tris pH 7,5/ 0,5% SDS/ 50 µg Proteinase K (EK) - Lösung resuspendiert und 1-2 h bei 37°C inkubiert. Die Suspension wurde daraufhin mit dem gleichen Volumen an Chloroform extrahiert und zur Phasentrennung 20 min mit 10000 rpm bei RT zentrifugiert. Dieser Vorgang wurde zweimal wiederholt. Nach Extraktion mit Chloroform/Isoamylalkohol (24 : 1) wurde die RNA durch die Zugabe des 0,1 fachen Volumens einer 3 M Natriumacetat-Lösung und 2,5 fachen Volumen an absoluten Ethanol bei 20°C über Nacht präzipitiert. Die RNA wurde durch Zentrifugation (12000 rpm, 30 min, 4°C) sedimentiert, mit 70% EtOH gewaschen, kurz unter Vakuum getrocknet und in TE - Puffer oder bidest. H₂O resuspendiert. Es schloß sich bei Bedarf eine Anreicherung von PolyA⁺ -RNA aus dem Gesamt-RNA-Gemisch mittels Oligo(dT)-Zellulose an. Das Vorgehen entsprach der von Bertram und Gassen (1991) beschriebenen Anleitung.

2.2.2.3 Präparation von gewebespezifischer mRNA

Die Isolierung von mRNA aus geringen Mengen embryonalen Gewebes erfolgte unter Verwendung des AtlasTM Pure Total RNA Isolations Kits (Clontech). Hierzu wurden die Gewebestücke in kaltem PBS präpariert, in ein steriles Eppendorfgefäß überführt und sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die RNA wurde zunächst mit biotinilierten Oligo(dT) Primern inkubiert. Die Isolierung der mRNA erfolgte mittels Streptavidin gekoppelter magnetischer Kugeln. Das weitere Vorgehen entsprach der mitgelieferten Herstelleranleitung.

2.2.3 Reinigung von Nukleinsäurelösungen

2.2.3.1 Chloroformextraktion

Zum Entfernen von Proteinen aus Nukleinsäurelösungen wurden diese mit Chloroform extrahiert. Die DNA- bzw. RNA-haltige Lösung wurde hierzu mit dem gleichen Volumen Chloroform versetzt, intensiv gemischt und 5-10 min bei 15000 rpm in einer Tischzentrifuge

zur Phasentrennung zentrifugiert. Die wässrige Phase wurde in ein frisches Eppendorfgefäß überführt und zweimal mit Chloroform in analoger Weise extrahiert. Anschließend wurde die DNA bzw. RNA mit Ethanol gefällt (2.2.3.2).

2.2.3.2 Ethanolfällung

Zur Fällung von DNA mit Ethanol wurden der DNA-Lösung 0,1 Volumina 3 M Natriumacetat pH 5,2 und 2,5 Volumina vorgekühltes Ethanol p.a. zugesetzt. Es schloß sich eine Inkubation für eine Stunde bei -80°C , bzw. über Nacht bei -20°C an. Die präzipitierte DNA wurde dann durch Zentrifugation für 30 min bei 4°C und 15000 rpm in einer Tischzentrifuge sedimentiert. Der Überstand wurde abgenommen und verworfen. Das Sediment wurde mit vorgekühltem Ethanol (70%) gewaschen und für weitere 15 min bei 4°C und 15000 rpm zentrifugiert, unter Vakuum getrocknet und in TE-Puffer oder bidest. H_2O resuspendiert.

2.2.4 Konzentrationsbestimmung von wässrigen Nukleinsäurelösungen

Die Bestimmung der Konzentration und Reinheit von wässrigen DNA- und RNA-Lösungen erfolgte durch Messung der Absorptionswerte der jeweiligen Lösung bei drei verschiedenen Wellenlängen (230, 260 und 280 nm). Das Absorptionsmaximum von Nukleinsäuren liegt bei 260 nm, das von Proteinen bei 280 nm und das von Salzen bei 230 nm. Die Berechnung der Konzentration erfolgte nach folgender Regel: 1 A_{260} E entspricht 50 $\mu\text{g/ml}$ DNA, bzw. 40 $\mu\text{g/ml}$ RNA bei einer Schichtdicke von 1 cm.

Der Quotient A_{260}/A_{280} wurde zur Bestimmung der Reinheit der Nucleinsäure-Lösung herangezogen. Dieser Wert sollte für reine DNA bzw. RNA-Lösungen zwischen 1,8 und 2,0 liegen.

2.2.5 Elektrophoresen von Nukleinsäuren

2.2.5.1 Agarosegelelektrophorese von DNA

Zur präparativen und analytischen Trennung von DNA-Fragmenten wurden Agarosegelelektrophoresen durchgeführt. Die gelelektrophoretische Trennung der DNA-Fragmente erfolgte in 0,7 - 1,5%igen Agarosegelen in Flachbettgelapparaturen mit 1x TAE-

Puffer. Die entsprechende Agarosemenge wurde in 1x TAE-Puffer suspendiert, in einem Mikrowellenherd und vor dem Einfüllen in den Gelträger mit 5 μ l Ethidiumbromidlösung (10mg/ml) pro 100ml Agaroselösung versetzt.

Die zu analysierenden Proben wurden vor dem Auftrag mit 1/6 Volumen DNA-Ladepuffer versetzt und durchmischt. Die Elektrophorese erfolgte für 3-6 h bei 60 - 100 V oder über Nacht bei 30 V. Anschließend wurde das Gel im durchscheinenden UV-Licht unter Verwendung eines UV-Filters fotografiert.

Zur Größenbestimmung der DNA-Fragmente diente ein Gemisch von Plasmid- bzw. Pagenvektor DNA-Fragmenten bekannter Größen, welches neben den zu bestimmenden DNA-Fragmenten gelelektrophoretisch aufgetrennt wurde. Es wurde *pUC18*-DNA, mit der Restriktionsendonuclease *Sau 3A* hydrolysiert sowie λ -DNA, mit HindIII bzw. HindIII/ EcoRI hydrolysiert, eingesetzt.

2.2.6 Elution von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

2.2.6.1 Elektroelution

Nukleinsäuren werden bei dieser Methode aufgrund ihrer Ladung aus dem Gel eluiert. Die Elutionskammer wurde mit 1 x TAE Puffer, die V-förmigen Kanaltaschen mit 3 M NaAc Lösung befüllt und die Agarosestücke mit den enthaltenen DNA-Fragmenten in die hierfür vorgesehenen Taschen plaziert. Die Elektroelution erfolgte bei 90 V für 45 min. Aufgrund des angelegten Spannungsfelds wandert die DNA in Richtung der Anode. In dem V-förmigen Kanalweg nimmt die Leitfähigkeit durch die hohe Natriumacetat Konzentration stark zu, so daß die Spannung abfällt und die DNA im Kanal verbleibt. Anschließend wurde die in der NaAc-Lösung befindliche DNA durch Zugabe des 2,5fachen Volumens an Ethanol präzipitiert.

2.2.7 Klonierung von DNA

2.2.7.1 Ligation von DNA-Fragmenten

Die Ligation von DNA-Fragmenten erfolgte mittels T4-DNA-Ligase in zuvor entsprechend hydrolysierte und dephosphorylierte Plasmidvektoren. PCR-Produkte wurden nach Elution aus dem Agarosegel in den *pGEM-T* Vektor (Promega) ligiert.

Die zur Ligationsreaktion eingesetzte Menge an Plasmid-DNA betrug 20 - 200 ng, die DNA-Fragmente wurde im äquimolaren Verhältnis dem Reaktionsgemisch zugesetzt. Die Reaktion erfolgte mit 10 U T4-Ligase im entsprechenden Reaktionspuffer in 10 µl Ansätzen bei 16°C über Nacht oder bei RT für 2 Stunden.

2.2.7.2 Herstellung von PEG-transformationskompetenten *E.coli* Zellen

Transformationskompetente Zellen wurden nach einer von Nishimura und Mitarbeitern (1990) beschriebenen Methode hergestellt.

Aus einer 5 ml Übernachtskultur des *E.coli*-Stammes *XL-Blue* wurden 500 µl Zellsuspension entnommen, zum Animpfen in 50 ml Medium A überführt und im Kulturschüttler bei 37°C und 180 rpm solange inkubiert bis eine optische Dichte von 0,55 A₅₇₈-E erreicht war. Daraufhin wurde die Kultur 10 min mit Eis gekühlt und zur Sedimentation der Zellen 10 min bei 1500 g und 4°C zentrifugiert. Das Zellsediment wurde in 500 µl eiskaltem Medium A resuspendiert, mit 2,5 ml Lösung B vorsichtig vermischt und in Aliquots zu 100 µl bei -80°C gelagert.

- Medium A: 10 mM MgSO₄; 0,2% Glucose in LB-Medium
- Lösung B: 36% Glycerin; 12% PEG 8 000; 12 mM MgSO₄ in LB-Medium

2.2.7.3 Transformation von *E. coli*-Zellen mit Plasmiden

Der als Transformation bezeichnete Vorgang besteht in der Einschleusung von Ligationsprodukten in zu diesem Zweck vorbehandelte Bakterienzellen. Diese transformationskompetenten Zellen besitzen eine in gewissem Maße durchlässige Zellwand. Der Transfer von Ligationsprodukten in Bakterienzellen ermöglicht die Reduplikation der in die Plasmidvektoren eingebrachten DNA-Fragmente durch die Kultivierung des transformierten Bakterienklons.

Zur Transformation wurden 100 µl PEG-transformationskompetente Zellen (2.2.9.2) in Eis aufgetaut, mit 5 µl (10-100 ng) des Ligationsansatzes versetzt und für 15-30 min im Eis belassen. Daraufhin wurden die Zellen für 1 min bei 42°C inkubiert, für 1-2 min in Eis gestellt, mit 1 ml LB-Medium versetzt und eine Stunde bei 37°C inkubiert. Die Transformationsansätze wurden dann unter Zugabe von 40 µl IPTG (0,1 M in bidest. H₂O) sowie 40 µl X-Gal (2% in Dimethylformamid) auf LB-Amp-Agarplatten ausplattiert. Die

Inkubation der Agarplatten erfolgte über Nacht im Brutschrank bei 37°C. Die Plasmid-DNA rekombinanter Zellkolonien wurden zu analytischen Zwecken entsprechend Punkt 2.2.11.1 isoliert.

2.2.8 Kultivierung von *E. coli*-Stämmen und Klonen

Zur Herstellung einer Vorkultur wurden 5 ml LB-Medium bzw. LB-Amp.-Medium mit einer vereinzelt *E. coli* - Zellkolonie oder mit 10 µl einer entsprechenden Dauerkultur beimpft und unter Schütteln über Nacht bei 37°C inkubiert. Für das Anlegen von Dauerkulturen wurde 1 ml einer Übernachtskultur mit 1 ml Glycerin versetzt und durch Schütteln auf einem Labormixer vermischt. Die Lagerung der Dauerkultur erfolgte bei -80°C.

2.2.9 Präparation von Plasmid-DNA

2.2.9.1 Midi-Präparation von Plasmid-DNA

Zum Zwecke der DNA Vermehrung, wurde die Plasmid-DNA mittels Midi-Präparationskit (Qiagen/Hilden) aus 150 ml Bakterienkulturen isoliert. Die Durchführung richtete sich nach der Herstelleranleitung.

2.2.10 Sequenzierung doppelsträngiger DNA

Die Verwendung fluoreszenzmarkierter Nukleotide bietet die Möglichkeit, bei Einsatz unterschiedlicher Farbstoffe für jedes der vier dNTP's und Auftrennung der Sequenzierprodukte in einem entsprechenden Fluoreszenzsequenziergerät, die Reaktion in einem Ansatz durchzuführen, wie dies bei dem hier verwendeten "Cycle-Sequencing" System der Fall ist. Ein weiterer Vorteil dieser Methode ist, daß eine geringe Menge an DNA zur Sequenzierung eingesetzt werden kann. Dies kann z.B. für die Sequenzierung von PCR-Produkten, ohne eine vorherige Subklonierung in einen Vektor, von Vorteil sein.

Zum "Cycle Sequencing" wurden jeweils 0,2 - 0,5 µg, der Plasmid-DNA in die Reaktion eingesetzt. Als Sequenzierprimer wurden die Universalprimer T3, T7 und Sp6 entsprechend des zur Klonierung verwandten Plasmids bzw. sequenzspezifische Oligonukleotide, welche

von bekannten Sequenzbereichen der zu sequenzierenden DNA abgeleitet worden waren, verwandt.

“CycleSequencing”-Reaktion

Terminatoren “Ready Reaction Mix”	4,071
Plasmid-DNA (0,2 µg/ µl)	1,5 - 2,5 µl
Primer	57µmol
bidest. H ₂ O	<u>x71</u>
Gesamtvolumen	1271

Die Reaktionen erfolgten in dem Perkin Elmer Cetus Cycler "Gene Amp PCR-System 9600". Es wurden 25 Zyklen durchgeführt, die Annealingtemperatur variierte je nach T_m der eingesetzten Primer zwischen 50° und 60°C. Die Extension erfolgte bei 60°C für 2 min, die Denaturierung für 30 sec bei 95°C. Anschließend wurden die Amplifikationsprodukte mit Ethanol präzipitiert und entsprechend Herstelleranleitung in der Sequenzieranlage (Abi PrismTM 310 Genetic Analyzer; Perkin Elmer) aufgetrennt.

2.2.11 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Durch die “Polymerase Chain Reaction” (PCR) können spezifische DNA-Fragmente *in vitro* enzymatisch exponentiell amplifiziert werden. Für die PCR wird die Eigenschaft von DNA-Polymerasen ausgenutzt einen DNA-Strang komplementär zu einem Matrix-Strang zu synthetisieren, sofern ihnen ein kurzer, doppelsträngiger Bereich als "Primer" zur Verfügung steht. Die Verwendung von aus dem Bakterium *Thermus aquaticus* stammender hitzestabiler DNA-Polymerase (Taq-Polymerase), von Saiki und Mitarbeitern (Saiki et al., 1988) beschrieben, ermöglichte eine Automatisierung der Reaktion durch Einsatz von sogenannten Thermocyclern (PCR-Thermal-Cycler).

In die Reaktion werden zwei spezifische, synthetisch hergestellte Oligonukleotide (Primer), die zu jeweils einem der beiden Stränge der Matrizen-DNA komplementär sind und die zu amplifizierende Sequenz einschließen, eingesetzt.

2.2.11.1 RT-PCR

Die RT-PCR ist eine hochempfindliche Methode und wurde zum Nachweis spezifischer mRNA-Moleküle nach vorheriger reverser Transkription eingesetzt.

• DNaseI-Behandlung von RNA:

Genomische Kontaminationen in den RNA-Präparationen wurden durch Inkubation mit DNaseI entfernt. Hierzu wurde die RNA mit 5 μ l 5 x AMV-RT-Puffer, 0,7 μ l RNasin (40U) und 1,5 U RNase freier DNaseI in einem Volumen von 25 μ l für 30 min bei 37°C inkubiert. Der Ansatz wurde daraufhin mit Chloroform und nachfolgend mit Chloroform extrahiert und die RNA mit Glycogen als Träger durch Zugabe von 1/10 Volumen 3M NaAc pH6,0 und 3 Volumen Ethanol präzipitiert, durch Zentrifugation sedimentiert und das Pellet in bidest. H₂O resuspendiert.

• cDNA Erststrangsynthese:

Die Synthese einzelsträngiger, zur mRNA komplementärer DNA (cDNA) erfolgte unter Einsatz von 2 μ g gesamt RNA bzw. 100 ng mRNA, welche zuvor mit DNaseI zur Entfernung möglicher genomischer Kontaminationen behandelt wurden war (siehe oben).

Der Anteil der spezifischen, wie auch der vor Erreichen des 5'-Endes der mRNA abgebrochenen cDNA-Syntheseprodukte wird durch die Reaktionstemperatur und die Qualität der verwendeten Reversen Transkriptase beeinflusst. RNA bildet zudem Sekundärstrukturen aus, so daß der Zeitraum zwischen Denaturierung und reverser Transkription möglichst kurz sein sollte. Sekundärstrukturen führen ebenfalls zum vorzeitigen Abbruch der cDNA-Synthese. Die RNA wurde in einem Gesamtvolumen von 13 μ l bidest. H₂O mit 0,5 μ g oligo-dT Primer (oder Random-Primer) für 5 min bei 70°C zur Auflösung von Sekundärstrukturen inkubiert und anschließend für 10 min bei RT abgekühlt. Hierbei hybridisiert der Primer an die poly(A)-Schwänze der mRNA. Spezifische Erststrangsynthesen erfolgten unter Einsatz von 5 pmol des jeweiligen genspezifischen Primers. Die reverse Transkription erfolgte durch die Zugabe von 5 μ l 5x konzentriertem AMV-Puffer, 2,5 μ l DTT, 2,5 μ l 10 mM dNTP-Mix, 0,7 μ l (40 U/ μ l) RNase-Inhibitor (RNasin; 25 U gesamt), 0,7 μ l bidest. H₂O und 0,6 μ l [23 U/ μ l] Avian-Myeloblastosis-Virus-Reverse-Transkriptase (AMV-RT) und Inkubation für 60 - 120 min. Anschließend wurde die Reverse Transkriptase durch 15 min Inkubation bei 70°C hitzeinaktiviert. Vor dem Einsatz in die PCR wurde der Ansatz mit 75 μ l bidest. H₂O verdünnt.

- AMV-Puffer: 250 mM Tris-HCl, pH 8,3 bei 42 °C; 250 mM KCl; 50 mM MgCl₂; 2,5 mM Spermidin

- dNTP-Mix: je 10 mM dATP, dTTP, dGTP, dCTP

• Amplifikation von cDNA-Fragmenten:

Die Amplifikationsreaktionen erfolgten in einem PCR-Gerät der Firma Hybaid. Die Volumina der PCR-Ansätze betragen, je nach gewünschten Fragmentausbeuten, 25 bzw. 50 μ l. Die Endkonzentration der dNTPs im Reaktionsgemisch wurde auf 200 μ M, die der Primer auf 10 pM eingestellt. Die Reaktion wurde in 1x Reaktionspuffer mit 1 U Taq-Polymerase durchgeführt. Die Menge an eingesetztem Template wurde variiert, wenn in einer ersten PCR-Reaktion ausgehend von 1 μ l des Erstrangansatzes (entsprechend 2 ng revers transkribierter mRNA) keine spezifischen Produkte amplifiziert werden konnten.

Die während der PCR-Reaktionen einzustellende Annealingtemperatur (T_{an}) variierte je nach Länge und Sequenz der eingesetzten Primer und wurde angenähert nach folgender Formel berechnet:

$$T_{an} = 4 \times (G + C) + 2 \times (A + T) - (5 - 10)$$

Die Schmelztemperaturen beider Primer eines eingesetzten Primerpaares sollten hierbei möglichst nahe beieinander liegen. Der G/C-Gehalt der Primer betrug 45 - 60%, wobei G und C möglichst gleichmäßig über die gesamte Sequenz verteilt waren. Die Primer wurden, soweit dies möglich war, entsprechend konzipiert.

Die Extension erfolgte bei 74°C. Die Extensionszeiten wurde auf 1 min eingestellt. Die Denaturierung der Target-DNA erfolgte für 30 sec bei 95°C. Das Programm des PCR-Cyclers wurde auf maximal 40 Zyklen eingestellt.

Zur Vermeidung von Kontaminationen des PCR-Ansatzes mit Fremd-DNA wurden alle Arbeiten mit Einmalhandschuhen durchgeführt, alle verwendeten Gefäße, Lösungen und Pipettenspitzen autoklaviert und die Lösungen in Portionen aufbewahrt.

Um etwaige Kontaminationen der Lösungen feststellen zu können, wurden Negativkontrollen durchgeführt. Hierbei wurden alle Komponenten außer der Target-DNA zur Reaktion eingesetzt. Um den Fehlerbereich bei einem negativen PCR-Verlauf eingrenzen zu können, erwies sich auch das Durchführen einer Positivkontrolle als sinnvoll. Die Überprüfungen der cDNA - Erstrangsynthese erfolgte in einer PCR-Reaktion unter Einsatz von Primern der GAPDH (GAPDH for und GAPDH back), welche ein 294 bp langes Fragment ergab.

2.2.12 Transfer von Nukleinsäuren auf Nylonmembranen

2.2.12.1 Transfer von DNA (Southern-Blotting)

Die Durchführung des DNA-Transfers auf Polyamidmembranen richtete sich nach der von Ausubel und Mitarbeitern (Ausubel et al., 1992) beschriebenen Anleitung. Nach gelelektrophoretischer Auftrennung der DNA-Fragmente entsprechend Punkt 2.2.5.1 wurde die im Agarosegel befindliche DNA zunächst 10 min in 0,45% HCl-Lösung depuriniert und anschließend mittels 0,4 M NaOH über Nacht auf eine positiv geladene Polyamidmembran transferiert. Die Membran wurde kurz in 2xSSC gewaschen und anschließend die DNA mit UV-Licht (UV-Stratalinker, Stratagene) fixiert. Die Membranen wurden dann in 0,1xSSC/0,5%SDS-Lösung bei 65°C für 1 h unter Schütteln inkubiert und konnten daraufhin zur Hybridisierung eingesetzt werden.

2.2.13 Markierung von Nukleinsäuren

2.2.13.1 Radioaktive Markierung von DNA-Fragmenten

Die radioaktive Markierung von DNA-Fragmenten erfolgte entsprechend der Methode des "Random-Priming" (Feinberg und Vogelstein, 1984). Diese Methode beruht auf der Hybridisierung einer Mischung von Hexanukleotiden aller möglichen Basensequenzen ("Random Primer") an die zu markierende DNA. Der komplementäre Strang wird hierbei von den 3' Enden der Random Primer unter Einbau der als Substrat mitangebotenen modifizierten Desoxyribonukleosid-5'-triphosphate ($[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$ markiert) von der DNA-Polymerase (Klenow-Fragment) synthetisiert. Die Länge der erhaltenen Fragmente ist abhängig von der Inkubationszeit des Reaktionsansatzes.

Für diese Markierungsexperimente wurde das Multiprime System der Firma Amersham (Braunschweig) verwandt. Es wurden 50 ng DNA und je 50 μCi $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$ dCTP für das "Random-Priming" eingesetzt. Die Reaktion erfolgte gemäß Herstellerangaben für 2h bei 37°C.

Anschließend wurde die markierte DNA mit Ethanol gefällt, das Präzipitat nach Zentrifugation 2x mit 70% EtOH gewaschen, getrocknet und in 100 μl TE-Puffer resuspendiert.

2.2.13.2 *In vitro* Transkription zur Synthese von RNA-Proben

Die Synthese von RNA-Sonden, welche in *in situ* und *whole mount* Hybridisierungen eingesetzt wurden, erfolgte durch *in vitro* Transkription. Das System der *in vitro* Transkription von RNA-Hybridisierungsproben verwendet RNA-Polymerasen der Bakteriophagen T3, T7 (*E.coli*) oder SP6 (*Salmonella*) in Gegenwart von Ribonukleotiden. Das DNA-Fragment von dem ein *in vitro* Transkript erstellt werden soll, muß zuvor in die multiple Klonierungsstelle des entsprechenden Vektors stromabwärts der spezifischen Phagenpromotoren kloniert werden. Vor dem Einsatz des rekombinanten Plasmids in der Transkriptionsreaktion wird dieses durch Hydrolyse mit Restriktionsendonukleasen an der Stelle gespalten, an der die Transkriptionsreaktion stoppen soll.

Jeweils 50 µg der jeweiligen (Punkt 2.1.8) cDNA Konstrukte wurden in einem Reaktionsansatz von 100 µl Gesamtvolumen enzymatisch gespalten. Die linearisierten Plasmide wurden dann mittels Ethanol präzipitiert und das Sediment in bidest. H₂O in einer Konzentration von 1 µg DNA/µl gelöst.

• Markierung von RNA mit Digoxigenin

Zur Herstellung der Probe wurde die Plasmid-DNA mit einem geeigneten Restriktionsenzym linearisiert und mit der entsprechenden RNA-Polymerase in der Gegenwart von Digoxigenin-markierten Ribonukleotiden synthetisiert.

Reaktionsansatz:

bidest. H ₂ O	13 µl	• 10xTranskriptionspuffer: 400 mM TrisHCl; pH 8,25; 60 mM MgCl ₂ ; 20 mM Spermidin
0,2M DTT	1 µl	
10xTranskriptionspuffer	2 µl	
Ribonukleotid-Mix	2 µl	• Ribonukleotid-Mix: 10 mM GTP; 10 mM ATP; 10 mM CTP; 6,5 mM UTP, 3,5 mM Digoxigenin-UTP
Linearisiertes Plasmid	1 µg	
RNase-Inhibitor	50 U	
RNA-Polymerase (T3, bzw. T7)	10 U	
Gesamtvolumen	20µl	

Der Ansatz wurde für 2-3 h bei 37°C inkubiert, nach der Synthesereaktion mit 2 µl Ribonuklease-freier DNaseI (10 U) zur Degradation der Plasmid-DNA versetzt und 15 min bei 37°C inkubiert. Das Volumen des Ansatzes wurde mit TE auf 100 µl erhöht, die RNA

unter Zugabe von 10 μ l 4 M LiCl und 300 μ l EtOH präzipitiert, pelletiert und in 100 μ l TE-Puffer oder bidest. H₂O resuspendiert. Anschließend wurde ein Aliquot des Ansatzes zur Überprüfung der Effizienz der Probensynthese im Agarosegel aufgetrennt. Bis zur Verwendung wurde die Probe bei -20°C gelagert.

2.2.14 Hybridisierungstechniken

2.2.14.1 Hybridisierung membrangebundener Nukleinsäuren

Die Hybridisierung von membrangebundenen Nukleinsäuren mit radioaktiv markierten DNA-Fragmenten bzw. Oligonukleotiden variierte je nach Anwendung. Hierbei richtete sich die während der Hybridisierungsreaktion einzustellende Temperatur nach den zu erwarteten Sequenzhomologien zwischen Gensonde und den zu detektierenden Nukleinsäuren, Länge der Gensonde sowie Salz- und Formamidgehalt der Hybridisierungslösung.

Die Hybridisierung von Southern-Blots mit radioaktiv markierten DNA-Proben erfolgte unter Verwendung der Hybridisierungslösung I (Church-Puffer) bei 55° - 65°C. Zur Absättigung unspezifischer Nukleinsäurebindungsstellen auf dem Filter wurde zunächst eine Vorhybridisierung mit heterologer DNA durchgeführt. Hierzu wurde gelöste Heringsperma-DNA bei 95°C denaturiert, kurz auf Eis abgekühlt und der Hybridisierungslösung zugesetzt. Die Endkonzentration betrug 200 μ g/ml. Die Vorhybridisierung erfolgte für 1-4 h. Anschließend wurde die Hybridisierungslösung erneuert und die durch 5-minütige Inkubation bei 95°C denaturierte DNA-Probe zugegeben. Die optimale Aktivitätskonzentration lag bei 0,5 - 2x 10⁶ cpm/ml. Die Hybridisierung erfolgte für 8-24 h.

Nach der Hybridisierung wurden die Filter zunächst 4 x 15 min mit 0,04 M NaH₂PO₄/ 1% SDS bei 65°C gewaschen. Nach dem Waschvorgang wurden die noch feuchten Filter in Klarsichtfolie eingeschlagen und wie unter Punkt 2.2.15 beschrieben exponiert.

Zur erneuten Hybridisierung von Nylonfiltern, wurden die radioaktiven Proben durch Inkubation in einer 0,4 M NaOH-Lösung für 30 - 60 min bei 55°C entfernt. Anschließend wurde der Filter in einer Lösung aus 0,1x SSC/ 0,5% SDS/ 0,2 M Tris pH 7,5 neutralisiert, in Klarsichtfolie eingeschlagen und durch Exposition für 4-8 d auf vollständige Probenentfernung überprüft.

- Hybridisierungslösung I (genomische Southern-Blot-Analysen):
0,5 M NaH₂PO₄ (pH 6,6); 1 mM EDTA pH 8,0; 7% SDS

- Hybridisierungslösung II (Oligonukleotidhybridisierungen):
6x SSC; 5x Denhardts; 50 mM NaH₂PO₄ (pH 6,6); 0,1% SDS
- Hybridisierungslösung III (Hybridisierung von Northern-Blots und Replicafiltern):
6x SSC bzw. SSPE; 5x Denhardts-Lösung; 20-50% Formamid; 10 mM NaH₂PO₄ (pH 6,6);
0,1% SDS

2.2.14.2 *Whole mount in situ* Hybridisierung von Embryonen

Die hier angewandte Methode wurde im Labor von David Wilkinson für Maus *whole mount* Analysen entwickelt (Wilkinson D., 1992). Die *whole mount* Methode beruht auf der Hybridisierung einer Digoxigenin-markierten antisense RNA-Probe mit dem zu detektierenden endogenen RNA-Template. Die RNA-Hybride werden anschließend mit einem Antikörper gegen Digoxigenin detektiert. Für die Hybridisierung wurden 10 μ l der zuvor mit Digoxigenin markierten antisense RNA-Probe eingesetzt (2.2.13.2).

Die in 4% Paraformaldehyd über Nacht fixierten Embryonen wurden zunächst schrittweise in 100% Methanol überführt und bis zum Zeitpunkt der Analyse bei -20°C gelagert. Vor der Hybridisierung wurden die Embryonen schrittweise rehydriert. Die Inhibition endogener Peroxidasen erfolgte durch einstündige Inkubation in 6% Wasserstoffperoxid und ein dreimaliges Waschen in PBT. Um der Probe einen besseren Zugang zu ermöglichen, schloß sich ein 15-minütiger Verdau in 10 μ g/ml Proteinase K an. Nach zweimaligem Waschen in Glycinlösung (2 mg/ml) erfolgte eine erneute Fixierung in 0,2% Glutaraldehyd und 4% Paraformaldehyd. Nach dieser Vorbehandlung der Embryonen schloß sich die Prähybridisierung bei 70°C an. Nach einer einstündigen Prähybridisierung erfolgte die eigentliche Hybridisierung bei 70°C mit 1 μ g der markierten Probe/ml Hybridisierungslösung über Nacht.

Nach dem Entfernen der Hybridisierungsprobe folgen mehrere Waschschritte, um die unspezifisch oder nicht gebundenen RNA Transkripte zu entfernen. Durch Zugabe von RNase A in Lösung 2 (100 μ g/ml) bei 37°C wird sämtliche nicht gebundene, d.h. einzelsträngige RNA verdaut. Durch das Waschen in Lösung 3 bei 65°C sollen die durch die Hydrolyse der unspezifischen RNA Stränge entstandenen Bruchstücke ausgewaschen werden.

An die Hybridisierung schlossen sich folgende Waschschr itte an:

Lösung	Zeit	Temperatur
2 x Lösung 1	30 min	70°C
1 x Lösung 1/2 (1:1)	10 min	70°C
3 x Lösung 2	5 min	RT
2 x RNase A in Lösung 2 (E.K. 100 µg/µl)	30 min	37°C
1 x Lösung 2	5 min	RT
1 x Lösung 3	5 min	RT
2 x Lösung 3	30 min	65°C
3 x TBST	5 min	RT

Nach den Waschschr itten, vor der Inkubation mit dem Phosphatase gekoppelten Antikörper, erfolgte eine Absättigung gewebeeigener Antigene in 10% Schafserum/TBST für 60-90 min. Das Schafserum wurde kurz vor der Verwendung durch 30-minütige Inkubation bei 70°C inaktiviert.

Während dieses Abs ttigungsschrittes wurde der Antikörper vorbereitet. Die Abblockung unspezifischer Bindungsstellen erfolgte durch Inkubation mit Maus-Embryopulver, das aus E12,5 - E14,5 Embryonen, in Aceton homogenisiert, getrocknet und zerkleinert, gewonnen wurde. Für 2 ml Antikörper-Lösung wurden 3 mg Embryopulver mit 0,5 ml TBST für 30 min auf 70°C erhitzt und anschließend eine Stunde bei 4°C unter kontinuierlichem Schütteln zusammen mit 1 µl Digoxigenin-Antikörper (Fab-Fragmente; Boehringer, Mannheim) inkubiert. Nach 10-minütiger Zentrifugation wurde der den abgeblockten Antikörper enthaltende Überstand abgenommen und mit 1%igem Schafserum in TBST auf ein Volumen von 2 ml aufgefüllt. Die Inkubation mit dem Antikörper erfolgte danach bei 4°C über Nacht.

Die sich anschließenden Wasch- und Inkubationsschritte wurden bei Raumtemperatur durchgeführt.

Lösung	Zeit
TBST	3x 5 min
TBST	5x 60 min
NTMT	3x 10 min

An diese Waschschr itte schloß sich die Alkalische-Phosphatase-Färbereaktion mit 4,5 µl NBT und 3,5 µl BCIP (X-Phosphat) in NTMT an. Die Färbung erfolgte bei Raumtemperatur und bei mäßiger Bewegung. Nach 1-2 Stunden war die spezifische Färbereaktion gewöhnlich

beendet. Die Reaktion wurde daraufhin durch mehrmalige Zugabe von PBT beendet. Die angefärbten Embryonen wurden ggf. zur weiteren Analyse eingebettet und mittels Vibratom oder Kryotom geschnitten.

Lösungen:

- PBT: PBS, 0,1% Tween-20
- Prähybridisierungs-, Hybridisierungs-Lösung: 50% Formamid; 5x SSC pH 4,5; 50 $\mu\text{g/ml}$ t-RNA; 1% SDS; 50 $\mu\text{g/ml}$ Heparin
- Lösung 1: 50% Formamid; 5xSSC; pH 4,5; 1%SDS
- Lösung 2: 0,5M NaCl; 10 mM TrisHCl pH 4,7; 0,1% Tween-20
- Lösung 3: 50% Formamid; 2xSSC pH 4,5.
- 10xTBST (100ml): 8g NaCl; 0,2g KCl; 25ml 1M TrisHCl pH 7,5; 10ml 10% Tween-20
Kurz vor der Benutzung wurden, zur Inhibition endogener Phosphatasen, 0,028 g/ 50 ml Levamisol zugesetzt.
- NTMT: 100 mM NaCl; 100 mM TrisHCl pH 9,5; 50 mM MgCl₂; 0,1% Tween-20
Kurz vor der Benutzung wurden 0,028 g/50 ml Levamisol zugesetzt.

2.2.14.3 Whole mount *in situ* Hybridisierung auf Gewebeschnitten.

Grundsätzlich erfolgte die Vorbereitung, Hybridisierung und Anfärbung der Schnitte wie unter Punkt 2.2.14.2.

Aufgrund der leichteren Zugänglichkeit für die markierte RNA Probe bei Gewebeschnitten (Schnittdicke 10-50 μm), war die Behandlung mit Proteinase K und das anschließende Abstoppen der enzymatischen Reaktion mit Glycin sowie die Refixierung mit PFA/Glutaraldehyd nicht notwendig. Die Prähybridisierung und Hybridisierung der Objektträger erfolgte ebenfalls bei 70°C in einer feuchten Kammer (in die Kammer wurde ein mit Formamid getränktes Tuch gelegt). Pro Objektträger wurden 100-200 μl Hybridisierungslösung gegeben. Auf die Objektträger wurde jeweils ein Deckgläßchen gelegt. Nach der Hybridisierung erfolgten die gleichen Waschschrte wie unter Punkt 2.2.14.2. Die Antikörper-Inkubation erfolgte ebenfalls über Nacht in einer feuchten Kammer bei 4°C. Nach den entsprechenden Waschschrten schloß sich die Alkalische-Phosphatase-Färbereaktion mit NBT und BCIP (X-Phosphat) in NTMT an. Die Farbreaktion wurde bei den Gewebeschnitten auf 1-2 Tage verlängert. In dieser Zeit wurde die Färbelösung mehrmals ausgetauscht.

2.2.15 Autoradiographie

2.2.15.1 Autoradiographie von hybridisierten Membranen

Die nach Hybridisierung erhaltenen Filter (2.2.14.1) wurden in lichtundurchlässigen Kassetten mit einem plan aufliegenden Film exponiert. Die Expositionszeit und Temperatur (RT bzw. -80°C) richtete sich nach der mit einem Geiger-Zählrohr grob gemessenen Aktivität des Filters. Bei Southern-Blots wurden üblicherweise empfindliche Kodak-Filme (Kodak X-AR5) verwendet. Die Expositionszeiten variierten zwischen 15 min und 14 Tagen.

2.2.16 Präparation von Embryonen und Geweben

2.2.16.1 Präparation von Embryonen

Die Trächtigkeitsperiode wurde durch die Vaginal-Plug Methode bestimmt. Das Datum, an dem nach der Verpaarung ein mucoider Plug in der Vagina der Maus beobachtet werden konnte, wurde als Embryonalentwicklungstag 0,5 bezeichnet und hiervon ausgehend der Termin für die Entnahme der Embryonen errechnet. Die trächtige, weibliche Maus wurde durch zervikale Dislokation getötet. Die Bauchdecke des Tieres wurde durch einen medianen Schnitt geöffnet und die zwei Uteri entfernt. Die Embryonen wurden in kaltem PBS aus den Uteri herauspräpariert und im Anschluß zur Fixierung in eine 4%ige Paraformaldehyd-PBS-Lösung überführt.

2.2.16.2 Kardiale Perfusion mit PFA.

Bei der Isolierung größerer Gewebe reicht eine passive Fixierung mit 4%PFA über Nacht nicht aus. Um eine ausreichende Fixierung der Gewebe zu gewährleisten, wurde das Fixierungsmittel mittels kardialer Perfusion in die Gewebe eingeführt. Die Mäuse wurden hierzu zunächst mit Avertin anästhesiert. Es wurden 0,015 ml einer 2,5%igen Stammlösung pro g Körpergewicht eingesetzt. Nach Anästhesie erfolgte die Öffnung des Brustkorbs der Maus. Danach wurde mit einer Kanüle in die linke Herzkammer gestochen und eine kalte 1xPBS Lösung perfundiert (50ml). Nach der PBS-Perfusion folgte die Perfusion mit kaltem 4%PFA (50ml). Danach wurden die entsprechenden Gewebe isoliert.

2.2.17 Histologische Methoden

2.2.17.1 Vibratomschnitte

Vibratomschnitte wurden wie bei Bober und Mitarbeitern (Bober et al., 1994) beschrieben durchgeführt. Die zu schneidenden Embryonen wurden in Gelatine/Albumin - Blöcken eingebettet und mit einem Vibratom (VT 1000 E; Leica) in einer Schnittdicke von 30 - 100 μm geschnitten.

Alternativ zu der Gelatine/Albumin Einbettung, wurden Gehirne in 2% Agarose/PBS eingebettet.

2.2.17.1.1 Gelatine/Albumin Einbettung

- Gelatine/Albumin Suspension

Es wurden 0.049 g Gelatine in 100 ml PBS unter Erhitzen gelöst. Nach Abkühlen der Gelatine wurden 30 g Hühnereiweiß (Sigma) unter rühren zugefügt. Nach Zugabe von 20 g Sukrose wurde die Mischung aliquotiert und bei -20°C eingefroren.

- Einbettungsvorgang:

Es wurden flexible Formen mit Einbettungsmulden von ca. 0,6 x 1,2 cm Größe verwandt. Pro einzubettendem Embryo wurden 200 μl der Gelatine in einer Mulde vorgelegt und mit 20 μl 25%iges Glutaraldehyd vermischt. Der Embryo wurde in der Gelatine entsprechend plaziert und vor dem Aushärten der Mischung mit 200 μl Gelatine welche mit 20 μl Glutaraldehyd vermischt worden war, bedeckt. Nach Aushärtung wurden die Blöcke aus der Form gedrückt und bis zum Schneiden in Kunststoffolie oder PBS einige Tage bei 4°C aufbewahrt.

2.2.17.1.2 Agarose Einbettung – „freischwimmende Schnitte“

Diese Einbettungsmethode wurde vorallem zum Einbetten adulter Mausgehirne verwendet. Nach Perfusion und Isolierung der Gehirne, erfolgte zunächst eine weitere Fixierung in 4%PFA/PBS über Nacht bei 4°C .

Zum Einbetten wurde eine 2%ige Agarose/PBS Lösung bis auf ca. 40°C abgekühlt. Die Gehirne wurden in den Einbettungsformen (Größe ca. 2cm^3 aus Plastik, Firma Plano) positioniert und dann mit der Agarose-Lösung überschichtet. Nach dem Aushärten der Agarose können die Blöcke einige Tage bis zur weiteren Verwendung in PBS gelagert werden.

Das Schneiden mit dem Vibratom erfolgte bei einer Schnittdicke von $50\mu\text{m}$. Die Schnitte wurden von der umgebenden Agarose befreit und einzeln in 24 Well Schalen in 1xPBS bei 4°C gelagert.

2.2.17.2 Paraffin-Gewebeschnitte

Die einzubettenden Embryonen und Gewebe wurden in PBS präpariert und über Nacht bei 4°C in 4%iger Paraformaldehyd/PBS Lösung fixiert. In zwei anschließenden 30-minütigen Inkubationsschritten in PBS bei 4°C wurde das Paraformaldehyd entfernt. Zur Behandlung von Geweben, welche *in situ* hybridisiert werden sollten, wurde der zweite Waschschrift in 0.85% NaCl durchgeführt. Die Dehydratisierung der Gewebe erfolgte in einer aufsteigenden Ethanolreihe in destilliertem H_2O , beginnend mit 50% (für die *in situ* Hybridisierung wurde hier der Wasseranteil durch 0.85%iges NaCl ersetzt), dann 2 x 70%, 85%, 95% und 2 x 100% (jeweils 30 min). Zur Entfernung des Ethanols aus dem Gewebe wurden zwei 30-minütige Schritte in Xylol durchgeführt. Die Überführung der Gewebe in das Paraffin fand bei 60°C im Trockenschrank über einen Zwischenschritt (45 min 50% Xylol/Paraffin) statt. Hierfür wurden das Paraffin zuvor geschmolzen und das Xylol sowie die Gefäße vorgewärmt. Das Paraffin wurde mindestens zweimal gewechselt, zunächst nach einer Stunde, dann nach Einwirkung über Nacht am nächsten Tag 1 - 2 h vor der Einbettung in Metallformen. Durch langes Waschen in Paraffin können unspezifische Hintergrundsignale bei *in situ* Hybridisierungen reduziert werden.

Die Gewebe wurden im folgenden unter Verwendung eines Heizblockes in Metallformen eingebettet. Nach entsprechender Ausrichtung des Gewebes im flüssigen Paraffin wurden die Formen auf Eis gestellt. Die Paraffinblöcke wurden anschließend aus der Metallform isoliert zur vollständigen Aushärtung über Nacht bei Raumtemperatur belassen. Bis zur weiteren Verwendung erfolgte die Lagerung bei 4°C .

Das Schneiden der Gewebe-Paraffinblöcke erfolgte mit einem Mikrotom der Firma Leica. Es wurden Schnitte im Bereich von $4\text{-}15\mu\text{m}$ angefertigt. Hierzu war es erforderlich die Objektträgern zu beschichten, um eine bessere Anheftung der Gewebeschnitte zu gewährleisten. Die Beschichtung erfolgte in einer Lösung aus 7 ml Vectabond-Reagenz und 343 ml Aceton. Die Objektträger wurden in entsprechenden Haltern zunächst in Aceton gereinigt und kurz getrocknet. Im Anschluß wurden diese für 5 min in das oben beschriebene Reagenz überführt, dreimal für 30 Sekunden in destilliertem H_2O gespült und bei 37°C in einem Inkubationsschrank getrocknet.

2.2.17.3 Kryotomschnitte.

Die einzubettenden Embryonen und Gewebe wurden in PBS präpariert und über Nacht bei 4°C in 4%iger Paraformaldehyd/PBS Lösung fixiert. In zwei anschließenden 30-minütigen Inkubationsschritten in PBS bei 4°C wurde das Paraformaldehyd herausgewaschen. Zur Kryoprotektion wurden die Gewebe in einer 30%igen Sukrose/PBS Lösung über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach dem Absinken der Gewebe erfolgte die Einbettung in OCT-Einbettungsmedium (Firma Polyscience). Das Einfrieren erfolgte auf Trockeneis. Die OCT Blöcke können für längere Zeit in Plastikfolie bei -20°C gelagert werden. Das Schneiden der OCT-Blöcke erfolgte mit einem Kryotom der Firma Leica. Es wurden Schnitte einer Dicke von 10-50µm angefertigt. Die Schnitte wurden ebenfalls auf beschichtete Objektträger gegeben. Nach Trocknung über Nacht bei Raumtemperatur, wurden die Schnitte bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

2.2.18 Hämatoxylin/Eosin-Färbung

Die Färbung von Paraffin-Gewebeschnitten mit Hämatoxylin/Eosin wurde nach einem Protokoll von Bancroft and Stevens (1990) durchgeführt. Die Objektträger der Gewebeschnitte wurden hierzu durch die folgenden Lösungen geführt:

Lösung	Zeit
Deparaffinierung in Xylol	10 min
Rehydrieren in einer absteigenden Ethanolreihe (2 x 100%, 95%, 85%, 70%, 50%, 30%)	jeweils 30 sec
Waschen in H ₂ O	30 sec
Färben in Hämalaun (nach MAYER, Merck)	10 min
Abspülen in H ₂ O	
Differenzieren in HCl-Alkohol (1% HCl in 70% EtOH)	
Abspülen in H ₂ O	
Bläuen in H ₂ O	10 min
Färben in 1%iger alkalischer Eosin-Lösung (1% in 70% EtOH + einige Tropfen Eisessig)	30 sec
Differenzieren in 70% EtOH	
Dehydrieren in aufsteigender Alkoholreihe	30 sec jeweils
Xylol Inkubation	5 min

Anschließend wurden die gefärbten Gewebeschnitte mit einem Deckgläschen mit Hilfe eines Schnelleindeckmittels (Entellan/Merck) verschlossen.

2.2.19 Immunhistochemische Anfärbung

In den letzten Jahren wurde ein Vielzahl von immunhistochemischen Methoden etabliert. Eine Möglichkeit Gewebe bzw. Gewebsschnitte mit spezifischen Antikörpern immunhistochemisch anzufärben bietet das sog. ABC System. Hier wird zunächst ein spezifischer Primärantikörper mit den entsprechenden Geweben inkubiert. Danach folgt eine Signalverstärkung mittels eines Anti-Spezies-Antikörpers. Dieser sog. 2. Antikörper ist mit dem Vitamin Biotin gekoppelt. Durch Zugabe einer Avidin gekoppelten Peroxidase kommt es zu einer weiteren Amplifizierung des Signals. Bei entsprechender Zugabe des Substrats wie 3´ 3´- Diaminobenzidin entsteht innerhalb der immunoreaktiven Bereiche ein brauner Niederschlag.

2.2.19.1 Vorbereitung für Paraffin und Kryotomschnitte

Die Paraffinschnitte wurden zunächst deparaffinisiert:

Deparaffinierung in Xylol	2x 5 min
Rehydrieren in einer absteigenden Ethanolreihe (2 x 100%, 95%, 85%, 70%, 50%, 30%)	jeweils 30s
Waschen in 1xPBS	2x 5 min

Zunächst erfolgt bei Kryotom- und Paraffinschnitten ein weiterer Fixierungsschritt mit 4%PFA/PBS auf den Schnitten für 2-24 h. Die immunhistochemische Anfärbung verläuft bei allen Präparaten gleich. Nach Fixierung folgt die Blockierung endogener Peroxidasen danach das Absättigen unspezifischer Bindungen sowie die eigentliche Antikörperhybridisierung über Nacht. Am nächsten Tag wird die Kopplung des 2.Antikörpers und die Inkubation des Avidin-Biotin-Peroxidase Komplexes durchgeführt (ABC-Reagenz Firma Vectastain). Nach diesen Inkubationsschritten erfolgt die Darstellung der Farbreaktion, mittels DAB.

2.2.19.2 Antikörperanfärbung

Grundsätzlich wurde die Anfärbung von Kryotom,- Paraffin,- und „freischwimmenden“ Schnitten (aus Punkt 2.2.17.1.2) nach dem gleichen immunhistochemischen Protokoll durchgeführt. Die in PBS gelagerten freischwimmenden Schnitte können ohne weitere Fixierung weiterbehandelt werden.

- Verwendete Puffer:

- Tag 1 Puffer: 1% BSA (Fraktion V, Sigma A-4503); 0,3% Triton X-100 in PBS

- Tag 2 Puffer: 0,3% BSA; 0,1% Triton X-100 in PBS

- ABC-Reagenz: (Vectastain Elite ABC-Reagenz) 1 Tropfen Lösung A + 1 Tropfen Lösung B in 20ml Tag 2 Puffer; 30 min vorher ansetzen.

- DAB Färbelösung: 1 Tablette (entspricht 10 mg) in 10ml 0,1M TRIS-HCL pH 7,2 lösen.

- Vorbereitung der Schnitte siehe Punkt 2.2.19.1
- Blockierung endogener Peroxidasen 0,5% H₂O₂ in PBS für 10 min
- Waschen 2x waschen in PBS für 5 min
- Absättigen unspezifischer Bindungen Tag 1 Puffer + 2% Serum (Spezies abhängig)
Inkubation für 20min – 1h
- Inkubation 1. Antikörper Tag 1 Puffer + 1. Antikörper; die Verdünnung ist abhängig vom jeweiligen Antikörper.
Inkubation über Nacht bei 4°C.
- Waschen 2x waschen mit Tag 2 Puffer 5 min
- Inkubation 2. Antikörper 2. Antikörper aus Vectastain Kit (1:600) in Tag 2 Puffer; Inkubation 1h Raumtemperatur
- Waschen 2x waschen mit Tag 2 Puffer
- Inkubation ABC-Reagenz ABC Reagenz 1:400 in Tag 2 Puffer verdünnen (siehe oben); Inkubation 1h RT
- Waschen 1x waschen mit Tag 2 Puffer
2x waschen mit 1xPBS
- Anfärbung mit DAB DAB Tablette lösen, filtrieren und Zugabe von 5µl H₂O₂
Inkubation 2-5 min / Anfärbung im Dunkeln
- Abstoppen der Farbreaktion 3x waschen mit PBS
- Optional: Gegenfärbung mit Hämatoxylin Siehe unter Punkt 2.2.18

- Eindeckeln - Einbettung in Entellan oder Mowiol

Die Einbettung mit Mowiol erfolgt mit hydratisierten Gewebeschnitten. Für die Einbettung mit Entellan müssen die Schnitte vorher dehydratisiert werden, kurz in Xylol inkubieren und danach in Entellan (Merck) eindeckeln.

2.2.21 β -Galaktosidase Anfärbung

Für die LacZ Färbung wurden Kryotomschnitte (Schnittdicke 10-50 μ m) verwendet. Nach Perfusion (siehe unter Punkt 2.2.16.2) mit 4%PFA wurden die Gewebe isoliert und in PBS gewaschen. Auf eine weitere Fixierung wurde bei der LacZ Färbung verzichtet, da bei einer längeren Fixierung die Farbreaktion deutlich schwächer ausfiel. Nach Kryoprotektion (Punkt 2.2.17.3) wurden die Gewebe in OCT Einbettungsmedium auf Trockeneis eingebettet. Die Schnitte wurden mit einem Kryostaten der Firma Leica angefertigt.

Für die Anfärbung wurden folgende Lösungen verwendet:

- Lösung A: 1xPBS (pH 7,5)
 - Lösung B: 0,2% Glutaraldehyd in Lösung A + 5mM EGTA und 2mM MgCl₂
 - Lösung C: 0,01% Natrium-Desoxycholat und 0,02% Nonident P-40 in Lösung A + 5mM EGTA und 2mM MgCl₂
 - Lösung D: 0,5mg/ml X-Gal, 10mM K₃[Fe(CN)₆] und 10mM K₄[Fe(CN)₆] in Lösung C
- Die Fixierungslösung wurde jeweils frisch angesetzt.
- Lösung D wurde nach der Anfärbung filtriert und bis zur weiteren Verwendung bei 4°C im Dunkeln gelagert.
- X-Gal Stocklösung: 50mg/ml in Dimethylsulfoxid oder Dimethylformamid. Bei -20°C lagern.
- K₃[Fe(CN)₆] und K₄[Fe(CN)₆] werden als 0,5M Stocklösungen im Dunkeln bei 4°C gelagert.

Anfärbung

- Waschen:
- Präparierte Embryonen 2x mit Lösung A waschen
 - Gewebsschnitte 2x mit Lösung A waschen.
- Fixierung
- Embryonen: je nach Größe 5min (bis E9,5) oder 15min (bis E12,5) in Lösung B bei RT fixieren
 - Schnitte 5min fixieren in Lösung B / wurden die Gewebe vorher mit 4% PFA perfundiert kann die Fixierung entfallen.

Waschen	3x waschen in Lösung C (je nach Größe 5-15 min)
Anfärbung	Inkubation in Lösung D über Nacht im Dunkeln bei 37°C
Waschen	3x waschen in Lösung C
Lagerung	<ul style="list-style-type: none">• Embryonen: Refixierung in 4%PFA (2h), Lagerung in 70% ETOH• Schnitte: (Optional: gegenfärben mit Eosin), Einbetten in Mowiol

2.2.22 Darstellung mitotisch aktiver Zellen mittels BrdU Inkorporation

- BrdU Stammlösung: (10x) 72 mg/ml in PBS

Nach peritonealer Injektion von 120mg BrdU/kg Maus (entspricht 0,5ml pro 30g Maus-Körpergewicht) betrug die Inkubationszeit 1h – 3h. Danach erfolgte die Isolierung der Embryonen. Die weiteren Fixierungs- Einbettungs und Schneide-Schritte erfolgten wie unter Punkt 2.2.17.2 und 2.2.17.3

Die Darstellung der BrdU positiven Zellen erfolgte nach dem Herstellerprotokoll (BrdU Staining Kit, Oncogene Research/Calbiochem / Kat. Nr. HCS24)

2.2.22 Array Hybridisierung

Für die Hybridisierung stand ein Atlas™ Maus 1.2 Array (Clontech) zur Verfügung. Auf diesen Nylonmembranen sind jeweils 1176 cDNA Fragmente gespottet. Eine komplette Liste der vorhandenen Gene findet sich unter www.clontech.de. Nach Isolierung der mRNA aus den entsprechenden Geweben erfolgte eine reverse Transkription. Die Markierung der zu amplifizierenden cDNA, erfolgte in Gegenwart von γ -³²P dATP. Die Isolierung, Markierung und Hybridisierung erfolgte nach dem Herstellerprotokoll.

- Atlas™ Pure Total RNA Labeling System (Protokoll: PT3231-1)

- Atlas™ cDNA Expression Arrays (Protokoll: PT3140-1)

Die Auswertung erfolgte durch visuellen Vergleich der Hybridisierungssignale.

2.2.23 Genotypisierung von Mäusen

Zur Genotypisierung wurden die Mäuse in einem Alter von ca. 3 Wochen unter Einsatz von Diethylether betäubt. Es wurde ein kurzes Gewebestück der Schwanzspitze abgeschnitten, in 500 µl Lysis-Puffer überführt und über Nacht bei 55°C unter Schütteln inkubiert. Die

Präparation der DNA erfolgte gemäß Punkt 2.2.2.1 Zur Southern-Blot-Analyse (2.2.12.1; 2.2.13) wurden jeweils 20 μ g DNA eingesetzt.

2.2.24 Photodokumentation

Gefärbte Embryonen wurden mit einem Binokular (Zeiss) vergrößert. Die Embryonen wurden in eine Petrischale mit Silikonschicht (Sylgard, Dow Chemicals) überführt und mit 1xPBS überschichtet. Die Embryonen wurden entsprechend ausgerichtet und mit Insektennadeln (Plano) fixiert.

Gefärbte Schnitte wurden entsprechend mit einem Mikroskop (Axiophot II, Zeiss) vergrößert. Für die photographische Darstellung von gefärbten Embryonen und Schnitten wurde eine Digitale Nikon Kamera (Nikon Coolpix 990) eingesetzt. Die Bildverarbeitung erfolgte mit dem Kodak-Image Viewer Programm und mit dem Photoshop 5.5 / 6.0 Programm.

2.2.25 Knochen und Knorpelfärbung mit Alazarin.

Zur Knochenanfärbung werden zunächst die umliegenden Gewebe entfernt. Nach vollständiger Dehydratisierung (je nach Größe der Knochen bis zu 3 Tage) mit Ethanol werden die Skelette in Alazarin-Blau Lösung für 8-12 Stunden inkubiert. Nach einem Waschschrift in 96% Ethanol über Nacht wird mit Alazarin-Rot gegengefärbt (ebenfalls abhängig von der Größe der Knochen / bis zu 12h). Die Skelette werden anschließend in 100% Glycerol gelagert. Die Knochen erscheinen rot die Knorpel blau.

Alazarin-Blau: 15mg Alazarin-Blau 8GX (Sigma BestNr. #3157), 80ml 96% ETOH, 20ml Essigsäure. Alazarin-Rot: 50mg/l Alazarin-Rot S (Sigma BestNr. 5533) in 2% KOH

3. Ergebnisse

3.1 Analyse der Funktion von NSCL-1 und NSCL-2

Für die funktionelle Analyse der Gene NSCL-1 und NSCL-2 wurden im Rahmen dieser Arbeit zwei transgene „knock out“ Mauslinien generiert. Da die Gene für NSCL-1 und NSCL-2 auf zwei verschiedenen Chromosomen lokalisiert sind, war es möglich die beiden mutanten Mausstämme miteinander zu verkreuzen und so Doppelmutanten zu erhalten.

3.2 NSCL-2 homozygote Mäuse sind infertil und zeigen eine adulte Obesität

3.2.1 Strategie zur Inaktivierung des NSCL-2 Gens.

Zur Konstruktion des Ziel-Vektors pWH9 wurde ein 6,5kb großes genomisches Fragment aus dem 5' Bereich mit 6,5kbp und ein 1,3kbp großes Fragment aus dem 3' Bereich verwendet. Die Inaktivierung des NSCL-2 Gens resultierte in der Deletion der basischen Helix Loop Helix Domäne, welche ein Teil von Exon 2 betraf. Abbildung 1 zeigt schematisch die gezielte Inaktivierung des NSCL-2 Gens.

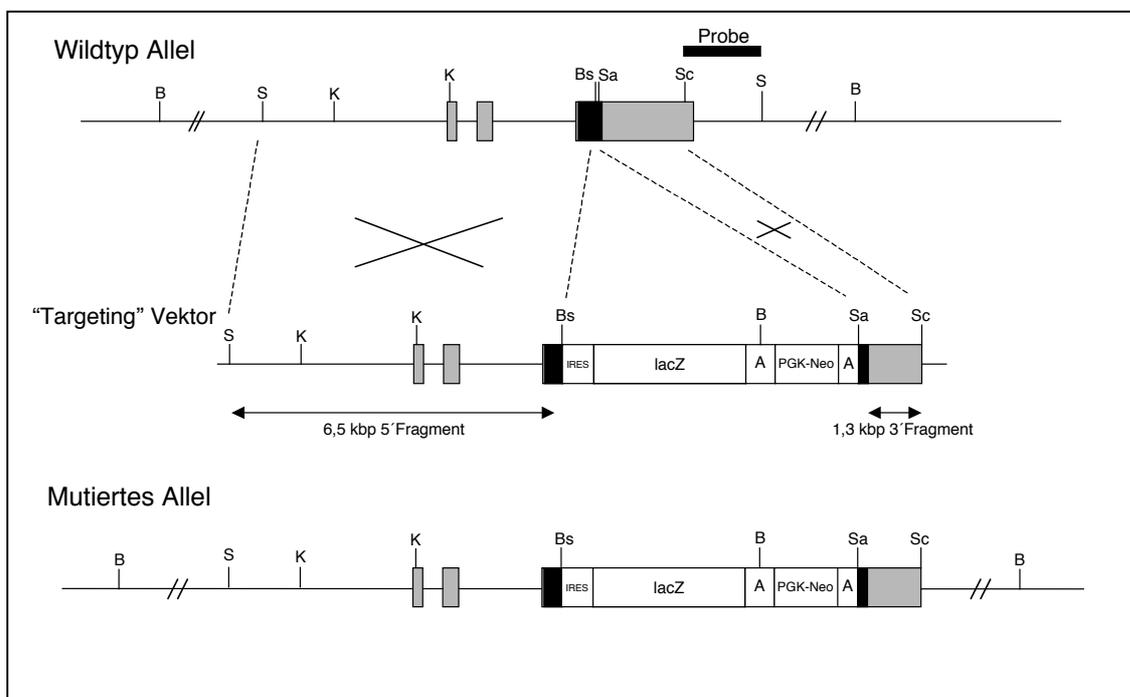


Abb. 1: Die gezielte Inaktivierung des NSCL-2 Gens.

Schematische Darstellung des Wildtyp Allels (oben), des Zielvektors (mitte) und des mutierten Allels (unten). Als Zielvektor wurde pWH9 verwendet. Abkürzungen: **B** BglII; **S** Sall; **K** KpnI; **Bs** BSSHII; **Sa** Sall; **Sc** Scal; **IRES** intern ribosome entry site; **LacZ** Sequenz für die beta-Galactosidase; **A** poly A Schwanz; **PGK-Neo** Neomycin Resistenz Gen.

Neben einer Deletion des kodierenden Bereichs, wurde eine Neomycinkassette und das Gen für die β -Galaktosidase in den Locus des NSCL-2 Gens inseriert. Mit Hilfe der β -Galaktosidase, die unter der transkriptionellen Kontrolle des 6,5 kbp aufwärts gelegen 5' Fragments steht, lassen sich somit Zellen detektieren, die das NSCL-2 Gen exprimieren.

3.2.2 Genotypisierung von NSCL-2 Mausmutanten.

Zur Überprüfung der korrekten Insertion wurden Southern Blot Analysen mit DNA durchgeführt, die aus der Schwanzspitze adulter Mäuse isoliert worden war. Als Probe fand ein SacI/ScaI Fragment Verwendung, das außerhalb des Zielvektors im 3' Bereich des NSCL-2 Gens lokalisiert war. In Abb. 2 ist eine exemplarische Southern-Blot Analyse für 7 verschiedene Mäuse gezeigt. Dieselbe Prozedur wurde auch zur Bestimmung des Genotyps bei der weiteren Zucht des Stammes angewandt.

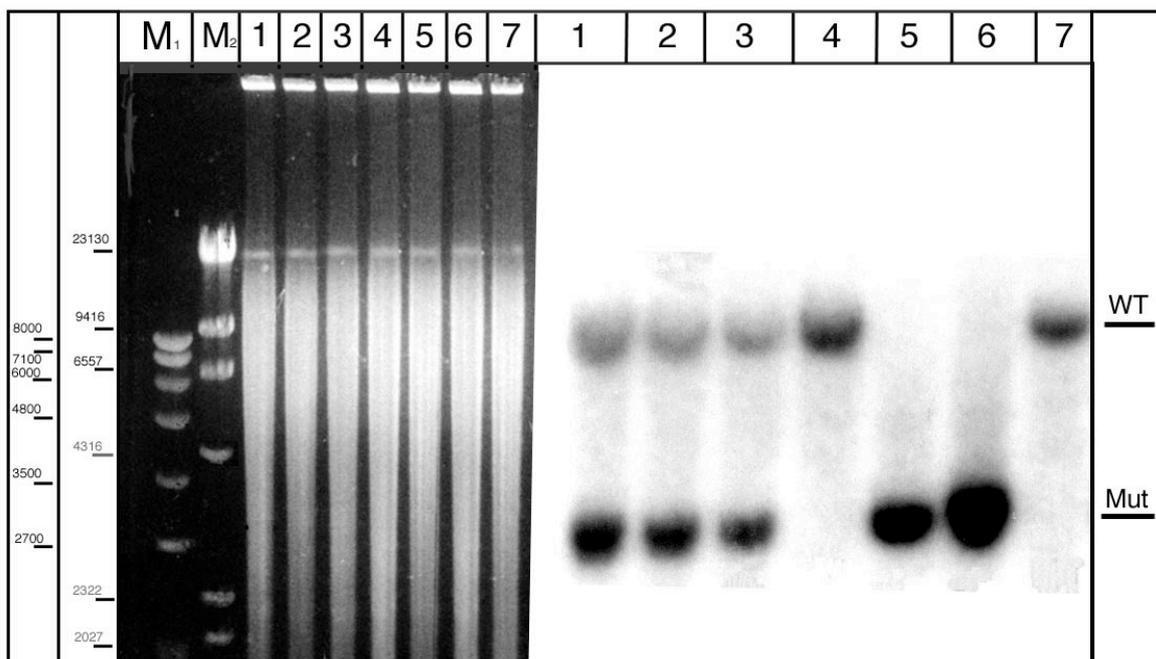


Abb.2 Southern-Blot Analyse zur Genotypisierung von Mäusen.

Die isolierte DNA wurde gelelektrophoretisch aufgetrennt (links). M₁ und M₂ stellen verschiedene DNA Molekulargewichts Standards dar. Die Hybridisierung des Southern Blots erfolgte mit dem radioaktiv markierten SacI/ScaI-Fragment (Probe siehe Abb.1). Die Wildtyp-Bande wird im Autoradiogramm durch das hybridisierende ca. 9,5kbp lange Fragment dargestellt. Das Einfügen der BglII Restriktionsschnittstelle in den NSCL-2 Locus resultiert in einem ca. 3 kbp Fragment, welches das mutierte Allel kennzeichnet (rechts). Die Mäuse #1-#3 sind heterozygot, #5 und #6 sind homozygot für die NSCL-2 Mutation. Nummer #4 und #7 repräsentieren die Wildtypsituation.

Ein statistischer Vergleich von Wildtyp, heterozygoten und homozygoten Mäusen ergab keine Abweichung vom erwarteten Mendelschen Verhältnis (nicht gezeigt).

3.2.3 Das inserierte β -Galaktosidase Gen spiegelt das endogene Expressionsmuster von NSCL-2 wieder.

Zur Klärung der Frage, ob die Aktivität des inserierten β -Galaktosidase Gens das endogene Expressionsmuster von NSCL-2 widerspiegelt, wurden whole mount in situ Hybridisierungen und LacZ-Färbungen von zwei verschiedenen embryonalen Stadien E10,5 und E18,5 miteinander verglichen. Abb. 3 zeigt übereinstimmende Anfärbungen einer NSCL-2 Digoxigenin markierten antisense RNA Probe und einer LacZ Färbung im Bereich der kranialen Ganglien (Abb.3A,B), des Neuralrohrs, der dorsalen Wurzelganglien (Abb.3C,D) und der externen Körnerzellschicht (externe granuläre Schicht EGL) des Zerebellums (Abb.3E,F). Unterschiedliche Intensitäten im Bereich der kranialen Ganglien und des Zerebellums lassen sich durch eine höhere Sensitivität der LacZ-Farbreaktion erklären.

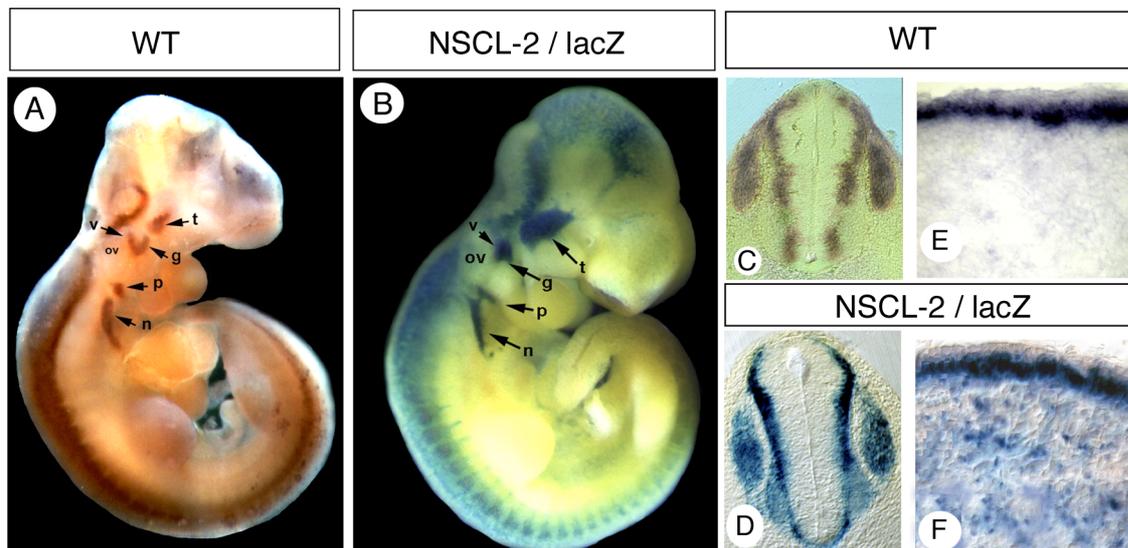


Abb.3 Die NSCL-2/ LacZ Färbung stimmt mit dem endogenen Expressionsmuster von NSCL-2 überein. (A) Whole mount in situ Hybridisierung mit einer antisense Digoxigenin markierten RNA Probe. (B) Whole mount LacZ Färbung einer für NSCL-2 heterozygoten Mutante. Am Embryonaltag 10,5 lassen sich NSCL-2 positive Zellen im Bereich des Neuralrohrs, der dorsalen Wurzelganglien (C,D) und der kranialen Ganglien detektieren. Durch Pfeile sind folgende Ganglien markiert: t (V.) Ganglion trigeminale, v (VII.) Ganglion vestibulo-cochlearis, g (VIII.) Ganglion geniculatum, p (IX.) Ganglion petrosum, n (X.) Ganglion nodosum. Transversale Schnitte durch das Zerebellum zeigen vergleichbare Anfärbungen im Bereich der externen Körnerschicht (EGL) am Embryonaltag 18,5 innerhalb des Zerebellum (C in situ Hybridisierung, D LacZ Färbung). weitere Abk:ov otisches Vesikel.

3.2.4 NSCL-2 wird in verschiedenen Bereichen des zentralen und peripheren Nervensystems exprimiert. !!

Zur Beschreibung des Beginns der NSCL-2 Expression wurden LacZ Färbungen frühen heterozygoten Mausembryonen durchgeführt. Erste LacZ positive Zellen lassen sich ab dem Somitenstadium 16-18 (E9,0) innerhalb des sich entwickelnden zentralen und peripheren

Nervensystems detektieren. Wie Abb. 4B zeigt, beschränken sich die Signale zu diesem Zeitpunkt auf das Dienzephalon innerhalb des zentralen Nervensystems und auf das Ganglion trigeminale des peripheren Nervensystems. Nach Entwicklung weiterer 2-4 Somiten (Abb.4C) lassen sich deutlich stärkere Signale beobachten. Neben der Expression im Dienzephalon und Mesenzephalon des zentralen Nervensystems finden sich weitere LacZ positive Zellen in den Ganglien geniculatum und vestibulo-cochlearis. Ab dem Embryonalstadium E9,25 (22-24 Somiten) lassen sich weitere Signale in den mehr kaudal gelegenen Ganglien petrosus und nodosus und im kranialen Bereich des Neuralrohrs detektieren.

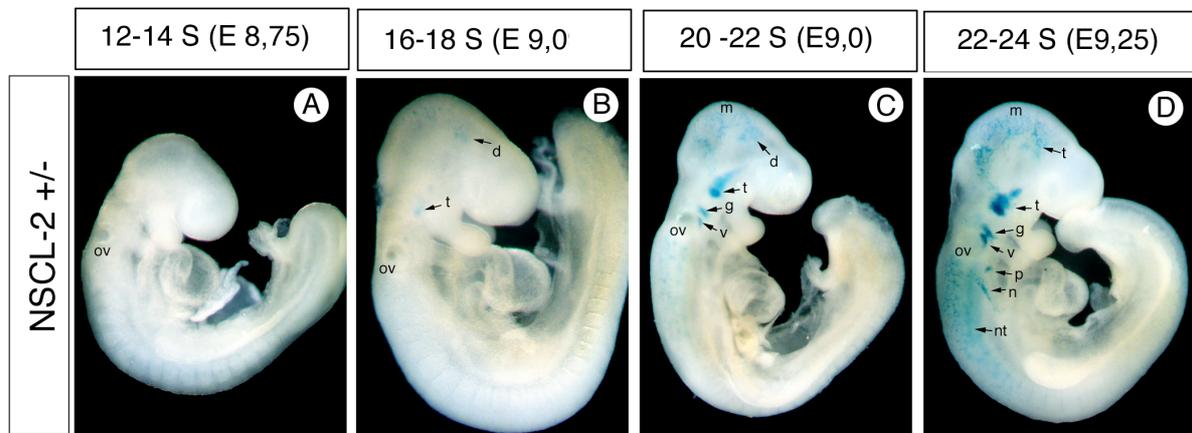


Abb.4 Erste Expression von NSCL-2 ab dem Somitenstadium 16 -18. Gezeigt sind laterale Übersichten von whole mount LacZ gefärbten heterozygoten Embryonen. LacZ positive Zellen lassen sich ab dem Embryonaltag 9,0 (16-18 Somiten) in verschiedenen Bereichen des zentralen und peripheren Nervensystems detektieren (B-D). Im peripheren Nervensystem ist die NSCL-2/LacZ Expression auf die sich entwickelnden kranialen Ganglien beschränkt, wobei sich die Signale in rostro-kaudaler Richtung ausbreiten. Erste Signale im Neuralrohr sind im kranialen Bereich ab E9,25 detektierbar. Abk.: d Dienzephalon, g Ganglion geniculatum, m Mesenzephalon, n Ganglion nodosum, nt Neuralrohr, ov otisches Vesikel, p G.petrosus, t G. trigeminale, v G. vestibulo-cochlearis. Vergrößerung A,B 66x und C,D 50x.

Die beginnende Expression ab dem Somitenstadium 16-18 und die rostro-kaudale Ausbreitung der NSCL-2/LacZ Expressionsdomänen, spiegelt den ebenfalls rostro-kaudal verlaufenden Gradienten der neuroepithelialen Differenzierung wieder.

3.2.5 Homozygote NSCL-2 Mutanten zeigen keine Veränderung des Expressionsmusters des markierten Gens.

Ein Vergleich von hetero- und homozygoten NSCL-2 Mutanten bei verschiedenen Entwicklungsstadien, zeigte keine Veränderung im LacZ Expressionsmuster (Abb.5). Die intensivere Färbung bei homozygoten Embryonen, läßt sich durch die doppelte Kopienzahl des inserierten β -Galaktosidase Gens erklären.

Ab dem Embryonalstadium E10,5 erhöht sich die NSCL-2 Expression in den zentralen und peripheren Bereichen des sich entwickelnden Nervensystems. Wie Abb.5 zeigt, verstärken sich die Signale im Di-, Mes-, und Metenzephalon des zentralen Nervensystems. Das erhöhte NSCL-2/LacZ Expressionsniveau spiegelt sich ebenfalls im Neuralrohr, in den dorsalen Wurzelganglien und den kranialen Ganglien wieder. Weiterhin lassen sich LacZ positive Zellen in der sich ab E10,5 entwickelnden Riechgrube detektieren.

Zur genaueren Analyse des NSCL-2/LacZ Expressionsmusters wurden transversale Schnittserien von heterozygoten und homozygoten Mutanten erstellt.

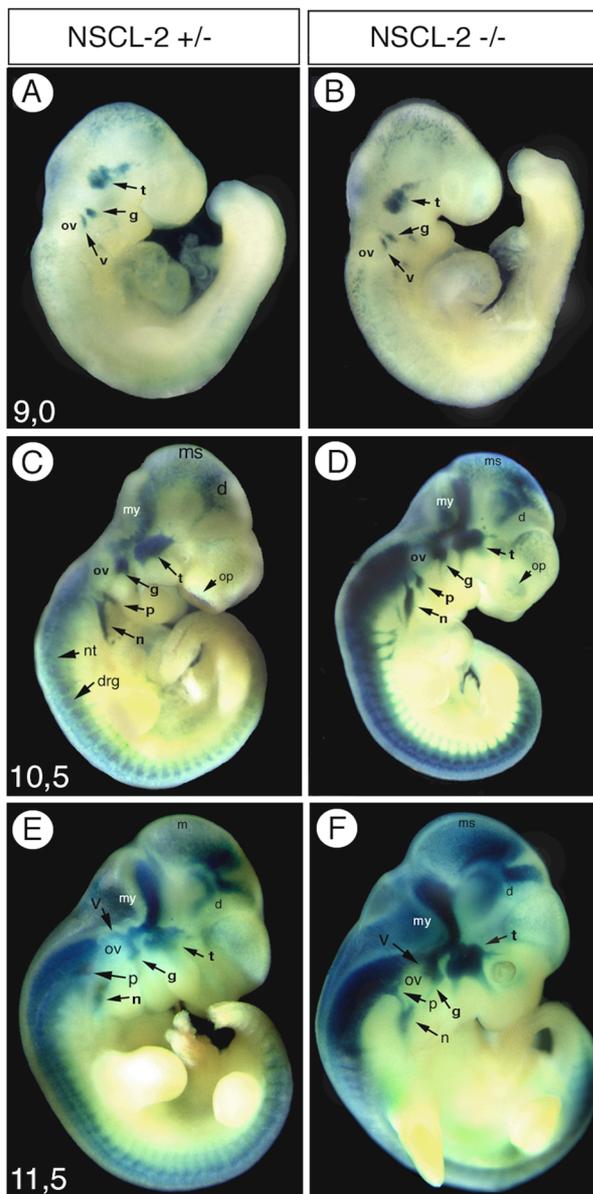


Abb.5 Homozygote NSCL-2 Embryonen zeigen kein verändertes LacZ Expressionsmuster.

Laterale Übersicht von whole mount LacZ gefärbten heterozygoten und homozygoten NSCL-2 Mutanten. Zwischen den Embryonalstadien E9,0 (A,B) und E11,5 (E,F) ist keine Abweichung des LacZ Expressionsmusters in homozygoten Mutanten zu beobachten. Neben der Expression in den kranialen Ganglien (V-X) lassen sich weitere LacZ positive Zellen ab E10,5 (C,D) im Neuralrohr, in den dorsalen Wurzelganglien und der Riechgrube detektieren. Ab E10,5 findet im zentralen Nervensystem eine deutliche Verstärkung der Expression im Bereich des Di-, Met-, und Mesenzephalons statt.

Abk.: d Diencephalon, g Ganglion geniculatum, ms Mesenzephalon, my Myelencephalon, n Ganglion nodosum, ov otisches Vesikel, p G.petrosum, t G. trigeminale, v G. vestibulo-cochlearis, op (olfactory pit) Riechgrube. Vergrößerungen: A,B 50x; C-F 40x.

Zell-Markierungsexperimente haben gezeigt, daß kraniale sensorische Ganglien aus zwei Populationen von Vorläuferzellen, gebildet werden. Neben der Rekrutierung von Neuralleistenzellen tragen epibranchiale Plakoden ektodermalen Ursprungs zur Entwicklung sensorischer Ganglien bei. Determinierte Vorläuferzellen delaminieren aus den epibranchialen Plakoden und bilden die entsprechenden Ganglien. Wie die verschiedenen Schnittebenen in Abb.6 zeigen, ist eine deutliche NSCL-2/LacZ Expression im Bereich des Ganglion trigeminale detektierbar. In der trigeminalen Plakode waren hingegen keine NSCL-2/LacZ positiven Zellen nachweisbar. Weiterhin wurde kein abweichendes Expressionsmuster zwischen hetero- und homozygoten NSCL-2 Mutanten beobachtet Abb.6 (B-C und D,E).

Die Analyse transversaler Schnitte durch das otische Vesikel bestätigte ebenfalls die Abwesenheit NSCL-2/LacZ positiver Zellen in epithelialen Vorläuferzellen der otischen Plakode am Embryonaltag 9,0 (Abb. 6D,E)

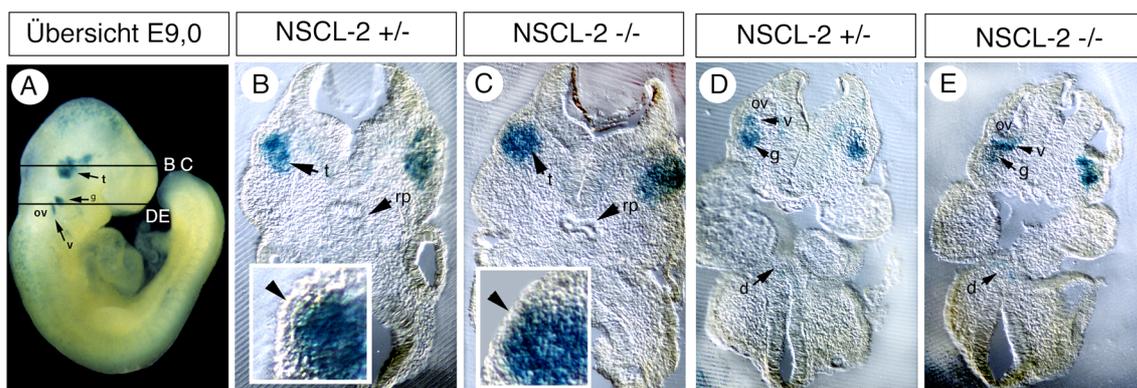


Abb.6 Darstellung transversaler Vibratomschnitte von E9,0 LacZ gefärbten heterozygoten und homozygoten NSCL-2 Mutanten.

Zur Orientierung sind die Schnittebenen in A gekennzeichnet. Die Schnittebenen B,C und D,E zeigen deutliche Signale im Bereich der Ganglien trigeminale, vestibulo-cochlearis und geniculatum. In den darüber liegenden epibranchialen bzw. otischen Plakoden sind keine Signale zu detektieren. Die Pfeilköpfe in der Vergrößerung von B,C markieren den Bereich der epibranchialen Plakode. Eine weitere initiale Expressionsdomäne findet sich im Diencephalon (D,E). Abk.: t Ganglion trigeminale, g Ganglion geniculatum, v Ganglion vestibulo-cochlearis, ov otisches Vesikel, rp Rathkes Tasche, d Diencephalon. Vergrößerungen: B-E 100x.

Bei E10,5 wurden, neben den bereits bestehenden Expressionsdomänen, weitere Signale im Neuroepithel des Telenzephalons, im Diencephalon, im Neuralrohr und in den dorsalen Wurzelganglien detektiert. Innerhalb des Neuralrohrs und des Neokortex beschränkt sich die Expression auf randständige Bereiche (Abb. 7A-C, H); in mitotisch aktiven ventrikulären Schichten (vz) wurden hingegen keine LacZ positiven Zellen detektiert. Ebenfalls keine Signale wurden in der sog. Rathke'schen Tasche (Rathke's pouch rp) beobachtet, aus der sich die spätere Adenohypophyse entwickelt. Eine weitere, zur dorsoventralen Achse symmetrische Expressionsdomäne liegt im rostralen Bereich zwischen dem 3. und 4.

Ventrikel (Abb.7A). Ob es sich bei dieser Struktur um einen der beiden Augennerven (N. oculomotorius III. oder den N.trochlearis IV.) handelt, konnte nicht genau bestimmt werden. Ab dem Embryonaltag 11,5 findet eine leichte Reduktion des Expressionsniveaus in den kranialen Ganglien statt (nicht gezeigt).

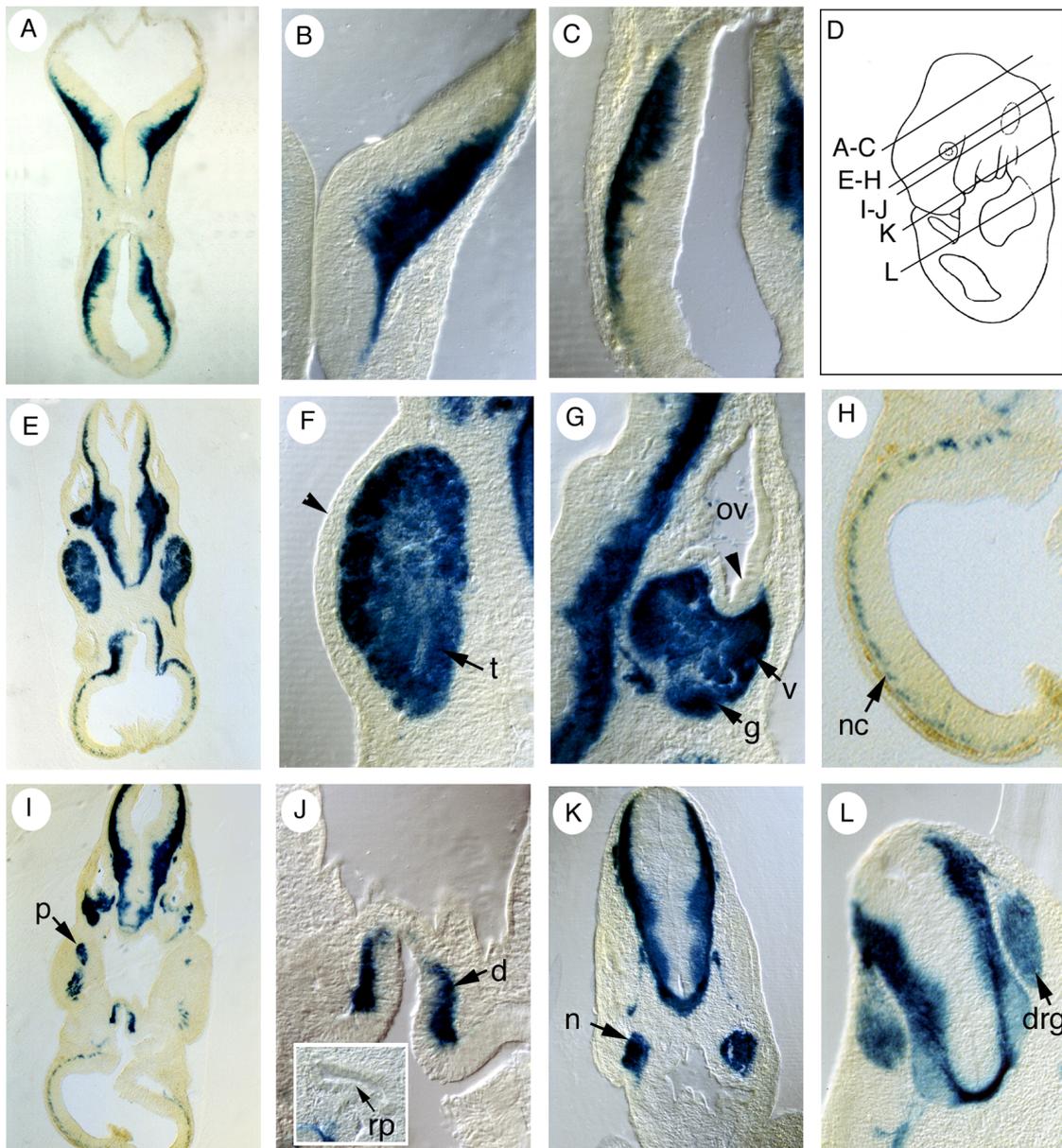


Abb.7: Prominente NSCL-2/LacZ Expression in kranialen Ganglien ab E10,5.

Darstellung transversaler Vibratomschnitte (Schnittdicke $20\mu\text{m}$). Stadium E10,5. Transversale Schnitte E-G und I,K durch kraniale Bereiche bestätigen die Expression im Ganglien trigeminale (t), vestibulo-cochlearis (v), geniculatum (g), petrosus (p) und nodosus (n). Neben diesen prominenten Expressionsdomänen lassen sich im Bereich des Neuralrohrs (E,G,K), des Neokortex (H), des Diencephalons (J) und der dorsalen Wurzelganglien (L) LacZ positive Zellen detektieren. Die initiale Expression im Bereich des olfaktorischen Epithels ist nicht gezeigt. Die Ausschnittsvergrößerung in (J) zeigt, die zu diesem Zeitpunkt invaginierende Rathke's Tasche (rp „Rathke's pouch“). In dieser Anlage, der späteren Hypophyse, sind keine NSCL-2/LacZ positiven Zellen zu beobachten. Der Pfeilkopf in (F) markiert die epibranchiale Plakode des Ganglion trigeminale.

Abkürzungen: t Ganglion trigeminale, g Ganglion geniculatum, v Ganglion vestibulo-cochlearis, ov otisches Vesikel, rp Rathke's Tasche, d Diencephalon, p Ganglion petrosus, Ganglion nodosus, drg dorsale Wurzelganglien, rp Rathke's Tasche, nc Neokortex. Vergrößerungen: A,E,I 50x; B,C,F-H,J-L 100x; Ausschnitt in J 200x.

3.2.6 NSCL-2 ist stark in verschiedenen Bereichen des Hypothalamus während der Embryonalstadien E14,5 – E18,5 exprimiert.

Zur Analyse späterer embryonaler Entwicklungsstadien wurden sagittale bzw. frontale Kryotomschnitte mittels LacZ-Histochemie untersucht. Nach Fixierung und Kryoprotektion wurden die Embryonen in OCT (Einbettungsmedium) eingebettet und mit Hilfe eines Kryostaten Schnittserien (Schnittdicke 30 μ m) erstellt. Repräsentative Schnitte von heterozygoten und homozygoten Embryonen wurden einer LacZ Färbung unterzogen und eingebettet.

Die Analyse von E14,5 heterozygoten Embryonen ergab eine starke NSCL-2/LacZ Expression im dorsalen Telenzephalon, Hippokampus, Thalamus und Hypothalamus, Mittelhirn, Zerebellum, Nachhirn (Medulla oblongata), kranialen Ganglien und im olfaktorischen Neuroepithel. Neben diesen Domänen konnten weitere Signale im Neuralrohr und in den dorsalen Wurzelganglien detektiert werden (nicht gezeigt).

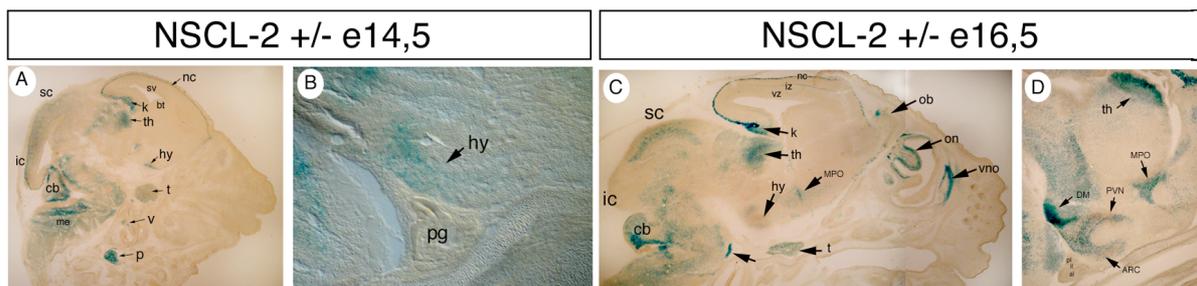


Abb.8: Expression von NSCL-2 in verschiedenen Bereichen des zentralen Nervensystems

Sagittale LacZ gefärbte Schnitte von NSCL-2 heterozygoten E14,5 und E16,5 Mutanten. Die Übersichten in A und C zeigen, LacZ positive Zellen im dorsalen Telenzephalon, Thalamus und Hypothalamus, Mittelhirn (colliculus inferior ic und colliculus superior sc), Zerebellum, Nachhirn (Medulla oblongata), kranialen Ganglien und im olfaktorischen Neuroepithel. Ab E16,5 finden sich weitere LacZ positive Zellen im Bulbus olfaktorius. Die Vergrößerungen in B und D verdeutlichen die Expression von NSCL-2 in verschiedenen hypothalamischen Kerngebieten. Abk.: ARC Nucleus arcuatus, al Adenohypophyse (anterior lobe), bt basales Telenzephalon, DM Nucleus dorsomedialis, hy Hypothalamus, ic inferior colliculus, il intermediärer Lappen, k Hippokampus, MP Nucleus medialis präopticus, ob Bulbus olfaktorius, on olfaktorisches Neuroepithel, th Thalamus, me Medulla oblongata, nc Neokortex (kortikale Vorplatte), pg Hypophyse (pituitary gland), p Ganglion petrosum(IX.), PVN Nucleus paraventricularis, pl Neurohypophyse (posterior lobe), sc superior colliculus vz ventrikuläre Schicht, t Ganglion trigeminale, v Ganglion vestibulo-cochlearis, vno Vomeronasal Organ, vn ventraler Nucleus. Vergrößerung: A,C 50x; B,C 200x

Neben der Expression im olfaktorischen Neuroepithel konnten LacZ positive Zellen im sog. Vomeronasalorgan (Jakobsches Organ) detektiert werden. Dieses Organ fungiert bei Nagetieren als Chemorezeptor für Pheromone. Die Vergrößerung in Abb.8D verdeutlicht die Expressionsdomänen von NSCL-2 bei E16,5 in verschiedenen Regionen des Thalamus und Hypothalamus. Eine eindeutige Zuordnung der LacZ positiven Bereiche zu bestimmten Strukturen ist jedoch zu diesem Zeitpunkt (E14,5-E16,5) sehr schwierig, da die meisten

Kerngebiete noch nicht eindeutig definiert sind. Die Expression von NSCL-2 innerhalb des kortikalen Neuroepitheliums ist auf die in diesem Stadium entstehende kortikale Vorplatte beschränkt und nicht in proliferativen Vorläuferzellen der Ventrikularschicht nachweisbar. Ab E16,5 findet sich innerhalb des Telenzephalons in der kortikalen Subplatte eine weitere zusätzliche Expressionsdomäne von NSCL-2. Weiterhin zeigten LacZ positive Zellen innerhalb des Telenzephalon eine deutliche rostrale und kaudale Begrenzung, so daß keine Expression in der basalen Telenzephalonplatte vorlag. Ein Vergleich der verschiedenen Expressionsdomänen von NSCL-2 und NSCL-1 innerhalb des Klein- und Großhirns folgt unter Punkt 3.4.5.1 und 3.4.5.2. Mit zunehmender Differenzierung verschiedener hypothalamischer Kerngebiete ab E16,5, läßt sich ein deutlich ansteigendes NSCL-2 Expressionsniveau beobachten. Zur genaueren Analyse wurden frontale Kryotomschnitte von E18,5 heterozygoten und homozygoten NSCL-2 Mutanten hergestellt. Mittels LacZ Färbung konnten verschiedene NSCL-2 positive hypothalamische Kerngebiete identifiziert werden. Im anterioren Teil des Hypothalamus wurden NSCL-2 positive Zellen in septalen (MS,LS) und präoptischen (MPO) Kerngebieten lokalisiert. Neben diesen Bereichen konnten vereinzelt LacZ positive Zellen im vertikalen und horizontalen „Nucleus of the Diagonal Band of Broca“ (VDB,HDB) detektiert werden. Nach Fusion der paarigen Sehnerven entsteht das Chiasma opticum. Innerhalb dieser Zone finden sich neben Lateralen Hypothalamischen Gebieten (LHA), der Nucleus Suprachiasmaticus (SCh), der Nucleus paraventricularis (PVN), der Nucleus periventricularis (PP), der Nucleus anterior hypothalami (AHN) und der Nucleus latero-anterior hypothalami (LA). Bis auf den Nucleus suprachiasmaticus, waren alle aufgeführten Kerngebiete LacZ positiv (Abb. 9D,E und K,L). Im posterioren Bereich sind LacZ positive Zellen im Nucleus arcuatus (ARC) und in dorsalen Zonen (dorsomedialer Hypothalamus/ Nucleus dorsomedialis hypothalami DM) detektierbar.

Im Vergleich zur heterozygoten Situation, zeigten homozygote NSCL-2 Mutanten in den meisten Kerngebieten kein abweichendes Expressionsmuster. Eine leichte Reduktion der LacZ-Färbung läßt sich jedoch im Bereich des Nucleus arcuatus beobachten (Abb.9 F,G und M,N). Verstärkt wird diese Reduktion unter Berücksichtigung der doppelten Farbintensität bei homozygoten Mutanten. Postnatal findet sich innerhalb des Hypothalamus eine deutliche Reduktion des Expressionsniveaus von NSCL-2 (nicht gezeigt).

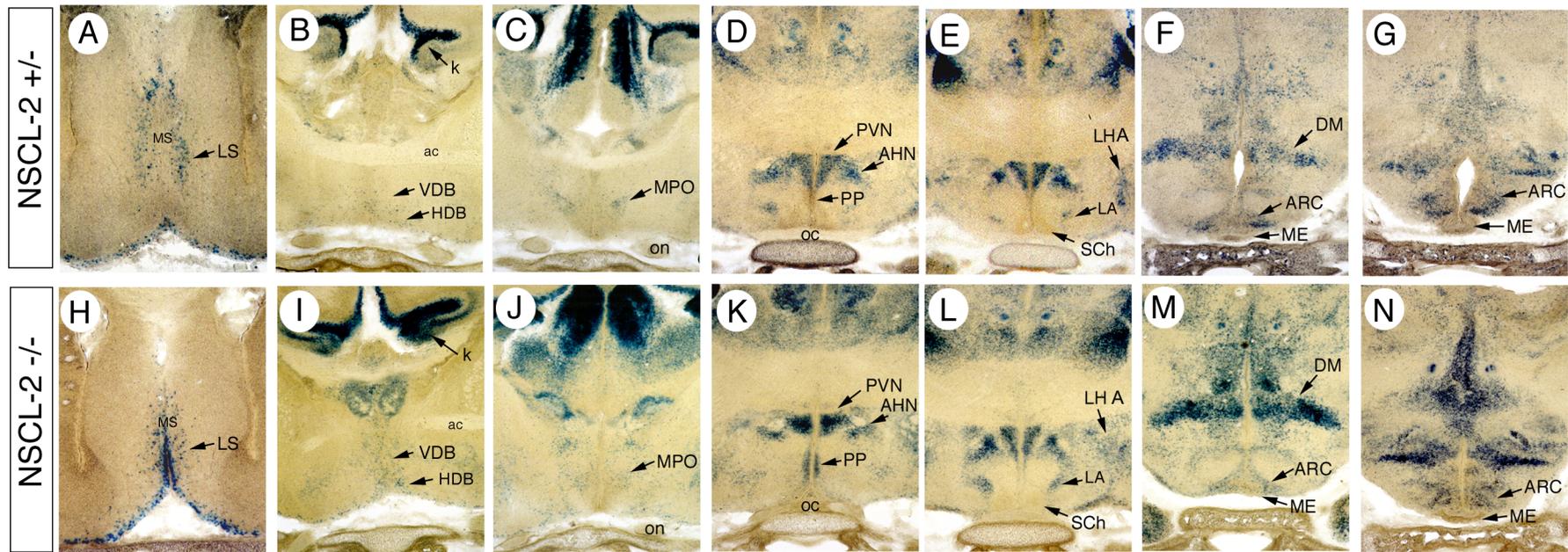


Abb.9: Expression von NSCL-2 in verschiedenen hypothalamischen Kerngebieten.

Frontale Kryotomschnitte (Schnittdicke $30\mu\text{m}$). A-G heterozygote Mutanten, H-N homozygote Mutanten. Ein abweichendes LacZ Expressionsmuster in homozygoten Mutanten wurde nicht beobachtet. Eine leichte Reduktion der LacZ Färbung konnte jedoch im Bereich des Nucleus arcuatus detektiert werden. Im anterioren Bereich beschränkt sich die Expression auf laterale und mediale septale Bereiche. Weitere Prominente NSCL-2/LacZ Signale lassen sich innerhalb medialer präoptischer Kerngebiete, im „Nucleus of the Diagonal band of Broca“, des Nucleus paraventricularis (PVN), des Nucleus periventricularis (PP), des Nucleus anterior hypothalami (AHN) und im Nucleus latero-anterior hypothalami (LA) detektieren. Abkürzungen: AHN Nucleus anteriorer Hypothalami, ARC Nucleus arcuatus, DM Nucleus dorsomedialis, HDB Horizontales „Nucleus of the Diagonal Band of Broca“, k Hippokampus, LA Nucleus latero-anterior hypothalami, LHA laterales Hypothalamisches Gebiet, LS Nucleus lateralis septalis, MPO Nucleus medialis präopticus, ME Eminencia mediana, MS Nucleus medialis septalis, oc Chiasma opticus, on optischer Nerv, PP Nucleus periventricularis VDB vertikales „Nucleus of the Diagonal Band of Broca“. Vergrößerung 100x.

3.2.7 NSCL-2 defiziente Mäuse weisen eine reduzierte Anzahl Gonadotropin-Releasing Hormon positiver Neurone auf.

3.2.7.1 Embryonale Entwicklungsstadien

NSCL-2 defiziente männliche und weibliche Mäuse zeigen eine abnormale gonadale Entwicklung während der Pubertät, welche zu einem hypogonadalen Phänotyp führt. Untersuchungen von Good und Mitarbeitern (Good *et al.*, 1997) haben gezeigt, daß bei weiblichen homozygoten Tieren präpubertal eine Arretierung der Folikelreifung auftritt. Bei männlichen Tieren führt eine NSCL-2 Mutation meist zu einer Blockierung der Spermatogenese. Histologische Untersuchungen zeigten verkleinerte Samenkanälchen (Tubuli seminiferi) mit rudimentären Lumen und eine reduzierte Anzahl von Leydig Zellen.

Bei einigen Tieren fand sich noch eine Spermio-genese im Hoden, was auf eine variable Expressivität des Phänotyps hindeutet. Mutante Tiere waren allerdings immer steril.

Verpaarungen homozygoter NSCL-2 Mutanten bestätigten den infertilen Phänotyp, während heterozygote weibliche und männliche NSCL-2 Mutanten keine Beeinträchtigung der Fertilität zeigten.

Ein wichtiger Regulator für die Entwicklung der Gonaden ist das Gonadotropin-Releasing Hormon (GnRH). Innerhalb des zentralen Nervensystems synthetisieren ca. 800-1000 GnRH positive Neurone das betreffende Decapeptide (auch bekannt als Luteinisierendes Hormon Releasing Hormon LHRH). Nach pulsatiler Freisetzung bindet das GnRH an spezifische Membranrezeptoren gonadotroper Hypophysenzellen und bewirkt eine intermittierende Ausschüttung von luteinisierendem Hormon (LH) und follikelstimulierendem Hormon (FSH). Neben einer 4 fachen Reduktion des Serum FSH Spiegels in NSCL-2 homozygoten Tieren konnte bisher die Abnahme der Anzahl GnRH positiver Axone innerhalb des Nucleus arcuatus bei adulten homozygoten NSCL-2 Mutanten nachgewiesen werden.

Die Ausbildung GnRH positiver Neurone findet während embryonaler Entwicklungsstadien zunächst außerhalb des zentralen Nervensystems statt. So konnten Schwanzel-Fukuda und Mitarbeiter (Schwanzel-Fukuda *et al.*, 1989) zeigen, daß ab E11 erste GnRH positive Neurone innerhalb der Anlage des Vomeronasal Organs sowie in der olfaktorischen Riechgrube gebildet werden. Diese GnRH positiven Neurone migrieren entlang des Nervus terminalis. Zwischen E13-E16 finden sich die meisten GnRH immunoreaktiven Neurone in den septalen und präoptischen Anlagen des Hypothalamus. Postnatal verteilen sich diese Neurone vom

Bulbus olfaktorius über septale Bereiche im horizontalen bzw. vertikalen „Nucleus of the Diagonal Band of Broca“ und in präoptischen Kerngebieten.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die embryonale und postnatale Entwicklung GnRH positiver Neurone in homozygoten NSCL-2 Mutanten untersucht. In Abbildung 10 sind repräsentative sagittale Schnitte von E14,5 und E16,5 heterozygoten und homozygoten Embryonen gezeigt. Zur Untersuchung einer möglichen Kolokalisierung von NSCL-2 und GnRH in denselben Zellen, wurden zunächst 50 μ m Kryotomschnitte einer LacZ Färbung unterzogen. Danach folgte die immunhistochemische Lokalisierung GnRH positiver Neurone. Als primärer Antikörper stand ein polyklonaler anti-Gonadotropin-Releasing Hormon Antikörper (aus Kaninchen) zur Verfügung (auch als LR-1 Antikörper bezeichnet).

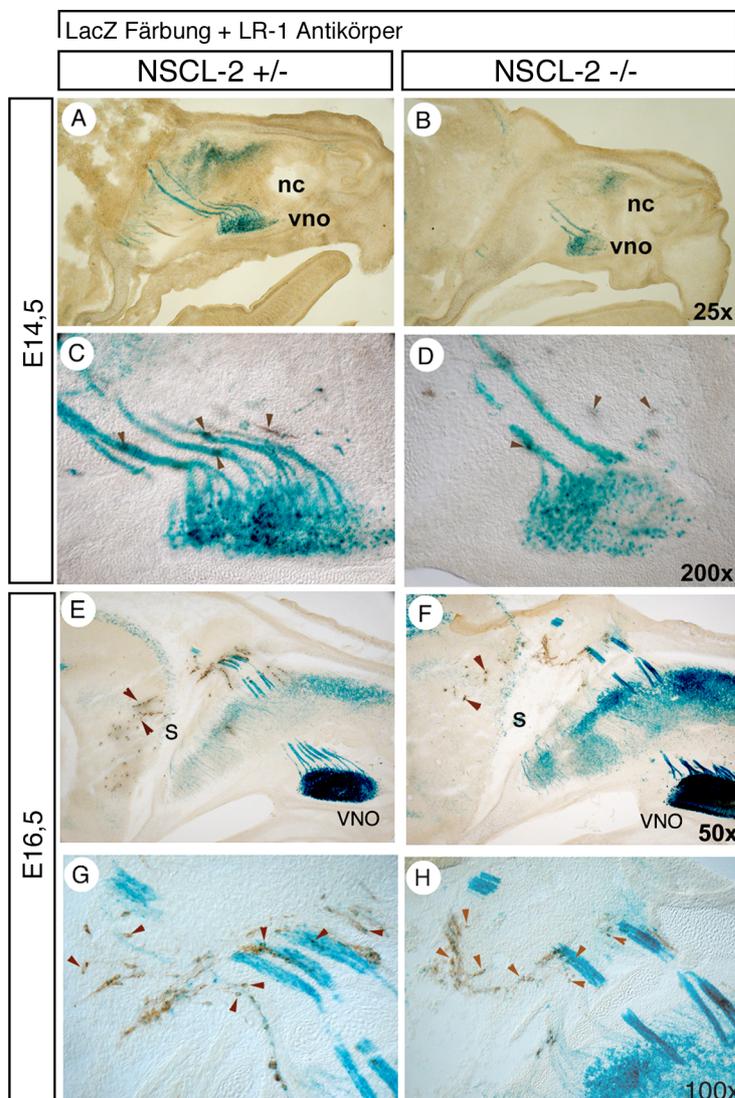


Abb.10 Kolokalisierung NSCL-2 und GnRH positiver Neurone.

Darstellung sagittaler 50 μ m Kryotomschnitte. Nach Anfärbung mittels LacZ Histochemie folgte eine Antikörperanfärbung mit einem anti-Gonadotropin-Releasing Hormon Antikörper (LR-1 Antikörper). NSCL-2 positive Zellen lassen sich im olfaktorischen Neuroepithel, im Vomeronasalorgan, in Vomeronasalnerven, im Bulbus olfaktorius und in septalen Bereichen lokalisieren. Das LacZ Expressionsmuster von heterozygoten und homozygoten Mutanten zeigte keine Veränderungen. Die scheinbar unterschiedliche Größe des Vomeronasalorgans bzw. die scheinbar unterschiedliche Anzahl der Nervenfasern ist durch geringe Unterschiede in den medianen Schnittebenen bedingt. Im Bereich NSCL-2 positiver Vomeronasalnerven sind GnRH immunoreaktive Neurone detektierbar. Ein Vergleich von heterozygoten und homozygoten Mutanten zeigte kein abweichendes Migrationsverhalten GnRH immunoreaktiver Neurone. Ab E16,5 sind GnRH positive Neurone im Bereich des Nervus terminalis, des Bulbus olfaktorius und in septalen Gebieten detektierbar. Die braunen Pfeilköpfe markieren GnRH positive Neurone. Die blaue Färbung stellt NSCL-2/LacZ positive Zellen dar. Abkürzungen: nc Nasenhöhle, s Septum, VNO Vomeronasalorgan. Vergrößerung: A,B 50x; C,D 200x; E,F 100x, G,H 200x.

Die Expressionsanalyse zeigte NSCL-2/LacZ positive Zellen im Bereich des Vomeronasal Organs und der ableitenden Nerven. Weiterhin konnten LacZ positive Zellen in Zellen der Glomerularschicht des Bulbus olfaktorius und in septalen Bereichen detektiert werden. Am Tag E14,5 waren GnRH positive Zellen vor allem auf Bereiche zwischen Vomeronasalorgan und Bulbus olfaktorius beschränkt. Ab E16,5 waren die meisten GnRH immunoreaktiven Neurone im Bulbus olfaktorius, septalen und präoptischen Bereichen detektierbar. Ein Vergleich von heterozygoten und homozygoten Mutanten zeigte kein abweichendes Migrationsverhalten GnRH positiver Neurone. Weiterhin konnte kein Unterschied zwischen heterozygoten Mutanten und Wildtyp-Situationen beobachtet werden.

Abb.11 stellt die Verteilung GnRH positiver Neurone von anterior nach posterior dar. Die frontalen Schnitte bestätigen die Beobachtung, daß bei E18,5 die meisten GnRH positiven Neurone vor allem zwischen septalen und präoptischen Bereichen zu detektieren sind.

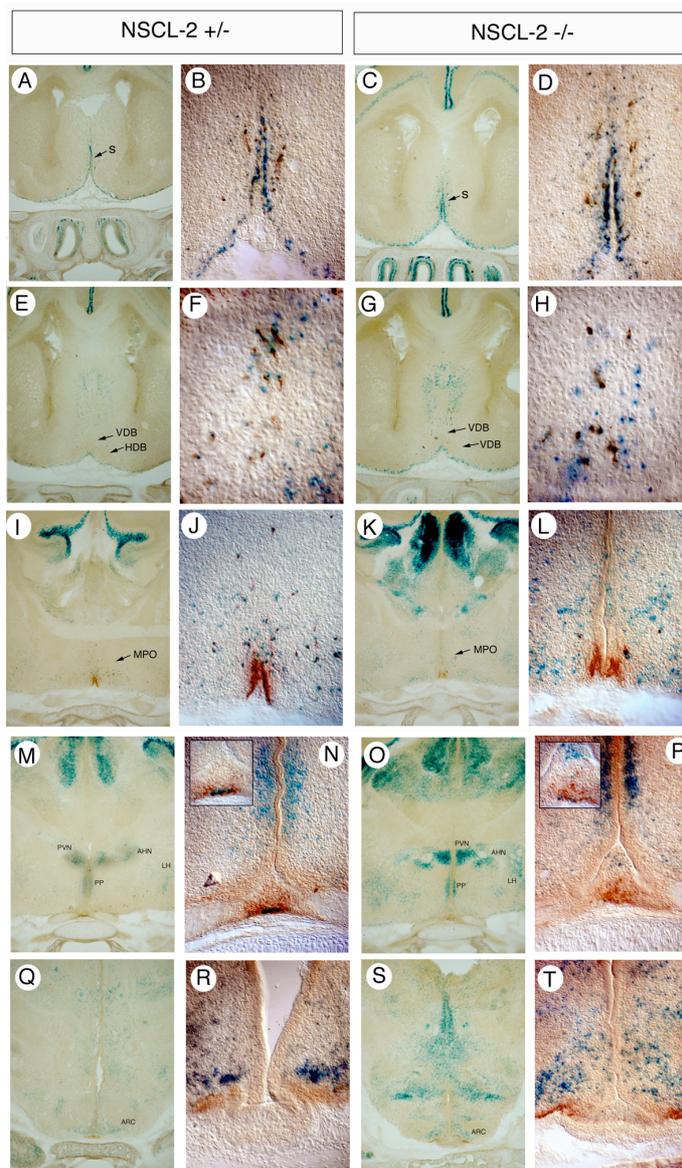


Abb. 11 Reduktion GnRH positiver Neurone in NSCL-2 homozygoten Mutanten bei E18,5.

Frontale Kryotomschnitte (Schnittdicke 50µm). A-P zeigen jeweils Schnitte aus repräsentativen rostralen Bereichen. Vor allem zwischen septalen und präoptischen Gebieten lassen sich die meisten GnRH positiven Neurone detektieren. Die Ausschnittsvergrößerungen (B,D; F,H, J,L) zeigen deutliche Kolokalisierungen von NSCL-2 und GnRH positiven Neuronen in rostralen Bereichen. In den mehr kaudal gelegenen Bereichen des paraventriculären Nucleus und Arcuatus Nucleus sind keine GnRH positiven Neurone detektierbar. In Q-T sind im Bereich der Eminentia medialis lediglich GnRH positive Axone detektierbar und keine GnRH positiven Zellkörper. In homozygoten Mutanten konnte eine leichte Reduktion in der Menge von GnRH positiven Zellen und Nervenfasern beobachtet werden.

Abkürzungen:

AHN Nucleus anterior hypothalami, ARC Nucleus arcuatus, HDB Horizontaler „Nucleus of the Diagonal Band of Broca“, LHA Laterales Hypothalamisches Gebiet, MPO Nucleus medialis präopticus, PVN Nucleus paraventricularis, PP Nucleus periventricularis S Septum VDB Vertikales „Diagonal Band of Broca“. Vergrößerung: Übersichten 100x Ausschnittsvergrößerungen 200x.

Neben diesen prominenten Expressionsdomänen finden sich weitere GnRH positive Neurone vor allem in lateralen Bereichen des Hypothalamus. Posterior gelegene Kerngebiete wie der Nucleus arcuatus zeigen hingegen keine GnRH positiven Neurone, sondern lediglich GnRH positive Axone, die eine Verbindung zur Adenohypophyse herstellen.

Die Analyse von Schnitten verschiedener embryonaler Entwicklungsstadien bestätigte eine Kolokalisierung von NSCL-2 und dem Gonadotropin-Releasing Hormon in einer Zelle (Abb.12).

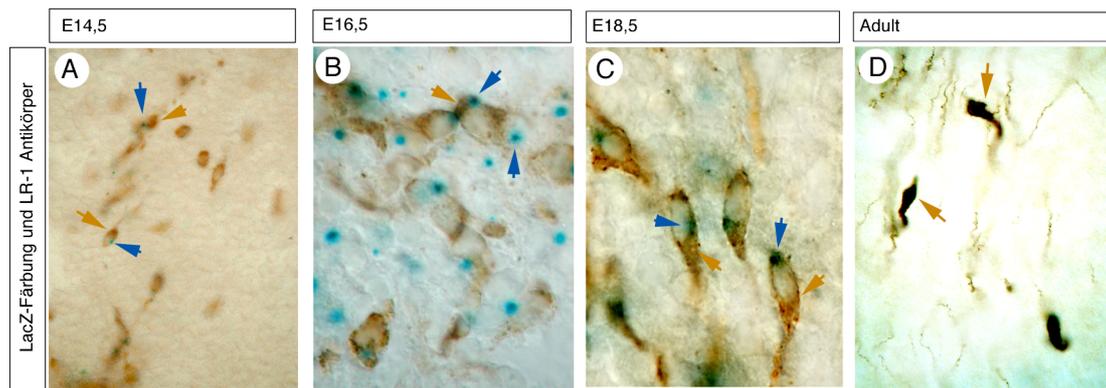


Abb.12: Kolokalisierung von NSCL-2/LacZ und Gonadotropin-Releasing Hormon in einer Zelle.

Kryotomschnitte (Schnittdicke $50\mu\text{m}$) wurden zunächst LacZ gefärbt. Danach folgte die immunhistochemische Darstellung des Gonadotropin-Releasing Hormons mit dem LR-1 Antikörper. (A-C) Zwischen E14,5 und E18,5 konnten NSCL-2/LacZ Signale in Gonadotropin-Releasing Hormon positiven Zellen detektiert werden. In adulten Stadien konnten hingegen keine NSCL-2/LacZ positiven Zellen mehr detektiert werden (D). Die blauen Pfeile markieren LacZ Signale; die braunen Pfeile markieren LR-1 positive Zellen. Vergrößerungen 1000x.

Eine statistische Analyse der Embryonalstadien E14,5- E18,5 wies eine deutliche Reduktion GnRH positiver Neurone in NSCL-2 homozygoten Mutanten ab E16,5 auf. Abbildung 13 verdeutlicht, daß vor allem in medialen präoptischen und lateralen hypothalamischen Bereichen eine Reduktion GnRH positiver Neurone zu verzeichnen ist. Die geringere Signalintensität innerhalb der Nervenfasern im Bereich des optischen Chiasma, welche von Neuronen aus anterioren Kerngebieten stammen, bestätigte die reduzierte Anzahl GnRH positiver Neurone in NSCL-2 homozygoten Tieren. Ein Vergleich von männlichen und weiblichen homozygoten Mutanten zeigte die gleiche Reduktion GnRH positiver Neurone im Verhältnis zur Wildtyp Situation (nicht gezeigt). Das Diagramm 1 auf Seite 63 gibt eine Zusammenfassung über die absoluten Zahlen GnRH positiver Neurone während embryonaler Entwicklungsstadien E14,5 – E18,5 und der adulten Situation.

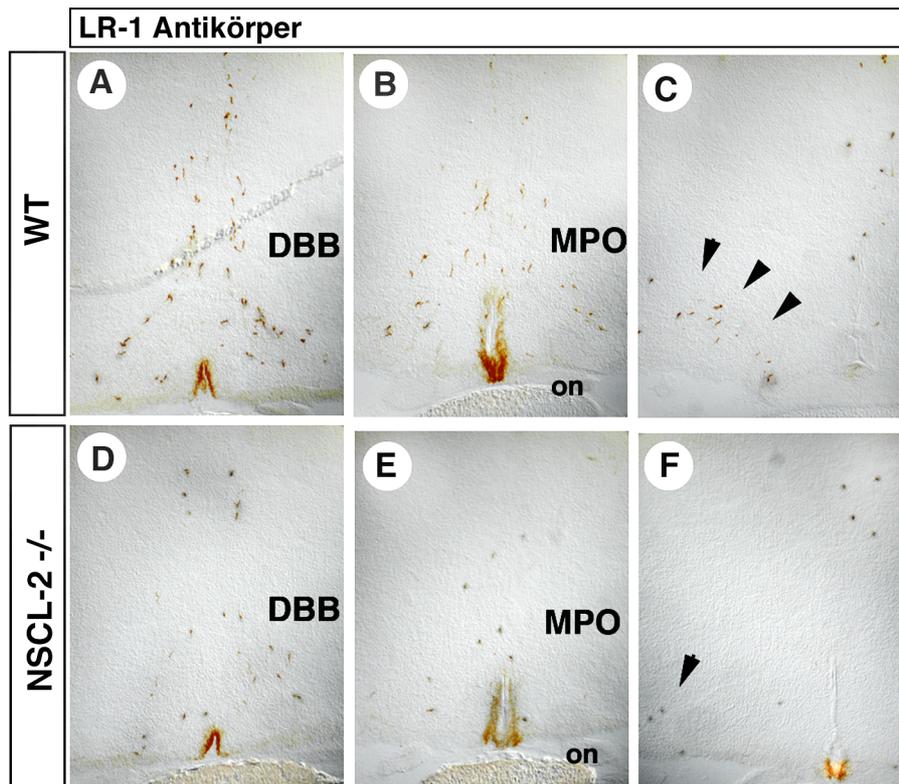


Abb.13 Reduzierte Anzahl GnRH positiver Neurone bei E18,5 in NSCL-2 homozygoten Mutanten

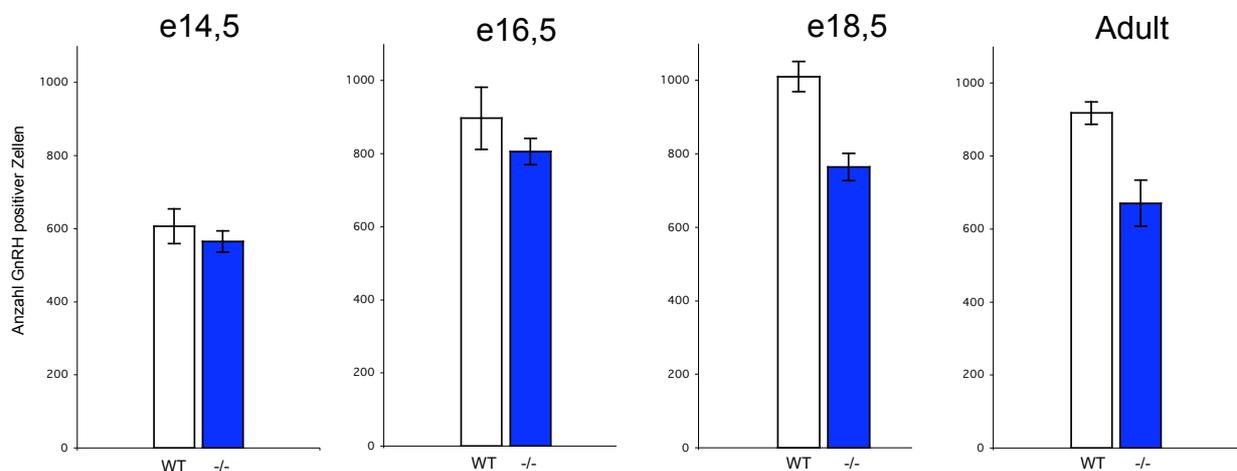
Nach Fixierung und Kryoprotektion wurden benachbarte frontale Kryotomschnitte (Schnittdicke 50µm) hergestellt. GnRH positive Neurone wurden immunhistochemisch mittels eines polyklonalen LR-1 Antikörpers detektiert. Gezeigt sind repräsentative Schnitte aus anterioren, medialen und posterioren Regionen des Hypothalamus. A-H Wildtyp; I-P NSCL-2 homozygote Mutanten. Neben einer Reduktion in präoptischen Bereichen zeigen vor allem laterale Bereiche eine deutliche Abnahme GnRH positiver Neurone. Laterale Bereiche sind durch Pfeilköpfe gekennzeichnet (G-H und O-P). Weiterhin ist eine deutliche Reduktion in der Signalintensität im Bereich des optischen Chiasma zu detektieren (B-E und J-M). Abkürzungen: DBB „Diagonal Band of Broca“, MPO Medialer Präoptischer Nucleus, S Septum, on optischer Nerv. Vergrößerung 100x.

3.2.7.2 Postnatale Verteilung GnRH positiver Zellen

Zur Analyse der postnatalen Verteilung GnRH positiver Neurone wurden entweder männliche oder weibliche Wildtyp Mäuse mit homozygoten NSCL-2 Mutanten Geschwisterpaaren verglichen (6 Monate alt). Da das Expressionsniveau von NSCL-2 postnatal in hypothalamischen Gebieten stark abnimmt, wurde bei adulten Entwicklungsstadien keine NSCL-2/LacZ Färbung durchgeführt. Zur immunhistochemischen Analyse wurden alle Schnitte vom Bulbus olfaktorius (anterior) bis zum Nucleus arcuatus (posterior) analysiert. Die Abbildung 14 bestätigt die deutliche Reduktion GnRH positiver Neurone bei adulten NSCL-2^{-/-} Mutanten. Vor allem in präoptischen und lateralen Bereichen ist eine starke Abnahme zu detektieren.

Diagramm 1: Reduktion GnRH positiver Neurone in NSCL-2 homozygoten Mutanten

Zu jedem Entwicklungsstadium wurden je drei Wildtyp und homozygote Mutanten, aus dem gleichen Wurf, verglichen (n=3). Neben den Mittelwerten wurden die Standardabweichungen berechnet. Das entsprechende Balkendiagramm zeigt die Abnahme GnRH positiver Neurone bei E14,5; E16,5; E18,5 und Adult (6 Monate).



	E14,5	E16,5	E18,5	Adult*
WT	607 +/- 47	897 +/- 85	1010 +/- 41	918 +/- 30
NSCL-2 -/-	564 +/- 28	806 +/- 36	764 +/- 37	671 +/- 62
Reduktion in %	7%	11%	24%	27%
P	P > 0,1	P > 0,1	P < 0,01	P < 0,01

Die statistische Auswertung erfolgte mittels Studentischen t-Test. Die Auswertung ergab bei den Stadien E14,5 und E16,5 zwar eine leichte Reduktion GnRH positiver Zellen in NSCL-2 mutanten Mäusen, aber der Unterschied zwischen den beiden Meßreihen war nicht signifikant ($P > 0,1$). Die Auswertung der Stadien E18,5 und Adult (6 Monate) ergab hingegen eine signifikante Abnahme GnRH positiver Zellen in NSCL-2 mutanten Mäusen.

* Bei ausgewachsenen Tieren wurde der Bereich zwischen präoptischen Gebiet und Eminentia mediana auf GnRH positive Zellen überprüft. Rostrale Bereiche des Gehirns in denen einige wenige GnRH positive Zellen lokalisiert sind wurden daher nicht berücksichtigt. Im Anhang 6.3 befindet sich eine komplette Aufstellung aller Schnittebenen.

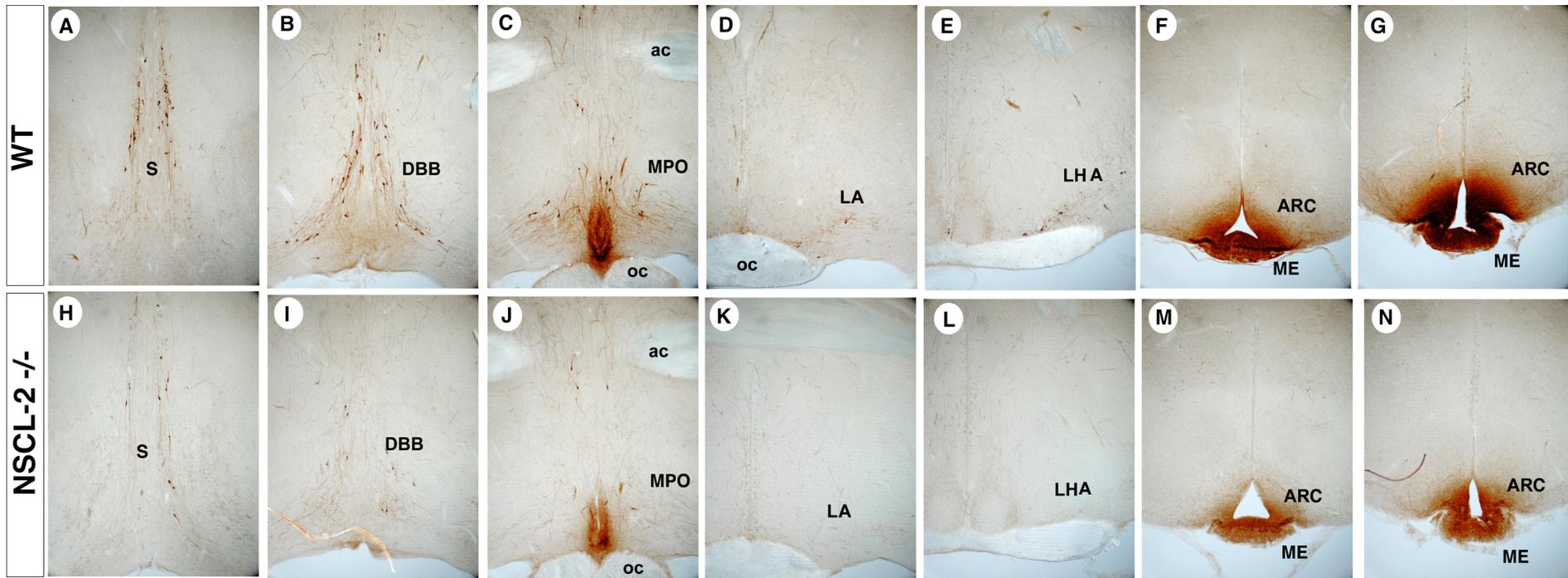


Abb.14 Reduktion von GnRH positiven Neuronen in adulten NSCL-2 homozygoten Mutanten.

Frontale freischwebende Schnitte (Schnittdicke $50\mu\text{m}$) wurden immunhistochemisch angefärbt (Antikörper LR-1). Repräsentative Schnittebenen aus septalen, präoptischen und lateralen Bereichen zeigen eine Abnahme GnRH positiver Neurone in Mutanten. Neben einer reduzierten Anzahl ist auch eine geringere Signalintensität von Nervenfasern im Bereich des Nucleus arcuatus zu detektieren. Abkürzungen: ac Commissura anterior, ARC Nucleus arcuatus, DBB „Nucleus of the Diagonal Band of Broca“, LA Nucleus latero-anterior Hypothalami, LHA Laterales hypothalamisches Gebiet, MPO Nucleus medialis präopticus, on optischer Nerv, S Septum, ME Eminentia medialis, Vergrößerung 100x.

Zur besseren Auflösung der Reduktion von GnRH positiven Zellen wurden jeweils die einzelnen frontalen Schnittebenen von Wildtyp und mutanten Mäusen verglichen. Neben der Reduktion von GnRH positiven Zellen in präoptischen Bereichen (Objektträger 12-20) konnte auch eine Abnahme in posterioren Bereichen (Objektträger 21-26) bestätigt werden.

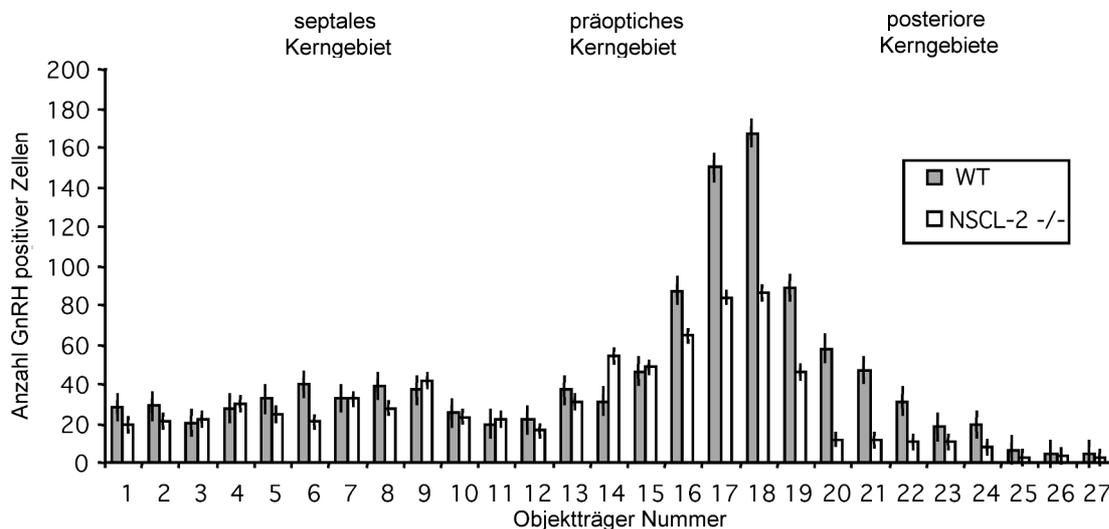


Diagramm 3: Abnahme GnRH positiver Zellen in präoptischen und posterioren Kerngebieten.

Pro Objektträger wurden jeweils 3 frontale Schnitte (Schnittdicke 50 μm) zusammengefaßt. In septalen Bereichen (Objektträger 1-11) wurde eine leichte Abnahme GnRH positiver Zellen detektiert. In präoptischen (Objektträger 12-20) und posterioren (Objektträger 21-26) Kerngebieten konnte eine deutliche stärkere Reduktion GnRH positiver Zellen bei NSCL-2 mutanten Mäusen beobachtet werden.

3.2.8 NSCL-2 defiziente Mäuse zeigen nach der Pubertät einen erhöhten Nahrungsbedarf

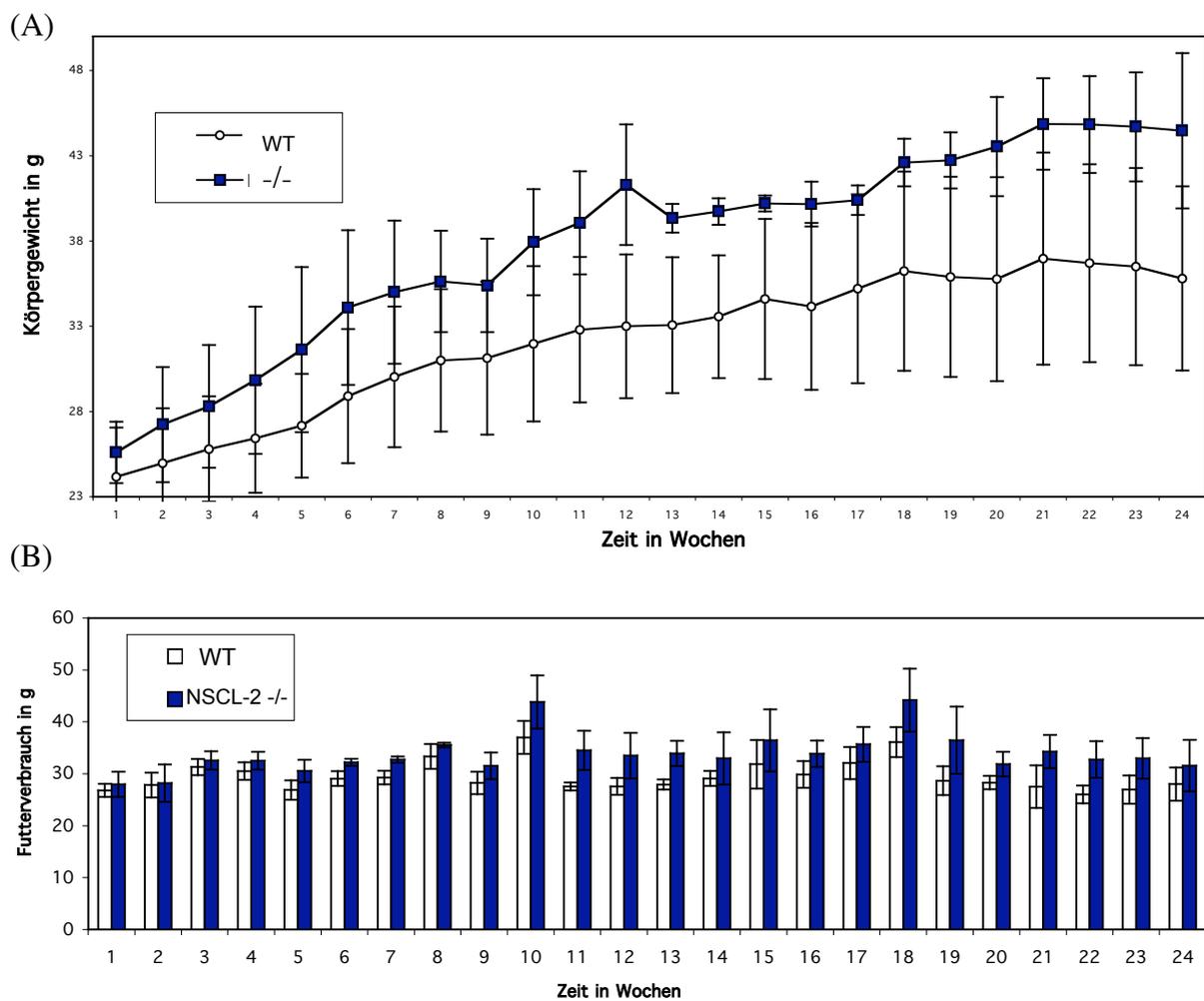
Good und Mitarbeiter konnten weiterhin zeigen, daß NSCL-2 defiziente männliche und weibliche Tiere einen deutlichen Anstieg des Körpergewichts nach der Pubertät zeigen. Eigene Untersuchungen bestätigten die Gewichtszunahme nach der Pubertät (siehe Diagramm 2). Da die Ausprägung des Phänotyps in vielen Fällen vom genetischen Hintergrund abhängig ist, wurde der 129Sv/C57Bl/6J Hybridstamm bis zur siebten Generation auf einen C57Bl/6J Hintergrund gekreuzt (>99% C57/BL Hintergrund). Die Analyse von NSCL-2^{-/-} (C57Bl/6J F7) Mutanten ergab keine veränderte Ausprägung des Phänotyps (nicht gezeigt).

Zur Klärung der Frage, ob die Zunahme des Körpergewichts bei NSCL-2^{-/-} Mutanten durch eine erhöhte Nahrungsaufnahme erfolgt, wurden je 5 Paare, sechs Wochen alte weibliche Wildtyp Mäuse und NSCL-2^{-/-} Mutanten für 6 Monate isoliert gehalten. Die Gewichtszunahme und der entsprechende Nahrungsverbrauch wurden wöchentlich

festgehalten. Die Analyse ergab neben einer deutlichen Gewichtszunahme (30%) auch ein erhöhten Futterverbrauch bei NSCL-2 $-/-$ Mutanten. Ein Vergleich des Futterverbrauchs nach 6 Monaten ergab eine Erhöhung um 16% bei NSCL-2 $-/-$ Mäusen gegenüber den Wildtyp-Kontrollen. Die absoluten Zahlen sind im folgenden Diagramm 3 dargestellt.

Diagramm 3: Gewichtszunahme durch erhöhten Nahrungsverbrauch.

Je 5 weibliche NSCL-2 $-/-$ Mutanten und 5 weibliche Wildtyp Mäuse wurden für 24 Wochen isoliert gehalten (n=5). Alle Tiere waren zu Beginn des Versuchs 6 Wochen alt. Der Futterverbrauch und die Gewichtszunahme wurden wöchentlich festgehalten. Nach 24 Wochen zeigten die NSCL-2 $-/-$ Mutanten eine 30%ige Erhöhung ihres Körpergewichts (A). Das Balkendiagramm (B) zeigt den jeweiligen Futterverbrauch pro Woche. Die weißen Punkte bzw. Balken stellen die Wildtyp Situation dar. Die Mutanten sind durch blaue Kästchen und Balken gekennzeichnet. Die Punkte bzw. Balken stellen den Mittelwert mit der entsprechenden Standardabweichung dar. Die statistische Auswertung mittels Student Test ergab eine signifikante Zunahme des Körpergewichts und eine signifikant erhöhten Futterverbrauch um 16% innerhalb 24 Wochen (C).



(C)

	Gewicht in g Anfang	Gewicht in g Ende (nach 24Wochen)	Futterverbrauch total (24 Wochen)
WT	25,7 +/- 4,2	32,1 +/- 4,2	661,8 +/- 33,8
NSCL-2 -/-	26,9 +/- 4,9	45,6 +/- 3,1	787,3 +/- 47,6
Zunahme in %	-	30 %	16 %
P	-	P < 0,001	P < 0,001

3.2.9 Das Neuropeptid Y – NPYY1 Rezeptor System

Neben dem Gonadotropin-Releasing Hormon spielen noch eine Reihe weiterer Faktoren bei der Regulation des reproduktiven Systems eine wichtige Rolle. Immunhistochemische Untersuchungen haben gezeigt, daß zwischen Neuropeptide Y und GnRH positiven Neuronen synaptische Kontakte bestehen. Eine mögliche Funktion NPY positiver Neurone könnte in der Modulation der Aktivität GnRH positiver Neurone bestehen. So haben Wilding und Mitarbeiter gezeigt, (Wilding *et al.*, 1997) daß bei erhöhtem NPY Spiegel z.B. durch externe NPY-Injektion, eine Reduktion des Luteinisierenden Hormons bzw. eine Inhibition der GnRH Sekretion auftritt. Weitgehend ungeklärt ist die Rolle der bisher identifizierten 5 NPY Rezeptor Subtypen. Zumindest für den NPY Y1 Rezeptor konnte eine Kolo-kalisierung mit GnRH positiven Nervenfasern im Bereich der Eminentia medialis nachgewiesen werden (Chien *et al.*, 1999). Ob eine Modulation von GnRH Neuronen durch NPY über den NPY Y1 Rezeptor gesteuert wird, ist jedoch noch unklar. In der vorliegenden Analyse wurde mittels Immunhistochemie untersucht, ob in NSCL-2 homozygoten Mutanten eine Veränderung des NPY-NPY Y1 Rezeptor Systems vorliegt.

3.2.9.1 NSCL-2-/- Mutanten zeigen nur im zerebralen Kortex eine reduzierte Anzahl NPY positiver Neurone

Im Gehirn läßt sich Neuropeptide Y im zerebralen Kortex, Hippokampus, Thalamus Hypothalamus und im Gehirnstamm detektieren. Durch immunhistochemische Untersuchungen konnte gezeigt werden, daß NPY positive Neurone, ausgehend vom Gehirnstamm und Nucleus arcuatus, Nervenfasern in Bereiche des Nucleus paraventricularis

projizieren (zur Übersicht siehe Widdowson et al., 2000). Neben einer möglichen Modulation der Aktivität GnRH positiver Neurone, spielt das NPY bei der Gewichtsregulation eine wichtige Rolle. So führt ein erhöhter NPY Spiegel bei Nagetieren, neben der Inhibierung der GnRH Sekretion, auch zu einem deutlichen Anstieg der Nahrungsaufnahme (Karla et al., 1991).

Zur immunhistochemischen Analyse NSCL-2 defizienter Mäuse stand ein polykloner Anti-NPY Antikörper zur Verfügung, der zur Anfärbung freischwebender Schnitte (Schnittdicke $50\mu\text{m}$) und von Paraffinschnitten (Schnittdicke $10\mu\text{m}$) benutzt wurde.

Im zerebralen Kortex NSCL-2 defizienter Mäuse konnte eine Abnahme NPY positiver Zellen detektiert werden. Die statistische Auswertung von jeweils 14 Schnitten (Schnittdicke $50\mu\text{m}$) aus dem Kortex ergab eine leichte Reduktion NPY positiver Zellen in NSCL-2 defizienten Mutanten gegenüber Kontrolltieren. Zur Auswertung wurden jeweils Ausschnitte aus medialen Bereichen der Großhirnhemisphären verglichen (siehe Anhang).

	NPY positive Zellen
Wildtyp	1221 \pm 45
NSCL-2 -/-	948 \pm 31
Reduktion	22 %
P	P < 0,05

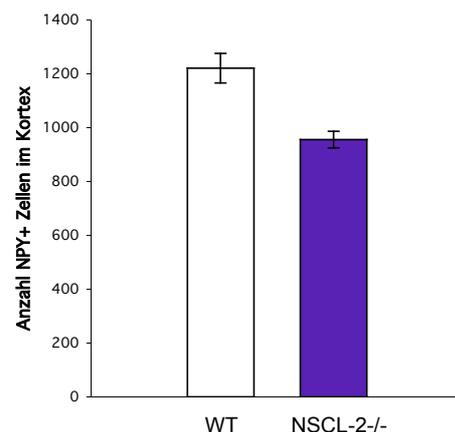


Diagramm 3: Reduzierte Anzahl NPY positiver Zellen im zerebralen Kortex bei NSCL-2 -/- Mutanten.

Freischwebende Vibratomschnitte (Schnittdicke $50\mu\text{m}$) wurden mit einem anti-NPY Antikörper angefärbt. Zur statistischen Auswertung wurden von rostral nach caudal 14 repräsentative Schnittebenen aus rostralen, medialen und kaudalen Bereichen ausgewählt. Es wurden 2 adulte Paare, jeweils aus dem gleichen Wurf, untersucht (n = 2). In der Tabelle sind die totalen Zahlen NPY positiver Zellen angegeben. Im Anhang 6.3 sind die ausgewerteten Schnittebenen dargestellt.

Abbildung 15 stellt repräsentative Paraffinschnitte aus rostralen, medialen und kaudalen Regionen der Großhirnhemisphären dar, welche die Abnahme NPY positiver Zellen in NSCL-2 -/- Mutanten bestätigten. Die Schnitte wurden zur Darstellung der Kerne mit Hämatoxylin gefärbt. Eine Veränderung der absoluten Zellzahl konnte in NSCL-2 -/- Mutanten gegenüber Kontrolltieren nicht detektiert werden.

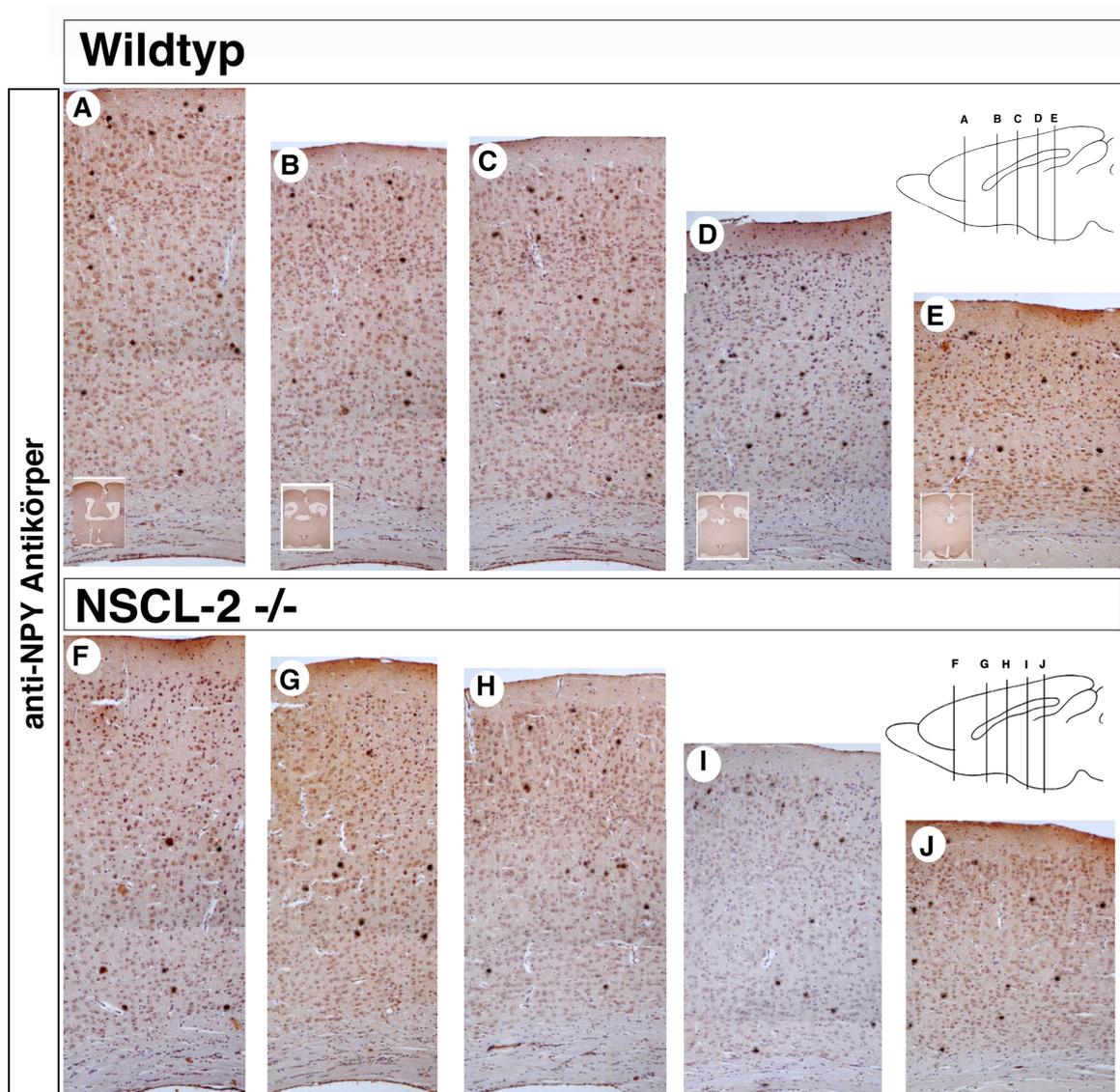


Abb.15 Reduzierte Anzahl NPY positiver Zellen im zerebralen Kortex.

Repräsentative frontale Paraffinschnitte (Schnittdicke $10\mu\text{m}$) des zerebralen Kortex adulter Gehirne. A-E Wildtyp Situation; F-J NSCL-2 $-/-$. Die NPY Antikörper- Anfärbung zeigt eine Reduktion von NPY positiven Zellen im zerebralen Kortex von NSCL-2 Nullmutanten. Ein Vergleich laminaer Strukturen der verschiedenen Kortex Regionen zeigte keine Veränderungen. In den schematischen Gehirndarstellungen sind die Schnittebenen markiert. Die Ausschnitte am unteren linken Bildrand zeigen Übersichten (25x) der ausgewählten Schnittebenen. Vergrößerung 200x.

Abbildung 16 zeigt die Verteilung NPY immunoreaktiver Nervenfasern im Bereich hypothalamischer Kerngebiete. Dargestellt sind der Nucleus paraventricularis und der Nucleus supra-chiasmaticus. Ob es sich bei den Signalen im Bereich des Nucleus arcuatus um NPY positive Nervenzellen handelt oder ebenfalls um Nervenfasern konnte nicht eindeutig festgestellt werden. Die vergleichende Analyse von NSCL-2 defizienten und Wildtyp Mäusen zeigte keine Veränderung innerhalb der angesprochenen hypothalamischen Kerngebiete (Abb.16 und 17).

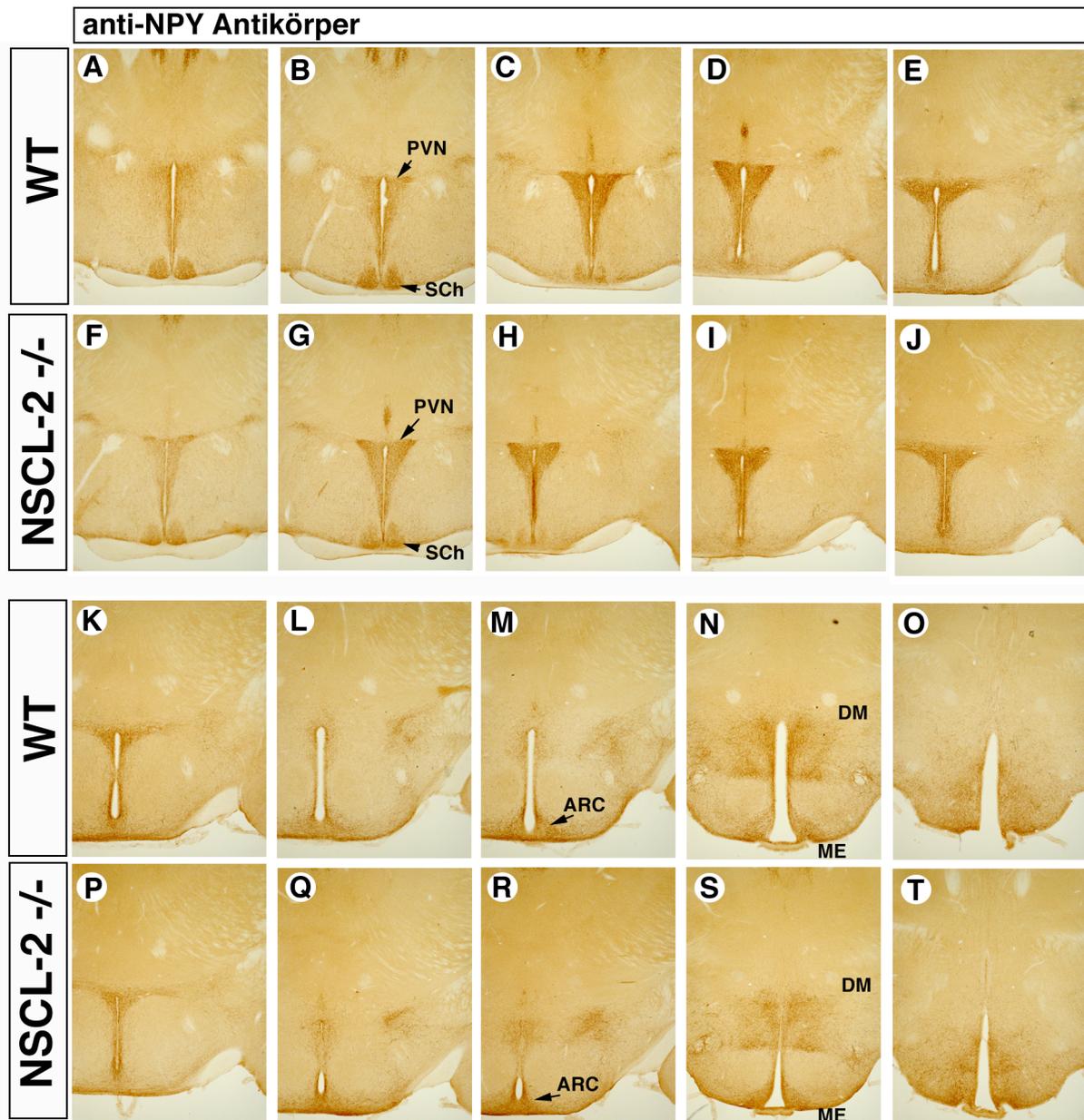


Abb.16 Keine Veränderung von NPY positiven Nervenfasern in NSCL-2 defizienten Mutanten. Benachbarte Frontalschnitte (Schnittdicke $50\mu\text{m}$) von adulten Wildtyp (A-E und K-O) Mäusen und NSCL-2 Mutanten (F-J und P-T). Die immunohistochemische Darstellung erfolgte mit einem polyklonalen anti-NPY Antikörper. Die frontalen Schnitte zeigen Ausschnittsvergrößerungen verschiedener hypothalamischer Kerngebiete von rostral nach kaudal. Im Bereich NPY positiver Kerngebiete (Nucleus paraventricularis, Nucleus supra-chiasmaticus, Nucleus arcuatus) sind keine Unterschiede in der Intensität und Anzahl der Nervenfasern zu detektieren. Abkürzungen: ARC Nucleus arcuatus, DM Nucleus dorsomedialis hypothalami, PCN Nucleus paraventricularis, SCh Nucleus supra-chiasmaticus, ME Eminentia medialis. Vergrößerung 100x.

Eine genauere Analyse der Zytoarchitektur einzelner Zellen bzw. Nervenfasern wurde durch die Auswertung NPY angefärbter Paraffinschnitte geführt (Abb.17). In Übereinstimmung mit den in Abbildung 16 dargestellten Ergebnissen ergab die Auswertung einzelner Bereiche innerhalb verschiedener Kerngebiete keine Veränderung von NPY positiven Nervenfasern in NSCL-2 defizienten Mutanten.

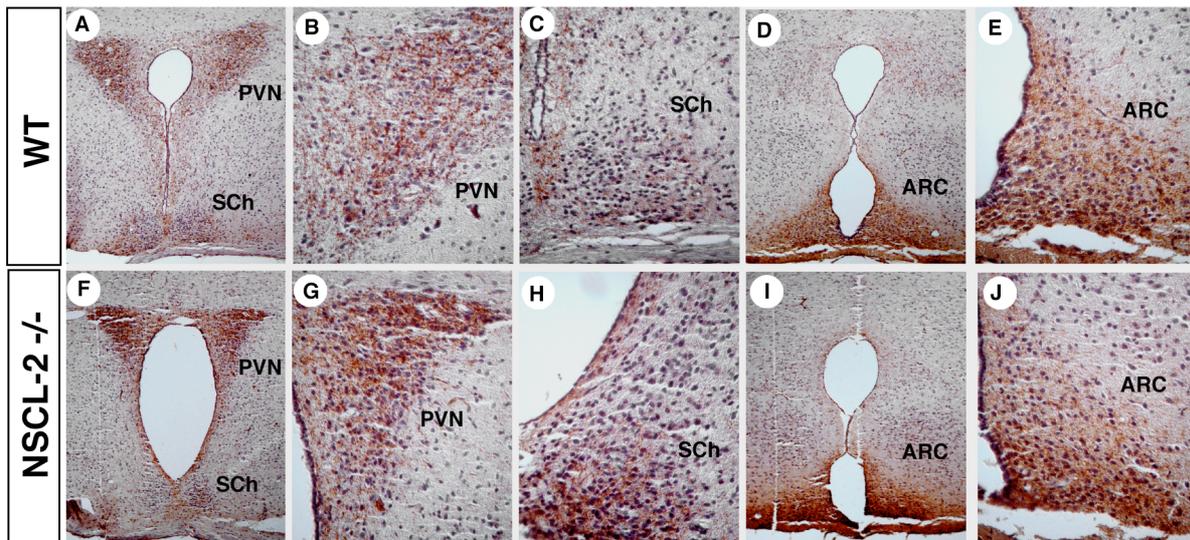


Abb.17 Frontale Paraffinschnitte durch hypothalamische Kerngebiete zeigen keine Veränderung NPY positiver Nervenfasern bei NSCL-2 defizienten Mäusen. Ein Vergleich der prominentesten NPY positiven Kerngebiete zeigt keine Veränderung in der Anzahl der Nervenfasern. A,F und D,I zeigen jeweils Übersichten über den Nucleus paraventricularis und Nucleus suprachiasmaticus bzw. den Nucleus arcuatus. In B,C und G,H sind Ausschnittsvergrößerungen des PVN und Sch dargestellt. E und J zeigen Ausschnitte aus dem Nucleus arcuatus. Leichte Unterschiede in Form und Größe der dargestellten Kerngebiete sind auf geringfügig abweichende Schnittebenen zu erklären. Abkürzungen: ARC Nucleus arcuatus, PVN Nucleus paraventricularis, Sch Nucleus Suprachiasmaticus. Vergrößerungen: A,D und F,I 100x; B,C,E und G,H,J 200x.

3.2.9.2 Reduktion des NPY Y1 Rezeptors in NSCL-2 defizienten Mutanten.

Von den bisher 6 isolierten NPY Rezeptor Subtypen, konnte nur für den NPY Y1 Rezeptor eine Kolokalisation mit GnRH positiven Nervenfasern im Bereich der Eminentia medialis gefunden werden (Chien et al., 1999). Die immunhistochemische Analyse, zeigte in NSCL-2 Mutanten eine deutliche Abnahme NPY Y1 positiver Nervenzellen. Im Bereich des Nucleus arcuatus von NSCL-2^{-/-} Mutanten fand sich eine Reduktion um 34% NPY Y1 positiver Zellen (siehe Diagramm 4 Seite 73).

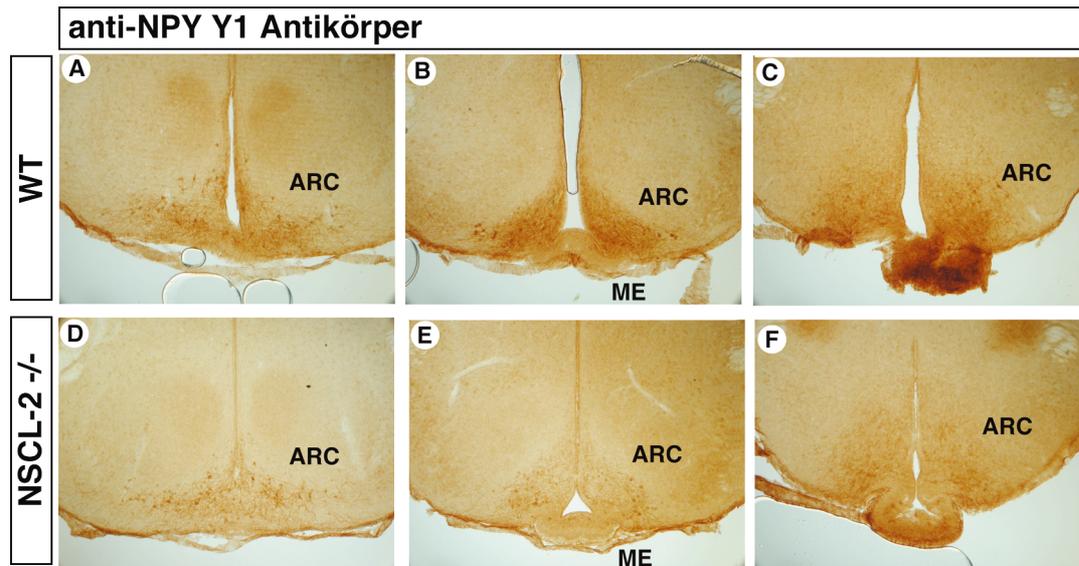


Abb.18: NSCL-2 Nullmutanten zeigen eine deutliche Reduktion des NPY Y1 Rezeptors.

Frontale Schnitte (Schnittdicke $50\mu\text{m}$) durch den Nucleus arcuatus von adulten Wildtyp Gehirnen (A-C) und NSCL-2 $-/-$ Mutanten Gehirnen. Die Schnitte wurden mit einem Anti-NPY Y1 polyklonalen Antikörper (aus Kaninchen) hybridisiert. NSCL-2 homozygote Tiere zeigen eine geringere Anzahl NPY Y1 positiver Zellen. Abkürzungen: ARC Nucleus arcuatus, ME Eminentia medialis. Vergrößerung 100x. Die statistische Auswertung ist in Diagramm 4 dargestellt

3.2.9.3 NSCL-2 mutante Mäuse zeigen eine fehlende Anpassung der Expression von NPY Y1 Rezeptoren bei Nahrungsmangel

Eine Reduktion der Nahrungsaufnahme führt in Wildtyp Mäusen zu einer Reduktion der Sekretion von NPY und als Folge dessen zu einer Herunterregulation des NPY Y1 Rezeptors. Um zu überprüfen ob dieser Regulationsmodus in NSCL-2 mutanten Tieren mit ihrer erniedrigten Expression von NPY Y1 Rezeptoren erhalten geblieben ist, wurden die NSCL-2 mutanten Tiere, neben einer entsprechenden Anzahl an Kontrolltieren, einer 48 Std. Nahrungskarenz ausgesetzt. Wie im Diagramm 4 zu sehen ist verändert sich die Anzahl von NPY Y1 positiven Neuronen in NSCL-2 Mutanten nicht, wohingegen in Wildtyp- Tieren eine deutliche Reduktion zu beobachten ist.

	ad libitum	48h ohne Nahrung	Reduktion 48h ohne Nahrung
WT	944 +/- 124	714 +/- 42	24%
NSCL-2 $-/-$	623 +/- 39	621 +/- 19	> 0,5%
Reduktion	34%	13%	
P	P < 0,001	-	-

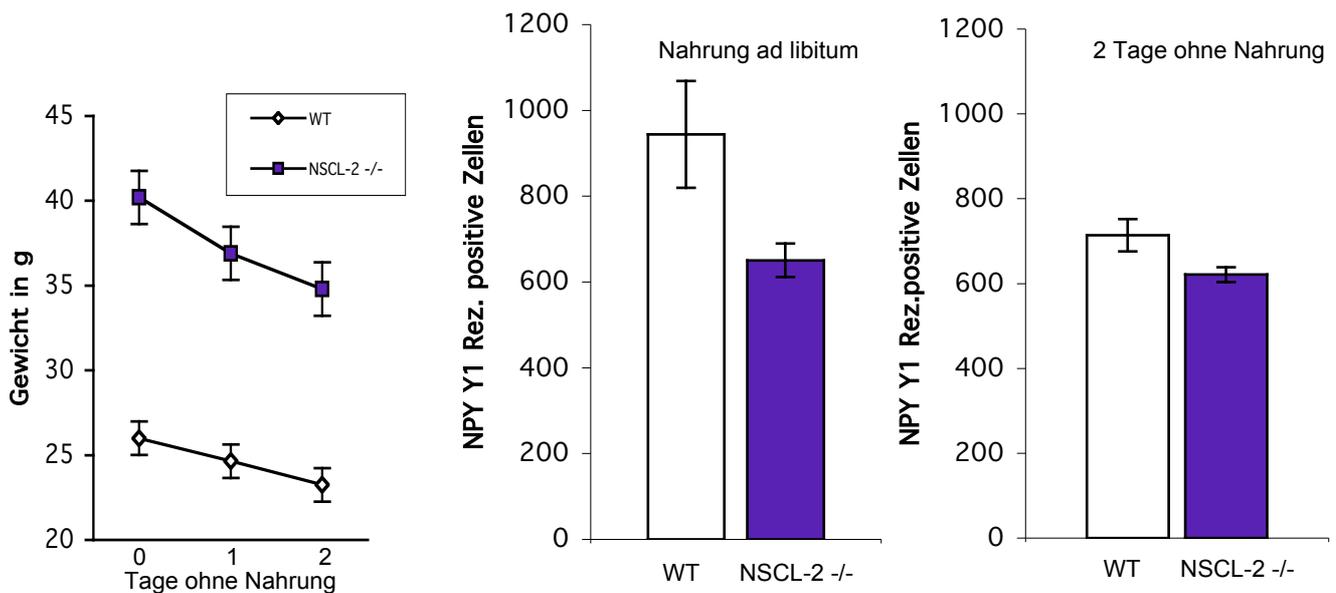


Diagramm 4: Reduzierte Anzahl NPY Y1 Rezeptor positiver Nervenzellen in NSCL-2 -/- Mutanten.

Die Auswertung frontaler Serienschritte durch den Nucleus arcuatus ergab eine Abnahme um 34% bei NSCL-2 defizienten Mäusen. Angegeben sind die Mittelwerte mit den entsprechenden Standardabweichungen (n=2). Weiterhin ergab ein Nahrungsmangel für 48h eine deutliche Reduktion NPY Y1 Rezeptor positiver Zellen in der Wildtyp Situation. In der NSCL-2 -/- Mutante blieb die gegenüber der Wildtyp Situation reduzierte Anzahl unverändert.

3.2.10 Reduktion POMC (ACTH) positiver Zellen im Nucleus arcuatus von NSCL-2 homozygoten Mutanten.

Das ProOpiomelanocortin (POMC) Vorläufer Protein wird im Hypothalamus (Nucleus arcuatus) sowie im vorderen und intermediären Lappen der Hirnanhangsdrüse synthetisiert (Lamelot et al., 2001). Durch posttranslationale Prozessierung entstehen die Peptide β -Endorphin, β -Lipoprotein, β -MSH und das Adrenocorticotrope Hormon (ACTH). Durch die Etablierung verschiedener transgener Mauslinien, in denen beispielsweise das POMC Gen deletiert wurde, konnte eine kritische Rolle des POMC-Gens bei der Gewichtsregulation nachgewiesen werden. Um die Expression von POMC (ACTH) im Hypothalamus bzw. in der Hypophyse NSCL-2 mutanter Mäuse zu untersuchen, wurden Antikörperanfärbungen gegen das Adrenocorticotrope Hormon (ACTH) durchgeführt. Die Anzahl POMC (ACTH) positiver Neurone in NSCL-2 -/- Mutanten ist gegenüber der Wildtyp Situation stark reduziert. So ergab die statistische Auswertung ACTH positiver Neurone eine Abnahme um 60%. Innerhalb des Hypophysenvorderlappens (Adenohypophyse) und im intermediären

Hypophysenlappen konnte keine Abnahme POMC (ACTH) positiver Zellen detektiert werden (Abb.19).

	POMC (ACTH) - Hypothalamus
WT	1567 +/- 24
NSCL-2 -/-	616 +/- 18
Reduktion	60%
P	P < 0,001

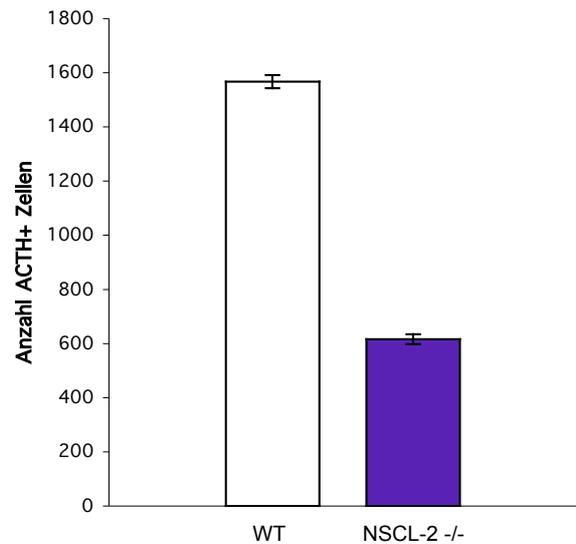


Diagramm 5: Abnahme POMC (ACTH) positiver Zellen im Bereich des Nucleus arcuatus von NSCL-2 -/- Mutanten. Immunhistochemische Detektion ACTH(POMC) positiver Neurone. Es wurden alle ACTH(POMC) positiven Zellen aus dem Bereich des Nucleus arcuatus von Wildtyp und NSCL-2-/- Mutanten gezählt. Angegeben ist der Mittelwert mit entsprechender Standardabweichung (n=2).

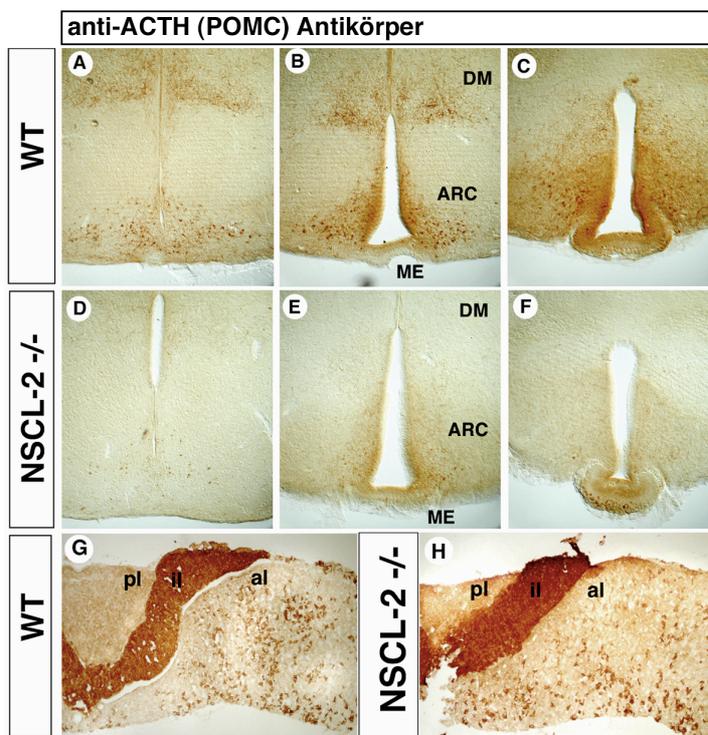


Abb.19: Reduktion POMC (ACTH) positiver Zellen im Nucleus arcuatus bei NSCL-2 -/- Mutanten.

Repräsentative frontale Vibratomschnitte durch den Nucleus arcuatus. Der anti ACTH Antikörper markiert auch POMC positive Neurone. (A-C Wildtyp), (D-F) NSCL-2-/- . Neben der Abnahme POMC (ACTH) positiver Zellen im Bereich des Arcuatus Nucleus, läßt sich eine Reduktion von POMC (ACTH) positiven Nervenfasern im Nucleus dorsomedialis detektieren. In G und H sind jeweils frontale Schnitte durch die Hypophyse gezeigt. POMC (ACTH) positive Zellen finden sich im vorderen (Adenohypophyse) und im intermediären Lappen der Hypophyse. Ein Vergleich zwischen Wildtyp und Mutante zeigt keine Abnahme POMC (ACTH) positiver Zellen in diesem Bereich. Die im Vergleich zum Wildtyp scheinbar kleinere Neurohypophyse der Mutante ist durch eine leichte Verschiebung der Schnittebene bedingt. Abkürzungen: al Hypophysenhinterlappen (Neurohypophyse), ARC Nucleus arcuatus, DM Nucleus dorsomedialis, il intermediärer Hypophysenlappen, pl Hypophysenvorderlappen (Adenohypophyse). Vergrößerung 100x. Siehe auch Anhang 6.3)

3.2.11 Analyse des Leptinrezeptors

Das Hormon Leptin und der entsprechende Leptinrezeptor wurden durch die Analyse zweier Mauslinien entdeckt, welche unter Fettleibigkeit, Infertilität und Diabetes leiden. Leptin wird von Adipozyten sezerniert und wirkt über den Leptinrezeptor als Sättigungsfaktor in hypothalamischen Kerngebieten. In der Ob/Ob (obesity/obesity) Mauslinie wird von Fettzellen kein Leptin sezerniert, so daß ein fehlendes Sättigungssignal zu einer dramatischen Gewichtssteigerung führt. Eine exogene Gabe von Leptin führt bei diesen Mäusen zu einer deutlichen Gewichtsreduzierung. In der Mauslinie db/db (diabetes /diabetes) führt eine externe Zugabe von Leptin nicht zu einer Gewichtsreduktion, da in dieser Mauslinie eine Mutation des Leptinrezeptors vorliegt.

Untersuchungen von Good und Mitarbeitern haben gezeigt, daß in NSCL-2^{-/-} Mutanten der Leptinspiegel um den Faktor 2,5 - 5 erhöht ist (Good et al, 1997). Good und Mitarbeiter vermuten eine mögliche Dysregulation des Leptin-Rezeptors (Good 2000). Eine weitere mögliche Erklärung für die auftretende Fettleibigkeit könnte eine durch den erhöhten Leptinspiegel vermittelte Leptinresistenz sein, wie sie beispielsweise beim Insulinrezeptor zu finden ist. Ob NSCL-2 tatsächlich als positiver Transkriptionsfaktor direkt auf den Promotor des Leptinrezeptors wirkt, wie von Good und Mitarbeitern postuliert, ist jedoch weiterhin unklar (Good, 2000).

Mit Hilfe eines Antikörpers gegen den Leptin-Rezeptor wurde das Vorkommen Leptin-Rezeptor positiver Zellen im Hypothalamus NSCL-2 mutanter Mäuse untersucht. Wie in Abb.20 dargestellt fand sich keine signifikante Reduktion der betreffenden Neurone. Aufgrund des breiten Expressionsmusters des Leptin-Rezeptors in verschiedenen hypothalamischen Kerngebieten, kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, daß geringfügige Änderungen in der Verteilung Leptin-Rezeptor positiver Zellen vorliegen. Neben der Antikörperanfärbung mit einem polyklonalen Anti-Leptinrezeptor Antikörper wurden die Paraffinschnitte mit Hämatoxylin (blaue Kernfärbung) angefärbt (Abb.20).

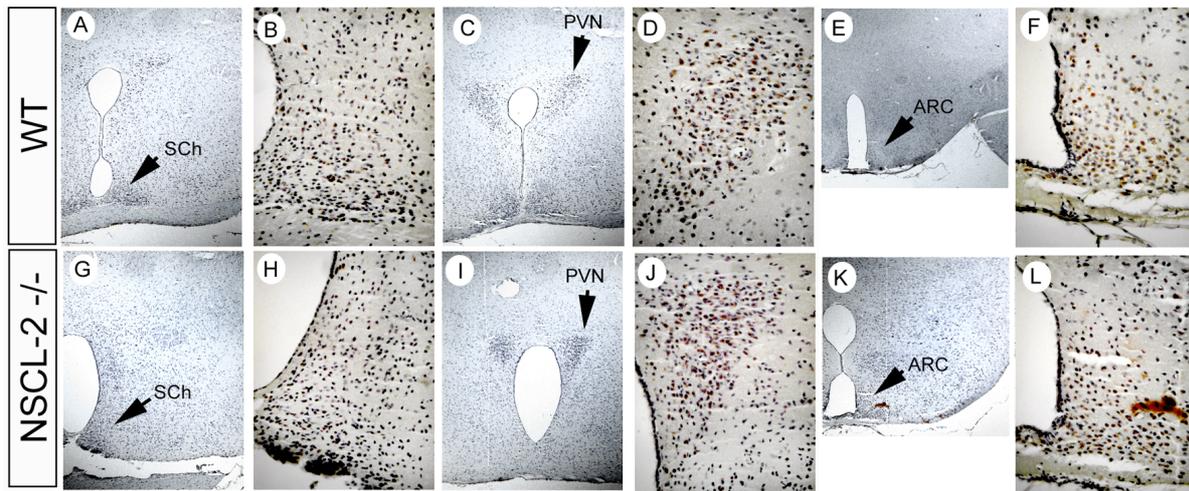


Abb.20: Im Nucleus paraventricularis und Nucleus arcuatus von NSCL-2 mutanten Mäusen findet sich eine normale Expression des Leptin-Rezeptors.

Die frontalen Paraffinschnitte (Schnittdicke $10\mu\text{m}$) wurden mit einem polyklonalen anti-Leptinrezeptor Antikörper hybridisiert. Die Darstellung der Zellkerne erfolgte mittels Hämatoxylin Anfärbung. A-F Wildtyp-Situation und G-L homozygot für NSCL-2. In A,C,E und G, I, K sind jeweils Übersichten mit einer 50 fachen Vergrößerung dargestellt. Die Ausschnittsvergrößerungen zeigen den Nucleus supra-chiasmaticus, den Nucleus paraventricularis und den Nucleus arcuatus. Vergrößerung 400x. Leichte Unterschiede in Form und Größe der dargestellten Schnittebenen sind auf geringfügige Verschiebungen der Schnittebenen zurückzuführen. Abkürzungen: ARC Nucleus arcuatus, PVN Nucleus paraventricularis, SCh Nucleus supra-chiasmaticus.

3.3 Analyse des NSCL-2 Promotors.

3.3.1 Ungerichtete Insertion des NSCL-2 Zielvektors.

Neben der Mauslinie mit einer NSCL-2 Nullmutation, stand eine weitere transgene Mauslinie zur Verfügung, bei der der NSCL-2 Zielvektor ungerichtet ins Genom integrierte. Die Genotypisierung dieses Stammes (NSCL-2#121) erfolgte über die Bestimmung der Kopienzahl des LacZ-Gens (nicht gezeigt)

Eine vergleichende Analyse des Expressionsmusters des NSCL-2#121 Stammes mittels LacZ Anfärbung ergab zunächst keine Unterschiede bei der initialen Expression ab dem Embryonalstadium 9,0. Ab dem Somitenstadium S30-35 (E10,0) tritt jedoch eine deutlich schwächere bis fehlende LacZ Expression innerhalb des Ganglion petrosus und nodosus in der NSCL-2 #121 Mauslinie auf. Neben der reduzierten Expression im Bereich der kranialen Ganglien, zeigen Neuralrohr, Dienzephalon und Mesenzephalon eine schwächere LacZ Expression (Abb. 21). Zusammen ist jedoch festzuhalten, daß die im Vektor enthaltenen regulatorischen Sequenzen des NSCL-2 Gens hinreichend sind, um das vollständige Muster der NSCL-2 Expression zu vermitteln. Die Höhe der NSCL-2 Expression scheint jedoch

durch andere, nicht in dem Konstrukt enthaltene regulatorische Elemente beeinflusst zu werden. Allerdings ist es möglich, daß die dem zufällig integrierten Vektor benachbarten genomischen Sequenzen einen reprimierenden Einfluß auf das Transgen ausüben.

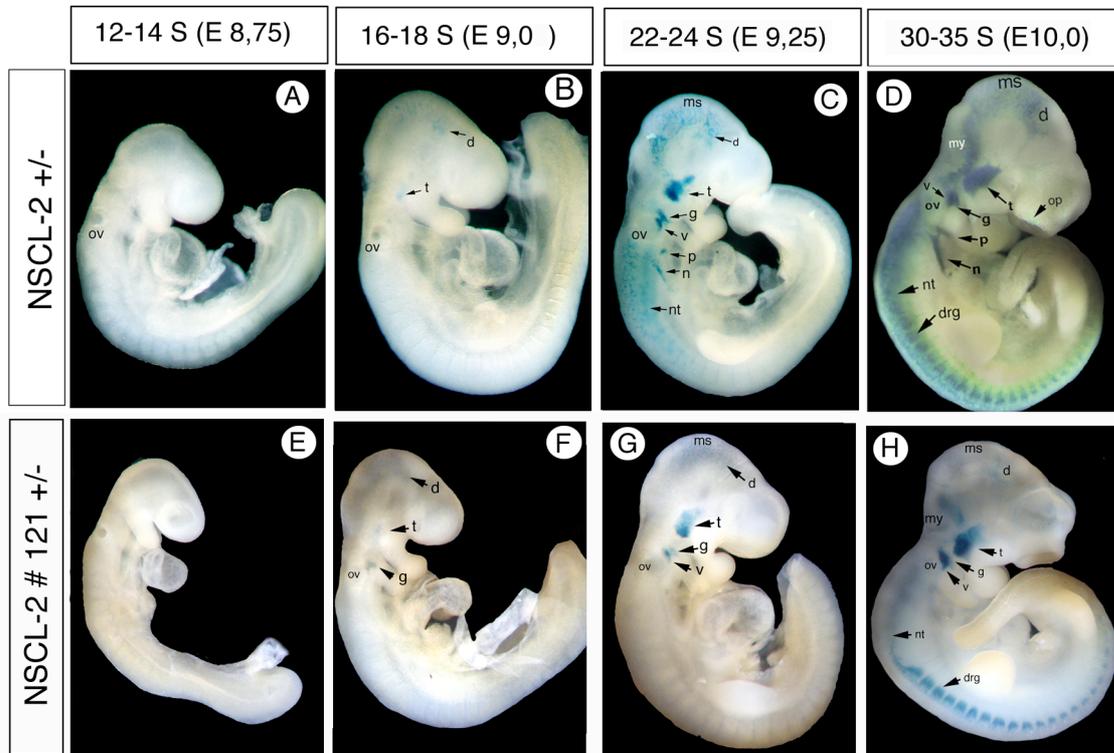


Abb.21 LacZ Expression in kranialen Ganglien von NSCL-2 #121 +/- Embryonen. Durch die zufällige Insertion des NSCL-2 Zielvektors wurde eine transgene Mauslinie etabliert, in der die LacZ Expression unter der transkriptionellen Kontrolle des 6,5 kbp großen 5'Fragments steht. Dargestellt sind LacZ Färbungen von heterozygoten transgenen Embryonen. A-D NSCL-2 +/- und E-H NSCL-2 #121 +/- . Ein Vergleich verschiedener embryonaler Entwicklungsstadien zeigt, daß die LacZ Expression im Bereich der Ganglien petrosum und nodosum bei E9,25 und E10,0 deutlich schwächer ist. Weiterhin ist die LacZ Expression im Bereich des Dienzephalon, Mesenzephalon und Neuralrohr reduziert. Abkürzungen: d Dienzephalon, drg dorsale Wurzelganglien, g G. geniculatum, ms Mesenzephalon, my Myelenzephalon, n G. nodosum, nt Neuralrohr, p G. petrosum, t G. trigeminale, ov otisches Vesikel, v G. vestibulo-cochlearis. Vergrößerungen: A,B und E,F 66x; C und G 50x; D und H 40x.

3.3.2 Hohe Konservierung des NSCL-2 Promotors zwischen Maus und Mensch.

Die Analyse des humanen NSCL-2 Promotors ergab fünf potentielle STAT-Bindungsmotive (signal transducer and activator of transcription) (Good, 2000). Die Aktivierung von STAT-Transkriptionsfaktoren verläuft über einen Interleukin vermittelten JAK/STAT Signalweg. Ein Vergleich humaner NSCL-2 Sequenzen mit den entsprechenden Mausequenzen ergab eine hohe Konservierung verschiedener palindromischer STAT Bindungsmotive. So zeigten Motive die durch Interleukin-4 aktivierte STAT Dimere binden, eine hohe Konservierung zwischen Mensch und Maus. Die konservierten Bindungsdomänen sind durch einen blauen Rahmen markiert. Innerhalb der Promotorsequenz finden sich eine Reihe weiterer Bindungsstellen z.B. für AP-1, AP-2, Oct-1, SP-1 und GATA-1. Eine Übersicht über die vorhandenen Bindungsstellen ist im Anhang dargestellt (siehe Anhang 6.1 Seite 158). Welche Proteine tatsächlich eine Interaktion mit Sequenzen aus dem NSCL-2 Promotor eingehen und die Transkription aktivieren oder inhibieren ist weiterhin unklar.

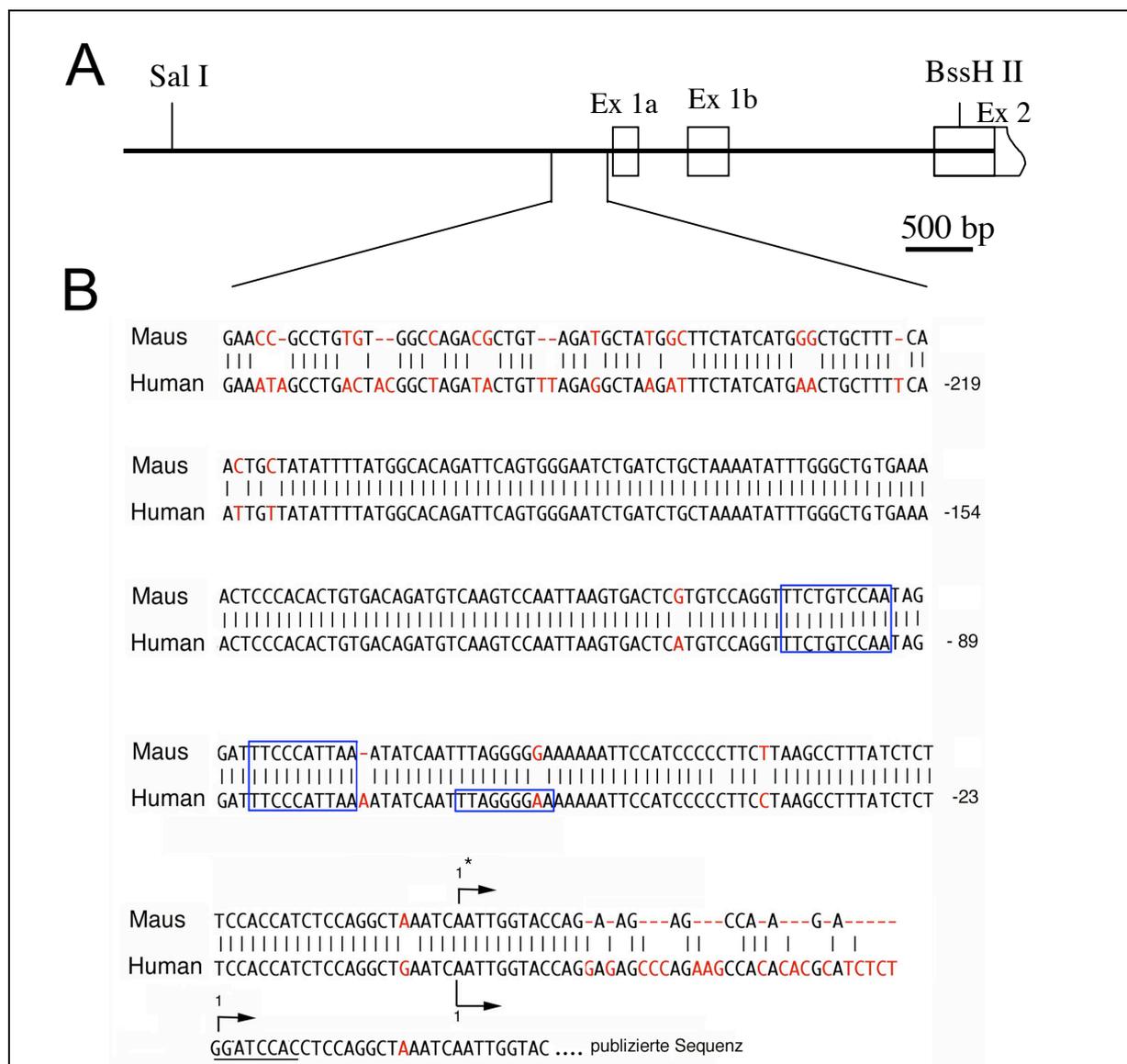


Abb.22 Vergleich der NSCL-2 Promotorsequenzen von Maus und Mensch. A: Schematische Darstellung der genomischen Struktur mit Intron/Exon Grenzen. B Vergleich der humanen NSCL-2 Promotorsequenz mit Sequenzen aus der Maus. Innerhalb der Promotorregion zeigt sich eine hohe Konservierung vom Transkriptionsstart bis zum Nukleotid –220. Der dargestellte Transkriptionsstart weicht um 8 Basenpaare (in B unterstrichen) von der veröffentlichten Sequenz ab. Der mögliche Transkriptionsstart ist mit einem Stern markiert. Die blau markierten Sequenzabschnitte stellen STAT Bindungsmotive dar. Hierbei handelt es sich um palindromische Sequenzen, die durch 6 variable Basenpaare unterbrochen sind (TTNNNNNAA).

3.4 NSCL-1 homozygote Mutanten zeigen keinen offensichtlichen Phänotyp.

3.4.1 Generierung homozygoter NSCL-1 Mutanten

Die Generierung der NSCL-1 Nullmutation erfolgte wie im Fall von NSCL-2 durch homologe Rekombination des Zielvektors pWH9 in ES Zellen. Für die homologe Rekombination diente ein 6,5kbp ApaI 5' Fragment und ein 1,3kbp PfuII-BamHI 3' Fragment (Abb. 22A). Die Einführung des Zielvektors führte neben der Insertion einer LacZ und Neomycin Kasette zu einer vollständigen Deletion der bHLH Domäne des NSCL-1 Gens. Zur Genotypisierung von Mausmutanten wurde ein exogenes BamHI –NcoI Fragment verwendet (Abb. 23A,B). Die Isolierung der DNA und die Southern-Blot Analyse erfolgte wie unter den Punkten 2.2.2.2 und 2.2.12.1 beschrieben. Eine RT-PCR Analyse bestätigte das Fehlen von NSCL-1 Transkripten in NSCL-1 homozygoten Mutanten (Abb. 23C). Die für NSCL-1 sequenzspezifischen Primer sind durch Pfeile in Abb.23A dargestellt.

NSCL-1 Nullmutanten wurden mit der erwarteten Häufigkeit geboren und zeigten keine offensichtlichen Entwicklungsstörungen. NSCL-1 Nullmutante Mäuse waren verhaltensunauffällig und zeigten keine Gewichtsveränderungen. Homozygot mutante NSCL-1 Mäuse waren fertil und konnten verpaart werden. Mutante Weibchen zeigten ein normales Brutpflegeverhalten. Histologische Untersuchungen von Ovarien und Hoden NSCL-1 homozygoter Tiere zeigten keine morphologischen Veränderungen (nicht gezeigt).

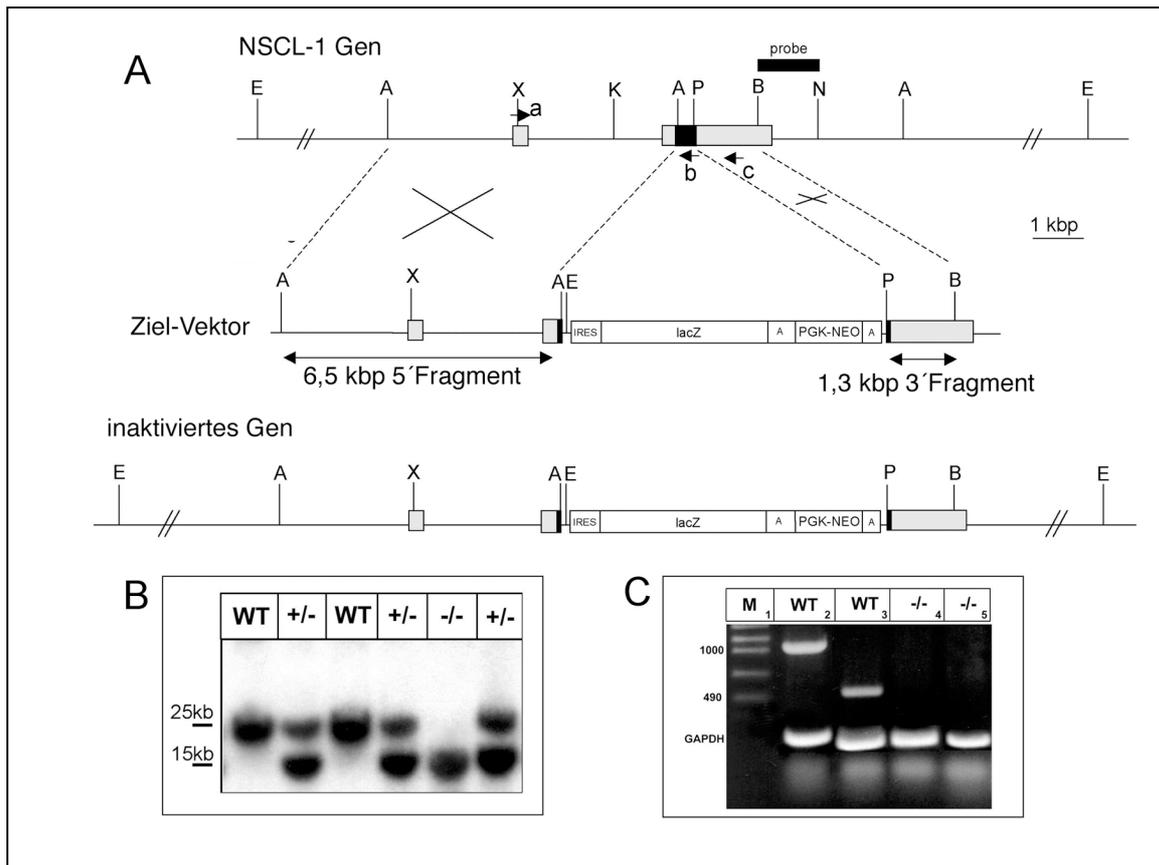


Abb.23 Konstruktion des Zielvektors pWH9.

(A) Zur homologen Rekombination wurde ein 6,5kbp ApaI 5'Fragment und ein 1,3kbp PflmI-BamHI 3' Fragment verwendet. Neben der Insertion einer LacZ und Neomycin Kasette wurde die bHLH Region innerhalb des 2. Exons vollständig deletiert. Zur Genotypisierung mutanter Mäuse wurde ein externes BamHI-NcoI Fragment Probe eingesetzt (schwarzer Balken in A). Exonsequenzen sind durch graue, kodierende Bereiche durch schwarze Kästen dargestellt. (B) Durch die Insertion des Zielvektors wurde eine EcoRV Restriktionsschnittstelle in das NSCL-1 Allel eingefügt. Nach Hydrolyse mit EcoRV und Hybridisierung des Southern Blots mit der externen Probe, konnte eine 25 kbp Wildtyp Bande detektiert werden. Das mutierte Allel wurde im Autoradiogramm durch ein 15 kbp Fragment dargestellt. In B sind WT-Mäuse (1;3) sowie heterozygote (2;4;6) und homozygote (5) Mutanten dargestellt. Die Abwesenheit von NSCL-1 Transkripten in homozygoten Mutanten wurde durch RT-PCR Analyse bestätigt. In Gehirnen von homozygoten Mutanten bei E18,5 waren, nach reverser Transkription und PCR mit sequenzspezifischen NSCL-1 Primern, keine Transkripte nachweisbar. Die verwendeten Primer sind in A durch Pfeile dargestellt. Primer a: „sense“ Primer aus Exon 1; b und c „antisense „Primer aus Exon 2. In der Wildtyp Situation konnte mit den Primern a,b ein 500bp Fragment und mit den Primern a,c ein 1000bp Fragment amplifiziert werden. Als Kontrolle für gleiche cDNA-Ausgangsmengen dienten Primer für die GAPDH, welche ein Fragment von 290 bp erzeugten. Abkürzungen: Restriktionsschnittstellen: A ApaI, B BamHI, E EcoRV, K KpnI, N NcoI, P PflmI, X XhoI; a NSCL-1 sense Primer aus Exon 1, b,c NSCL-1 antisense Primer aus Exon2, IRES internal ribosomal entry site; LacZ Sequenz für die Beta-Galaktosidase; A poly A Schwanz; PGK-Neo Neomycin Resistenz Gen.

3.4.2 Initiale NSCL-1 Expression ab dem Somitenstadium 12-14 (E8,75)

Zur Analyse des Beginns der NSCL-1 Expression wurden LacZ Färbungen früher heterozygoter Mausembryonen durchgeführt. LacZ positive Zellen konnten ab dem Somitenstadium 12-14 (entspricht E8,75) detektiert werden. Wie in Abbildung 24 gezeigt, beginnt die Expression innerhalb des peripheren Nervensystems im Ganglion trigeminale und breitet sich in kaudaler Richtung aus. Ab dem Somitenstadium 16-18S zeigen die Ganglien trigeminale, geniculatum, vestibulo-cochlearis, petrosus und nodosus eine starke NSCL-1/LacZ Expression. Im zentralen Nervensystem finden sich erste NSCL-1/LacZ Signale ebenfalls ab dem Somitenstadium 12-14 (E8,75) im Dienzephalon. Nach Entwicklung weiterer 2-4 Somiten steigt das NSCL-1/LacZ Expressionsniveau deutlich an und weitere Signale lassen sich im Mesenzephalon und Neuralrohr detektieren. Ein Vergleich mit dem NSCL-2/LacZ Expressionsmuster zeigt neben einem früheren Einsetzen der NSCL-1 Expression, ein deutlich stärkeres Ansteigen des NSCL-1 Expressionsniveaus ab dem Somitenstadium 12-14 (E8,75). Zwischen dem Embryonalstadium E9,5 –E11,5 steigt die Expression in den beschriebenen peripheren und zentralen Bereichen des Nervensystems weiter an (Abb.25). Neben den bereits bestehenden Expressionsdomänen lassen sich ab E10.5 weitere NSCL-1/LacZ positive Zellen in der entstehenden Riechgrube, in den dorsalen Wurzelganglien und im Myelenzephalon finden. Ein Vergleich zwischen hetero- und homozygoten NSCL-1 Mutanten, zeigte wie im Fall von NSCL-2 kein abweichendes Expressionsmuster (Abb. 25). Für eine genauere Analyse der vorhandenen Expressionsdomänen wurden vergleichende transversale Schnittserien „whole mount“ LacZ gefärbter NSCL-1 heterozygoter und homozygoter Mutanten der Stadien E9,5 bis E11,5 angefertigt. Die repräsentativen Schnitte des Stadiums E9,5 zeigen deutliche Signale in den Ganglien trigeminale, vestibulo-cochlearis, geniculatum und nodosum. Abbildung 24 B,C und B',C' zeigen zwar deutliche NSCL-1 Signale in den Ganglien, aber NSCL-1 positive Zellen überlappen auch mit den jeweiligen epibranchialen Plakoden. Ob NSCL-1 aufgrund seiner etwas früheren Expression schon in migratorischen Neuronen exprimiert wird ist jedoch noch unklar. Die Schnittebene durch das ebenfalls NSCL-1/LacZ positive Ganglion petrosus ist nicht gezeigt.

Im kranialen Bereich des Neuralrohrs finden sich NSCL-1/LacZ positive Neurone vor allem in ventrolateralen Bereichen der ventrikulären Zone (Abb.25 C,C'). Transversale Schnitte auf Höhe des G. nodosum (Abb.25D) zeigen Signale in dorsalen und ventralen Bereichen der lateralen ventrikulären Zone (Abb.25C, markiert durch rote Pfeilköpfe). NSCL-1 negativ sind

hingegen Grund- und Dachplatte des Neuralrohrs. Deutlich schwächere NSCL-1/LacZ Signale lassen sich im medialen Teil des lateralen Neuralrohrs detektieren (Abb.25C, markiert durch einen Stern). Kaudale Schnitte durch das Neuralrohr zeigen Signale in lateralen Bereichen des Neuralrohrs mit Ausnahme ventrolateraler Bereiche, in denen motorische Neurone detektierbar sind (nicht gezeigt). Untersuchungen von Murdoch und Mitarbeitern bestätigten, daß Islet-1 positive Motoneurone im ventrolateralen Neuralrohr nicht mit NSCL-1 positiven Zellen koexprimiert werden (Murdoch et al., 1999).

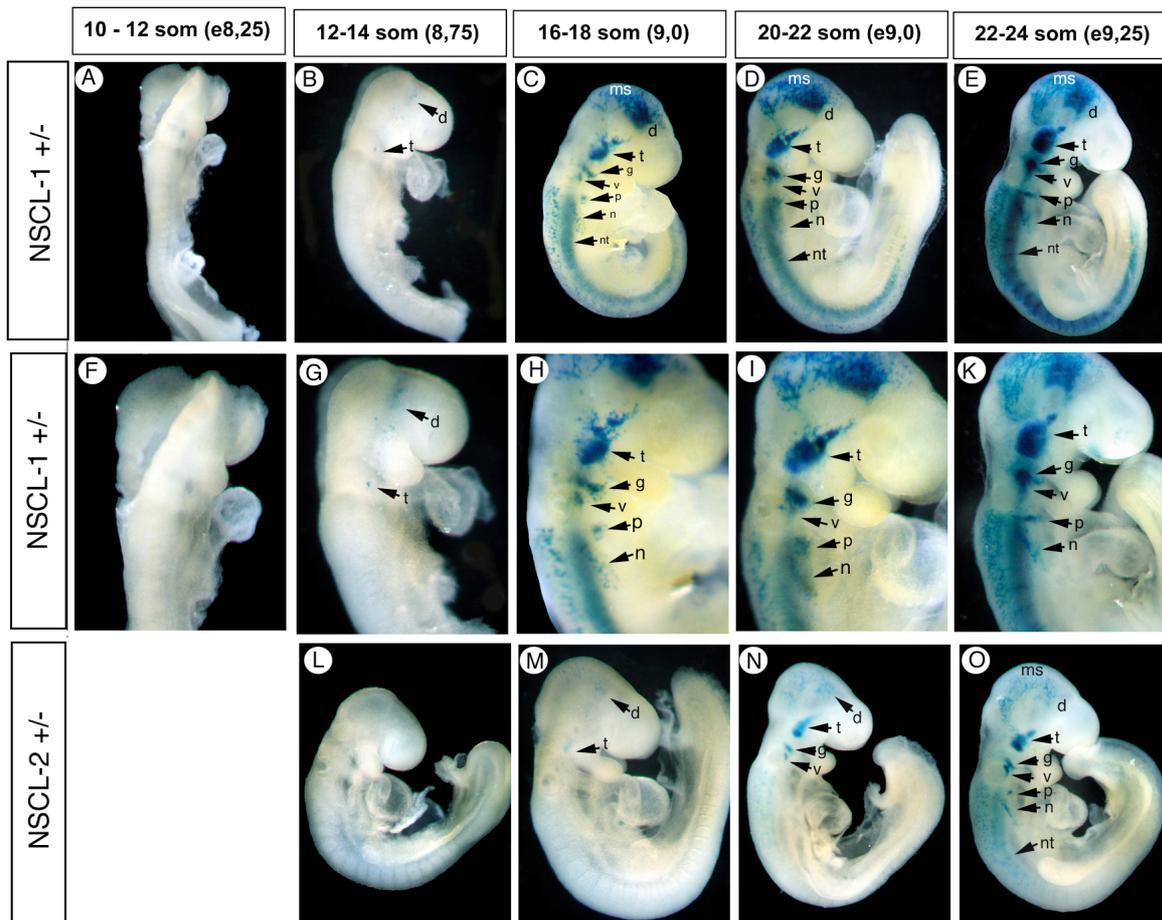


Abb.24 Einsetzen der NSCL-1/LacZ Expression im Somitenstadium 12-14.

Gezeigt sind laterale Übersichten von whole mount LacZ gefärbten Embryonen ab dem Somitenstadium 10-12 (A-E). In F-K sind die jeweiligen Ausschnitte aus den kranialen Bereichen gezeigt. L-O zeigen das NSCL-2/ LacZ Expressionsmuster im Vergleich zu NSCL-1. Erste NSCL-1/LacZ Signale lassen sich ab dem Somitenstadium 12-14 im Ganglion trigeminale und Diencephalon detektieren. Ab E9,0 steigt das Expressionsniveau im zentralen und peripheren Nervensystem deutlich an. Vor allem in den kranialen Ganglien finden sich NSCL-1/LacZ positive Zellen. Abkürzungen.: d Diencephalon, g Ganglion geniculatum, m Mesenzephalon, n Ganglion nodosum, nt Neuralrohr, ov otisches Vesikel, p G.petrosum, t G. trigeminale, v G. vestibulo-cochlearis. Vergrößerung A,B, L,M 66x und C,D,E ,N, O 50x.

Ab E11,5 findet eine leichte Reduktion des NSCL-1 Expressionsniveaus in den kranialen Ganglien statt (Abb. J,J', K,K'). Neben der weiterhin prominenten Expression im Neuralrohr, lassen sich NSCL-1 positive Zellen in den dorsalen Wurzelganglien detektieren.

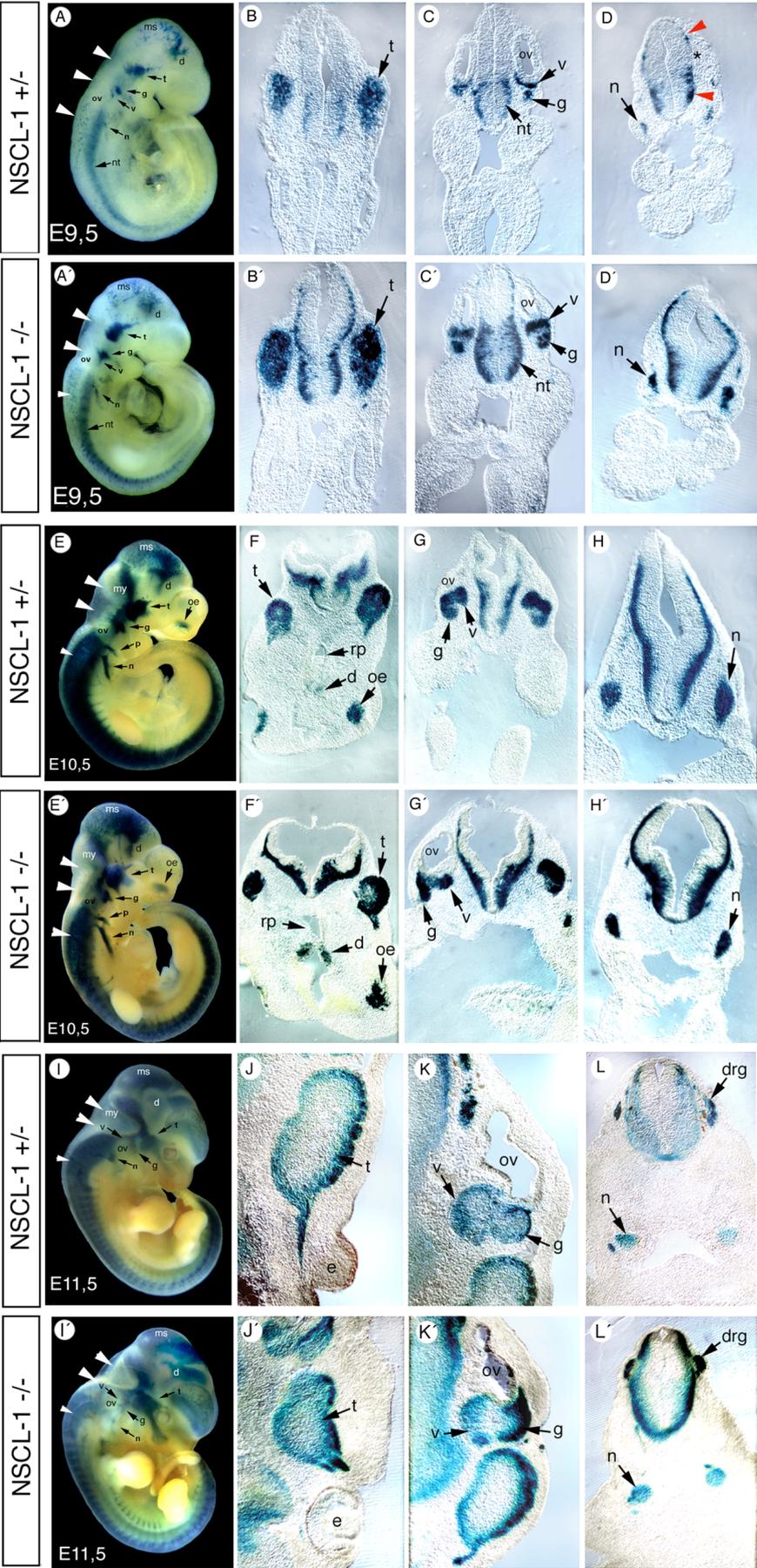


Abb.25 Homozygote NSCL-1 Mutanten zeigen ein normales Expressionsmuster des mutierten Gens.

Laterale Übersichten von whole mount LacZ gefärbten Embryonen zwischen E9,5 bis E11,5 (A,A', E,E', I,I'). Neben der intensiveren LacZ Färbung bei homozygoten NSCL-1 Mutanten, welche auf die doppelte Kopienzahl zurückzuführen ist, sind keine offensichtlichen Veränderungen erkennbar. Die transversalen Schnittebenen sind durch weiße Pfeilköpfe markiert. Kraniale Schnittebenen bestätigen die Expression in den Ganglien trigeminale, vestibulo-cochlearis, geniculatum, petrosus und nodosus. Die Expression im Neuralrohr beschränkt sich in kranialen Bereichen auf laterale Zonen (markiert durch rote Pfeilköpfe in D), wobei mediale Bereiche NSCL-1 negativ sind (markiert durch einen Stern). Im Bereich der Grund- und Dachplatte konnten keine NSCL-1 Signale detektiert werden. Ab E10,5 steigt das Expressionsniveau in den kranialen Ganglien und weitere NSCL-1/LacZ positive Zellen finden sich im Dienzephalon, Mesenzephalon, Myelenzephalon und Neuralrohr. Weitere Signale lassen sich in der ab E10,5 entstehenden Riechgrube und in den dorsalen Wurzelganglien detektieren (F,F'). Ab E11,5 sinkt das Expressionsniveau in den kranialen Ganglien, wohingegen erste Signale in der sich entwickelnden Retina zu beobachten sind. Abkürzungen: d Dienzephalon, drg dorsale Wurzelganglien, e Auge, g Ganglion geniculatum, ms Mesenzephalon, my Myelenzephalon, n Ganglion nodosum, nt Neuralrohr, ov otisches Vesikel, p G.petrosus, rp Rathkes Tasche, t G. trigeminale, v G. vestibulo-cochlearis, op (olfactory pit) Riechgrube.

3.4.3 Doppelmarkierung von mitotisch aktiven und NSCL-1/LacZ positiven Zellen.

Eine Möglichkeit mitotisch aktive Zellen zu markieren, ist die Inkorporation von Bromdesoxy-Uridin (BrdU). Zwei Stunden nach Injektion des Nukleotidanalogs wurden die Embryonen isoliert und genotypisiert. Nach der LacZ Färbung wurden transversale Serienschritte erstellt. Die Darstellung BrdU positiver Zellen erfolgte mittels Immunhistochemie. Die Doppelfärbung zeigt im Bereich des Neuralrohrs keine Kollokalisierung NSCL-1/LacZ (blau) und BrdU (braun) positiver Zellen. Wie die Ausschnittsvergrößerung in Abb.25B zeigt, sind mitotisch aktive Zellen auf apikale Bereiche der ventrikulären Schicht beschränkt, wohingegen NSCL-1/LacZ positive Zellen in postmitotischen Zonen der Mantelschicht lokalisiert sind. Im Bereich des G. trigeminale konnten ebenfalls keine NSCL-1/LacZ Signale in mitotisch aktiven Zellen detektiert werden. Im Bereich der olfaktorischen Plakode zeigt die Doppelfärbung zwar eine deutliche Überlappung NSCL-1/LacZ und BrdU positiver Zellen in basalen Schichten, aber höhere Vergrößerungen deuten auch hier auf eine Expression von NSCL-1 in postmitotischen Zellen hin. Bei E18,5 sind NSCL-1/LacZ positive Zellen auf subventrikuläre und intermediäre Schichten beschränkt. In der mitotisch aktiven ventrikulären Schicht sind keine NSCL-1/LacZ positiven Zellen detektierbar (Abb.26E,F). Die BrdU positiven Zellen in der subventrikulären Schicht sind markierte postmitotische Zellen die aus der ventrikulären Schicht auswandern. Im Bereich des Kleinhirns kommt es hingegen im Bereich der externen Körnerzellschicht

(EGL) zu einer deutlichen Überlappung BrdU und NSCL-1/LacZ positiver Zellen. In den internen granulären Schichten sind mit BrdU markierte Zellen NSCL-1/LacZ negativ (Abb.25H). Ob in der EGL tatsächlich mitotisch aktive Zellen NSCL-1 exprimieren, kann mit den bisherigen Daten nicht abschließend beantwortet werden. Ein Vergleich zwischen WT, hetero- und homozygoten Mutanten ergab keine Unterschiede in der Anzahl BrdU positiver Zellen.

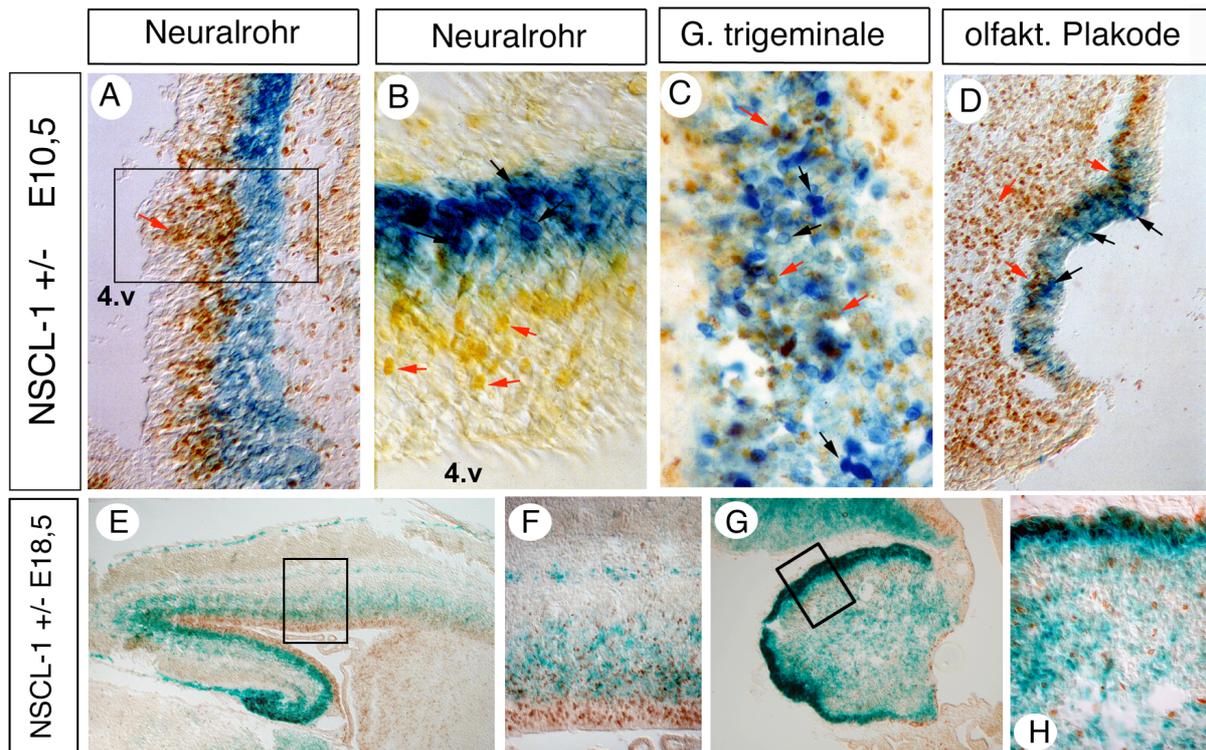


Abb.26: NSCL-1 exprimierende Zellen teilen sich nicht mehr.

Transversale Kryotomsschnitte durch Neuralrohr (A,B), G. trigeminale (C) und olfaktorischer Plakode (D). Doppelfärbung von BrdU (braun) und NSCL-1 (blau) positiven Zellen. Die Übersicht in A zeigt deutlich die Expression von NSCL-1 in der postmitotischen Mantelschicht des Neuralrohrs. Der schwarze Kasten in A markiert den vergrößerten Bereich in B (um 90° gegen Uhrzeigersinn gedreht). Rote Pfeile markieren BrdU positive Zellen und schwarze Pfeile markieren NSCL-1/LacZ positive Zellen. E-H zeigen sagittale Kryotomsschnitte bei E18,5. E und F zeigen NSCL-1 positive Zellen im Bereich der Großhirnrinde. In der mitotisch aktiven ventrikulären Schicht sind keine NSCL-1/LacZ positiven Zellen detektierbar. Im Bereich der subventrikulären Schicht findet zwar eine Überlappung statt, aber BrdU positive Zellen sind auch hier NSCL-1 negativ. Im Bereich des Kleinhirns überlappen mitotisch aktive und NSCL-1/LacZ positive Zellen innerhalb der externen granulären Schicht. In der internen granulären Schicht sind BrdU positive Zellen NSCL-1/LacZ negativ. Vergrößerungen: A,D 100x, B,C 400x, E,G 25x, F,H 100x

!

3.4.4 Die Differenzierung NSCL-1 exprimierender Neurone in NSCL-1 mutanten Embryonen zeigt keine Auffälligkeiten.

Eine genauere Analyse neuronaler Differenzierungsvorgänge in NSCL-1 homozygoten Mutanten erfolgte durch vergleichende in situ Hybridisierungen von WT und NSCL-1 Nullmutanten zwischen E8,75 und E10,5. Die Untersuchung mit einer SCG-10 „antisense“ Probe ergab keine Veränderung in der zeitlichen und räumlichen Expression des neuronalen Markers SCG-10 in NSCL-1 Mutanten (Abb.27). Transversale Schnitte durch kraniale Bereiche bestätigten die korrekte Expression von SCG-10 (nicht gezeigt). Die Expression weiterer neuronaler Marker-Gene wird unter Punkt 3.5.1 beschrieben.

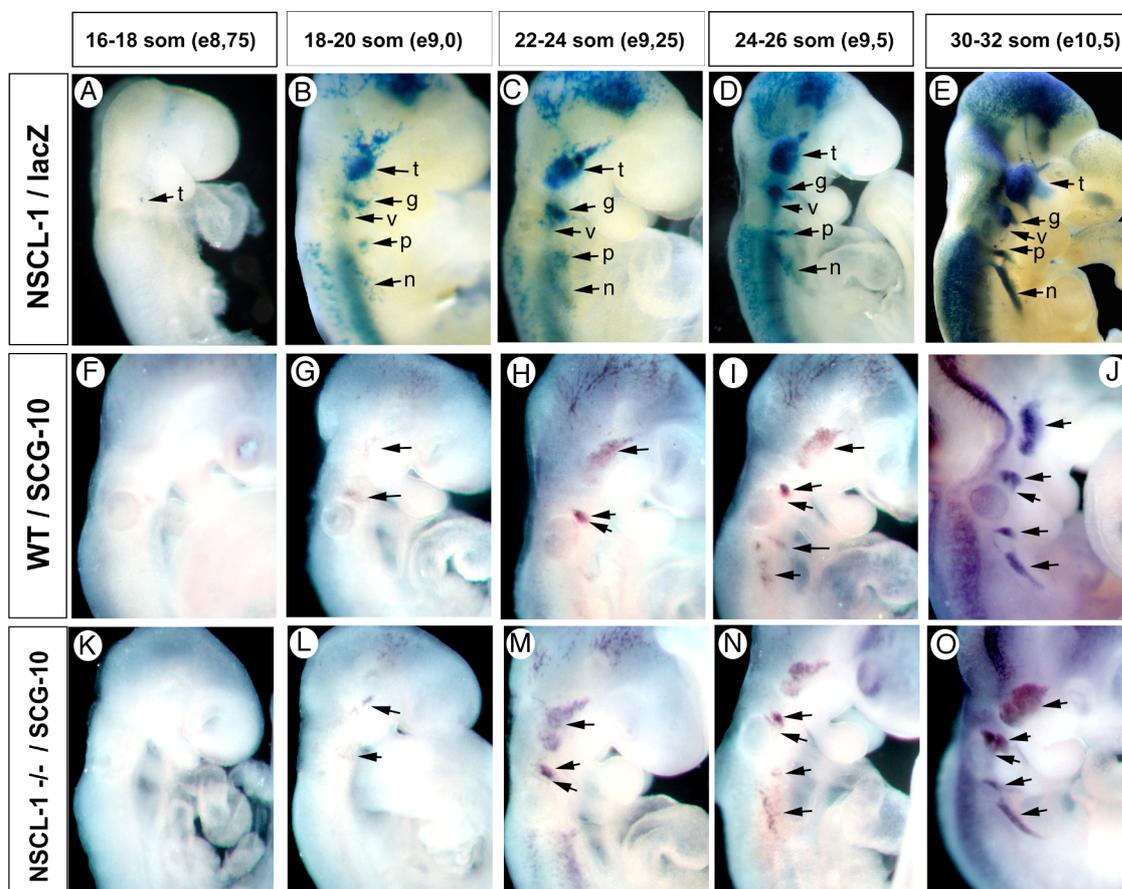


Abb.27 Normale Differenzierung NSCL-2 exprimierender Neurone in NSCL-1 Mutanten.

A-E Laterale Ausschnitte whole mount LacZ gefärbte NSCL-1 heterozygote Embryonen zwischen E8,75 –E10,5. In F-J (Wildtyp) und K-O (NSCL-1^{-/-}) wurden vergleichbare Entwicklungsstadien mit einer SCG-10 cRNA Probe angefärbt. Ein Vergleich von NSCL-1 und SCG-10 Expression zeigt ein deutlich früheres Einsetzen der NSCL-1 Expression. In NSCL-1 Nullmutanten ist keine fehlende oder verzögerte SCG-10 Expression zu beobachten. Die Pfeile markieren jeweils die kranialen Ganglien. Abkürzungen: g Ganglion geniculate, n Ganglion nodosum, p G.petrosus, t G. trigeminale, v G. vestibulo-cochlearis.

3.4.5 NSCL-1 und NSCL-2 zeigen unterschiedliche Expressionsmuster während embryonaler Entwicklungsstadien.

Die Übersichten in Abb. 28 zeigen heterozygote Mutanten für NSCL-1 und NSCL-2 des Stadiums E18,5. Prominente Expressionsdomänen lassen sich innerhalb des Großhirns, Hippokampus, Kleinhirns, Bulbus olfaktorius (Glomerularzellschicht), Tectum, Thalamus, Hypothalamus, Hirnstamm (Medulla oblongata) und im olfaktorischen Epithel auffinden. Die Expression innerhalb der Hypophyse ist nur in NSCL-1 hetero- und homozygoten Mutanten zu beobachten. Weitere Expressionsdomänen finden sich im Neuralrohr, den dorsalen Wurzelganglien und der Retina.

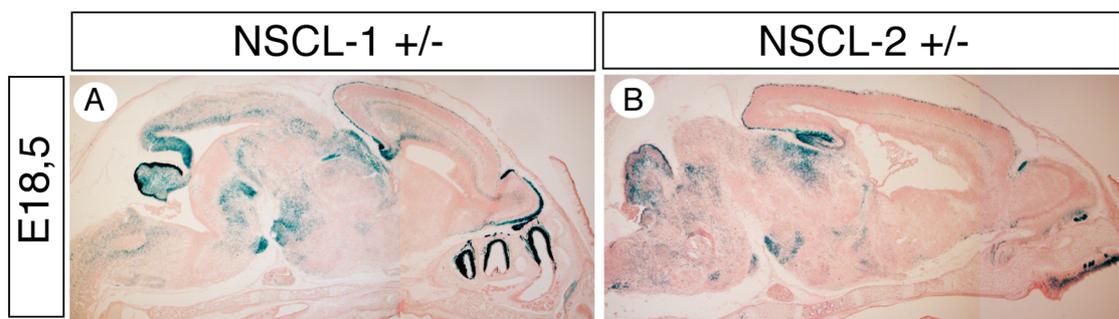


Abb.28 Sagittale Kryotomschnitte (Schnittdicke 20µm) durch Gehirne von NSCL-1 und NSCL-2 heterozygoten Mutanten bei E18,5. Nach LacZ Färbung, wurden die Schnitte mit Eosin gegengefärbt. NSCL-1/LacZ und NSCL-2/LacZ Signale lassen sich im Bereich des olfaktorischen Epithels, Bulbus olfaktorius, Großhirnrinde, Hippokampus, Thalamus, Hypothalamus, Kleinhirn und Hirnstamm detektieren.

3.4.5.1 NSCL-1 und NSCL-2 werden während der Entwicklung des Kortex in unterschiedlichen Domänen exprimiert.

Die Formierung laminarer Strukturen innerhalb des zerebralen Kortex verläuft über den sog. „in side-out“ Mechanismus. Dabei verlassen Vorläuferzellen die mitotisch aktive ventrikuläre Schicht und bilden neben der subventrikulären die intermediäre Schicht und die kortikale Platte. Postnatal entwickeln sich 6 Schichten (I-VI) die die laminare Struktur der Großhirnrinde bilden. Die vergleichende Analyse der NSCL Expression während der Embryogenese zeigt deutliche Unterschiede in der Expression von NSCL-1 und NSCL-2. NSCL-1 wird zwischen E14,5 und E16,5 im Bereich der subventrikulären Schicht exprimiert. Bei E18,5 sind weitere NSCL-1/LacZ positive Zellen innerhalb der intermediären Schicht und im marginalen Bereich der kortikalen Platte detektierbar. Die Expression von NSCL-2 beschränkt sich dagegen bei E14,5 auf die marginale Schicht der kortikalen Platte. Ab E16,5 sind schwache Signale im Bereich der intermediären Zone zu beobachten. Postnatal sinken

das NSCL-1/LacZ und NSCL-2/LacZ Expressionsniveau deutlich, ab P10 sind keine Signale mehr detektierbar (nicht gezeigt). Es wurden keine Unterschiede in NSCL-1 und NSCL-2 Mutanten hinsichtlich der Expression der mutierten Gene gefunden (Abb.29).

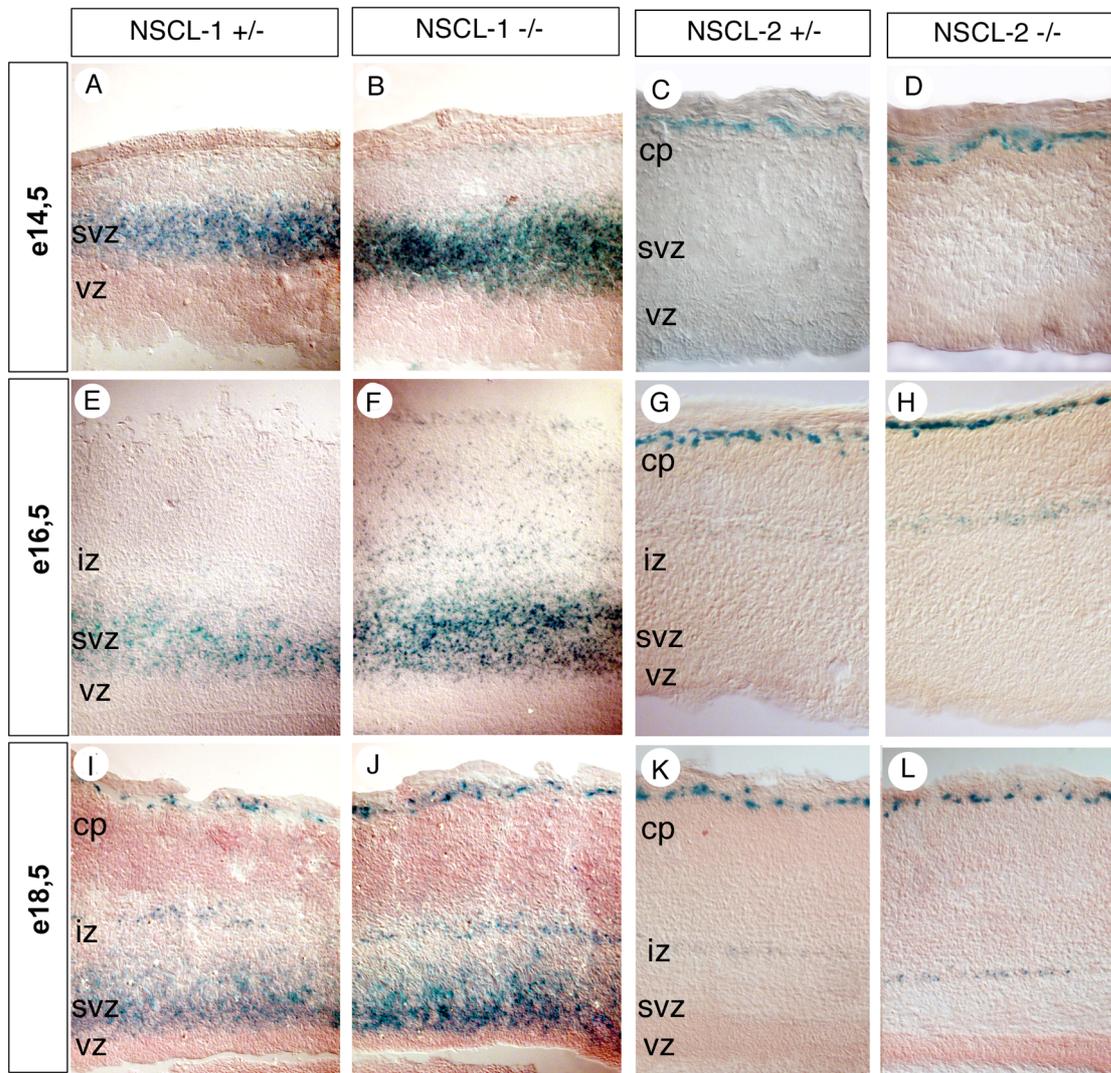


Abb.29. Vergleichende Expressionsanalyse von NSCL-1 und NSCL-2 innerhalb des sich entwickelnden Kortex.

Dargestellte Embryonalstadien: A-D E14,5; E-H E16,5; I-L E18,5. Frontale Kryotomsschnitte (Schnittdicke $20\mu\text{m}$) wurden einer LacZ Färbung unterzogen und mit Eosin gegengefärbt. NSCL-1/LacZ Signale sind zwischen E14,5 und E16,5 auf die subventrikuläre Schicht beschränkt. Ab E18,5 sind weitere Signale in der intermediären Schicht und in marginalen Bereichen der kortikalen Platte detektierbar. NSCL-2/LacZ positive Zellen sind hingegen nur in marginalen Zonen der kortikalen Platte zu beobachten. Ab E16,5 sind schwache Signale in der intermediären Schicht detektierbar. Weder NSCL-1 noch NSCL-2 sind in der mitotisch aktiven ventrikulären Schicht nachweisbar. Weiterhin sind keine Unterschiede zwischen dem Expressionsmuster von hetero- und homozygoten Mutanten zu beobachten. Abkürzungen: cp kortikale Platte, iz intermediäre Schicht, svz subventrikuläre Schicht, vz ventrikuläre Schicht. Vergrößerung: 200x.

3.4.5.2 Analyse der Expression von NSCL-1 und NSCL-2 im Kleinhirn.

Zur genaueren Analyse der Expression von NSCL-1 und NSCL-2 im Kleinhirn wurden Embryonen verschiedener Entwicklungsstadien mittels LacZ Färbung untersucht.

NSCL-1 positive Zellen lassen sich ab E14,5 im ventrikulären Epithel der Kleinhirnanlage detektieren (nicht gezeigt). Bei E16,5 sind deutliche Signale in migrierenden Körner-Vorläuferzellen innerhalb proliferativer und prä migratorischer Zonen der externen Körnerschicht (EGL) detektierbar (Abb.30A,B). Ab E18,5 sind NSCL-1/LacZ positive Körnervorläuferzellen in der kompletten Oberfläche des sich entwickelnden Kleinhirns detektierbar (Abb. 30 E,F). Im Bereich der internen Körner Schicht (IGL) konnten ebenfalls NSCL-1/LacZ positive Zellen detektiert werden. Ab P10 nimmt die Expression von NSCL-1 deutlich ab (nicht gezeigt). Die postnatale Analyse bestätigt die Untersuchungen von Uittenboogard und Mitarbeitern (Uittenbogaard et al., 1999).

Die Analyse von NSCL-2 ergab während embryonaler Stadien im Vergleich zu NSCL-1 ein deutlich schwächeres Expressionsniveau. Bei E16,5 sind NSCL-2 positive Zellen zunächst auf dorsale Bereiche der EGL beschränkt (Abb.30 C,D). Ab E18,5 lassen sich NSCL-2/LacZ Signale in der prä migratorischen Zone der EGL und in der IGL detektieren (Abb.30 G,H). Postnatale NSCL-2 Signale finden sich in der externen und internen Körner Schicht (IGL). Weder NSCL-1 noch NSCL-2 positive Zellen lassen sich in der molekularen Schicht detektieren. Die vergleichende Analyse von hetero- und homozygoten Mutanten ergab ebenfalls keine Unterschiede (Abb.30).

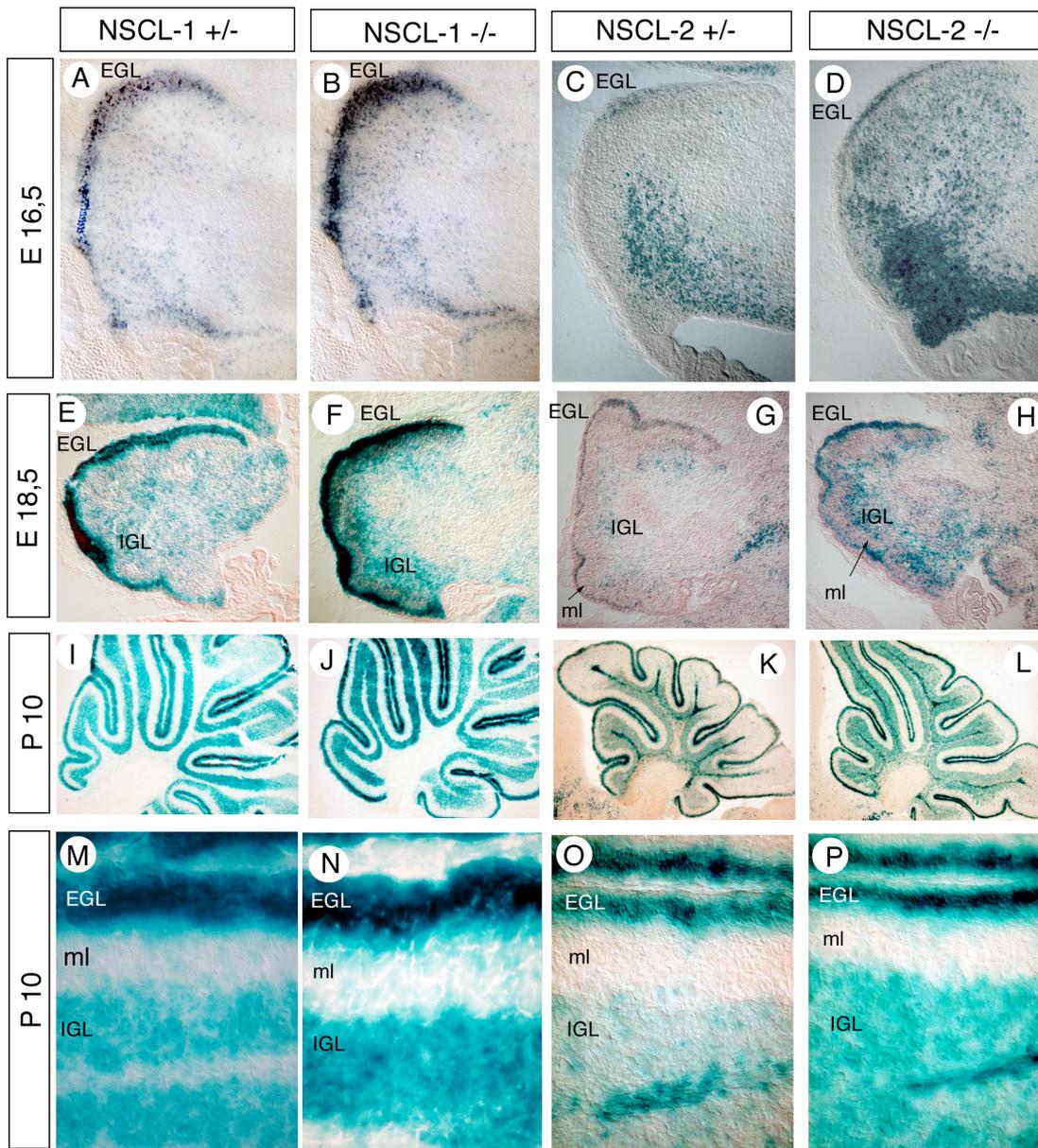


Abb.30: Expression von NSCL-1 und NSCL-2 während der Kleinhirnentwicklung.

Sagittale Kryotomschnitte von E16,5 (A-D), E18,5 (E-H) und P10 (I-P) von NSCL-1 bzw. NSCL-2 hetero- und homozygoten Mutanten. (M-P) zeigen jeweils Ausschnittsvergrößerungen von (I-L). Die NSCL-1/LacZ Anfärbung zeigt deutlich die Expression in der externen und internen granulären Schicht des Kleinhirns. In den Ausschnittsvergrößerungen M-N sind die externe, molekulare und interne Schicht bei P10 dargestellt. Abkürzungen: EGL extra granuläre Schicht, ml molekulare Schicht, IGL interne granuläre Schicht.

3.4.5.3 Expression von NSCL-1 und NSCL-2 in der Retina.

Als frühester Zeitpunkt für die Expressionsanalyse wurde E14,5 gewählt (Abb.31 A,B). Initial konnten NSCL-1 und NSCL-2 positive Zellen ab E11,5 im Neuroepithel des Augenbechers beobachtet werden (nicht gezeigt). Ab E14,5 überlappen die Expressionsdomänen von NSCL-1 und NSCL-2 im Bereich der sich entwickelnden Ganglienzellschicht (Abb.31 A-D).

Schwache NSCL-1 Signale waren daneben in der äußeren Neuroblasten Schicht der Retina zu beobachten. Ab E16,5 steigt das Expressionsniveau von NSCL-1 in den äußeren Schichten der Retina. NSCL-2 positive Zellen bleiben hingegen auf die Ganglienzellschicht beschränkt (Abb.31E-H). Ob es sich bei den einzelnen NSCL-2 positiven Zellen in der ventrikulären Schicht um migrierende Zellen handelt ist jedoch noch unklar. Bei E18,5 zeigt die Ganglienzellschicht von NSCL-1 und NSCL-2 hetero- und homozygoten Mutanten starke Signale (Abb.31I-L). Postnatal sinkt das Expressionsniveau von NSCL-1 und NSCL-2 in der Retina und ist auf die Ganglienzellschicht beschränkt. Weitere NSCL-1 und NSCL-2 positive Zellen konnten in den ableitenden Augennerven beobachtet werden (nicht gezeigt).

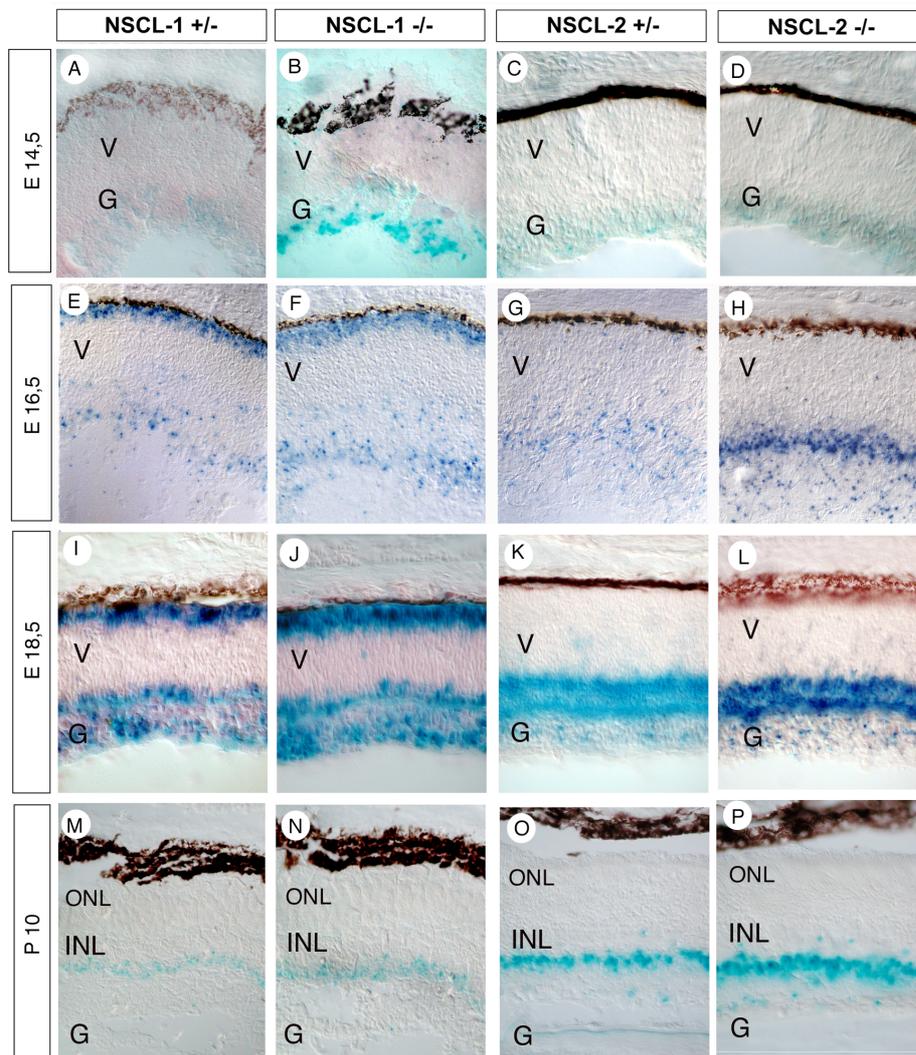


Abb.31: Darstellung NSCL-1 und NSCL-2 LacZ positiver Zellen in der Retina während embryonaler und postnataler Entwicklungsstadien.

Das Pigmentepithel der Retina liegt jeweils am oberen Bildrand. Kryotomсреitte (Schnittdicke 20µm) wurden LacZ gefärbt und mit Eosin gegengefärbt. Die Ausschnitte aus dem dorsalen Bereich der Retina verdeutlichen eine überlappende Expression von NSCL-1 und NSCL-2 in der Ganglienzellschicht. Weitere NSCL-1 Signale finden sich in äußeren Zellschichten der ventrikulären Schicht. Postnatal nimmt die Expression von NSCL-1 deutlicher ab als die Expression von NSCL-2. Abkürzungen: g Ganglienzellschicht, v ventrikuläre Schicht, inl innere nukleäre Schicht, onl äußere nukleäre Schicht.

3.4.5.4 Expression von NSCL-1 und NSCL-2 im olfaktorischen Epithel.

Neben einer Vielzahl von Neuronen mit olfaktorischen Rezeptoren (ORN olfactory receptor neurons) besteht das Riechepithel aus neuronalen Vorläufer Zellen (INP immediate neuronal precursors / auch als basale globuläre Zellen bezeichnet), horizontalen Zellen (hc horizontal cells) und epithelialen Stützzellen (SC sustentacular cells). Die mitotisch aktiven Vorläuferzellen integrieren in die basalen Schichten und bilden intermediär gelegene postmitotische olfaktorische Nervenzellen. Welche Funktion von horizontalen Zellen ausgeht ist nicht bekannt.

Erste NSCL-1 und NSCL-2 Signale konnten ab E10,5 in der gerade entstehenden Riechgrube detektiert werden. Die Abbildung 32 zeigt die Verteilung NSCL-1 und NSCL-2 positiver Zellen von E14,5 –E18,5 im olfaktorischen Epithel. Die deutlich stärkeren NSCL-1/LacZ Signale finden sich sowohl in apikalen als auch in basalen Zellen, wohingegen NSCL-2/LacZ positive Zellen auf basale Schichten beschränkt sind. Die apikal gelegene epitheliale Stüttschicht ist hingegen NSCL-1 und NSCL-2 negativ.

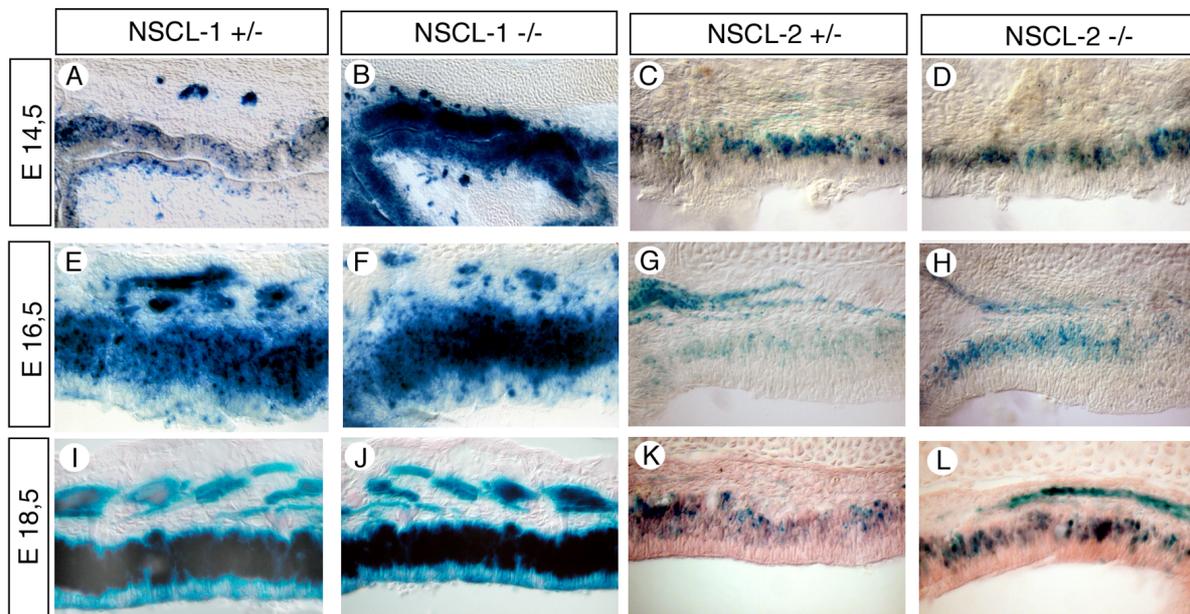


Abb. 32 Expression von NSCL-1 und NSCL-2 im olfaktorischen Epithel.

Frontale Kryotomschnitte (Schnittdicke $20\mu\text{m}$) aus medialen nasalen Bereichen. NSCL-1 A,B,E,F,I,J und NSCL-2 C,D,G,H,K,L. Neben der Anfärbung im olfaktorischen Epithel sind auch die ableitenden Nervenfasern NSCL-1 und NSCL-2 positiv. NSCL-1 positive Zellen sind sowohl in basalen (oben) als auch in apikalen (unten) Schichten detektierbar. NSCL-2 ist hingegen auf basale Schichten beschränkt. Die apikal gelegene Stüttschicht ist NSCL-1 und NSCL-2 negativ.

3.4.5.5 Expression von NSCL-1 und NSCL-2 im adulten ZNS.

Postnatal sinkt die Expression von NSCL-1 und NSCL-2 in den meisten Regionen des ZNS und PNS deutlich ab. Lediglich die prominente Expression im olfaktorischen Nerv und im olfaktorischen Epithel bleibt erhalten, während in der Großhirnrinde und im Kleinhirn keine NSCL-1 und NSCL-2 Signale mehr detektiert wurden). NSCL-2 positive Zellen konnten lediglich im medialen Habenular Kern und im dorsalen Hypothalamus gefunden werden (Abb.33B). Die schwachen NSCL-1/LacZ Signale im Bereich wurden dem Nucleus mamillaris zugeordnet (Abb.33 A).

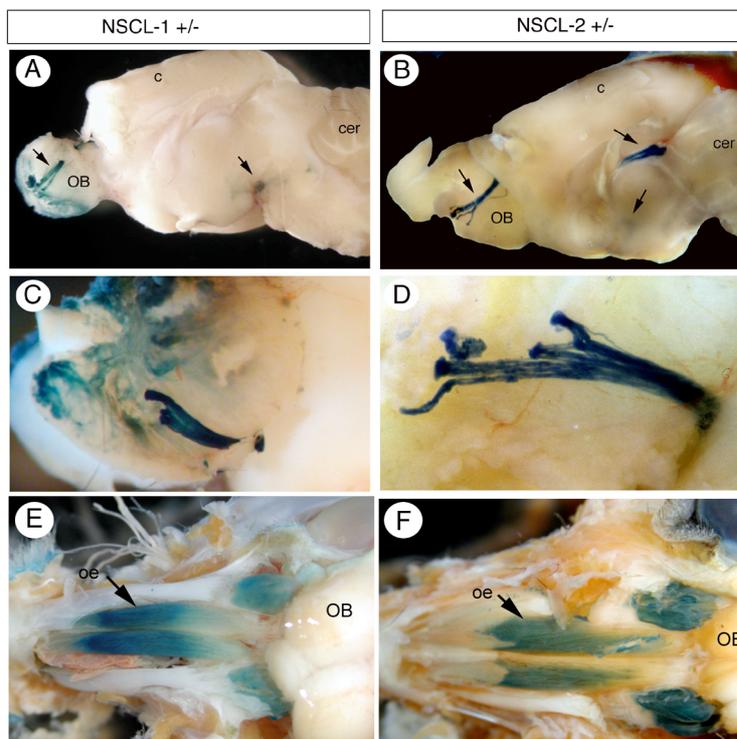


Abb.33 Die Expression von NSCL-1 und NSCL-2 sinkt im adulten ZNS ab.

Isolierte Gehirne NSCL-1 und NSCL-2 heterozygoter adulter Mutanten (P60) wurden medial geteilt und einer LacZ Färbung unterzogen. Starke NSCL-1(A,C) und NSCL-2 (B,D) Signale konnten im olfaktorischen Nerv und im olfaktorischen Neuroepithel detektiert werden. NSCL-2 Signale wurden weiterhin im Habenular Kern und dorsalen Hypothalamus detektiert. In C,D sind Ausschnittsvergr. des olfaktorischen Nervs gezeigt. In E und F sind jeweils NSCL-1/LacZ und NSCL-2/LacZ positive Zellen im Bereich des olfaktorischen Riechepithels gezeigt. Abkürzungen: OB Bulbus olfaktorius, c Kortex, cer Kleinhirn, oe olfaktorisches Epithelium.

In der folgenden Tabelle sind die NSCL-1/LacZ und NSCL-2 /LacZ positiven Regionen zusammengefasst.

Stadium	NSCL-1/lacZ	NSCL-2/LacZ
E8,75 – E9,0		
Kraniale Ganglien	ab E8,75	ab E9,0
Diencephalon	ab E8,75	ab E9,0
Neuralrohr	ab E9,0	ab E9,25
ab E10,5 weitere Signale in		
Mesenzephalon	+	+
Myelenzephalon	+	+
dorsale Wurzelganglien	+	+

E14-E18	NSCL-1	NSCL-2
Telenzephalon	++	++
Hippokampus	++	++
Bulbus olfaktorius	++	++
olfaktorisches Neuroepithel	+++	++
Vomeronasal Organ	+++	+++
Mittelhirn	++	++
Kleinhirn	+++	++
Thalamus	+	++
Hypothalamus	+	++
Nucleus mamillaris	++	++
Nucleus pontis	++	++
Retina	++	++
Rückenmark	++	++
Schädelnerven	+	+
Hypophyse	+	-
Habenularkerne	++	++
DRG	++	++
Adult		
olfaktorischer Nerv	++	++
olfaktorisches Neuroepithel	+	+
Habenular Kern	-	+
Nucleus mammillaris	(+)	-

Die relativen Expressionsstärken (+++ Stark; ++ mittel; + schwach) wurden anhand der LacZ-Signalstärke abgeschätzt. - keine Expression; (x) nicht eindeutig.

3.4.6 NSCL-1 Nullmutanten zeigen keine offensichtlichen Malformationen im ZNS

Zur Untersuchung potentieller Differenzierungsstörungen im adulten Gehirn wurden NSCL-1 homozygote Mutanten morphologisch und immunhistochemisch analysiert. Weder Hämatoxylin noch Nissl Färbungen von Gehirnschnitten zeigten offensichtliche Veränderungen in NSCL-1 Nullmutanten (Abb. 34A-H und Abb.34 rechts A,B). Die Darstellung von Purkinje-Zellen und Korbzellen im Kleinhirn ergab keine Abweichung in NSCL-1 mutanten Mäusen (Abb.34I-L links). Immunanfärbungen mit Antikörpern gegen Calretinin und Calbindin-D28K im Bereich des Kortex ergaben, daß in der NSCL-1 Mutante keine Abweichung in der Anzahl und Differenzierung von Interneuronen zu detektieren war (Abb.34 C-F rechts). Die Darstellung von differenzierten Körner- und Pyramidenzellen mittels anti-Calbindin-D28K Antikörper im Hippokampus, ergab ebenfalls keine Veränderung in NSCL-1 Nullmutanten (nicht gezeigt).

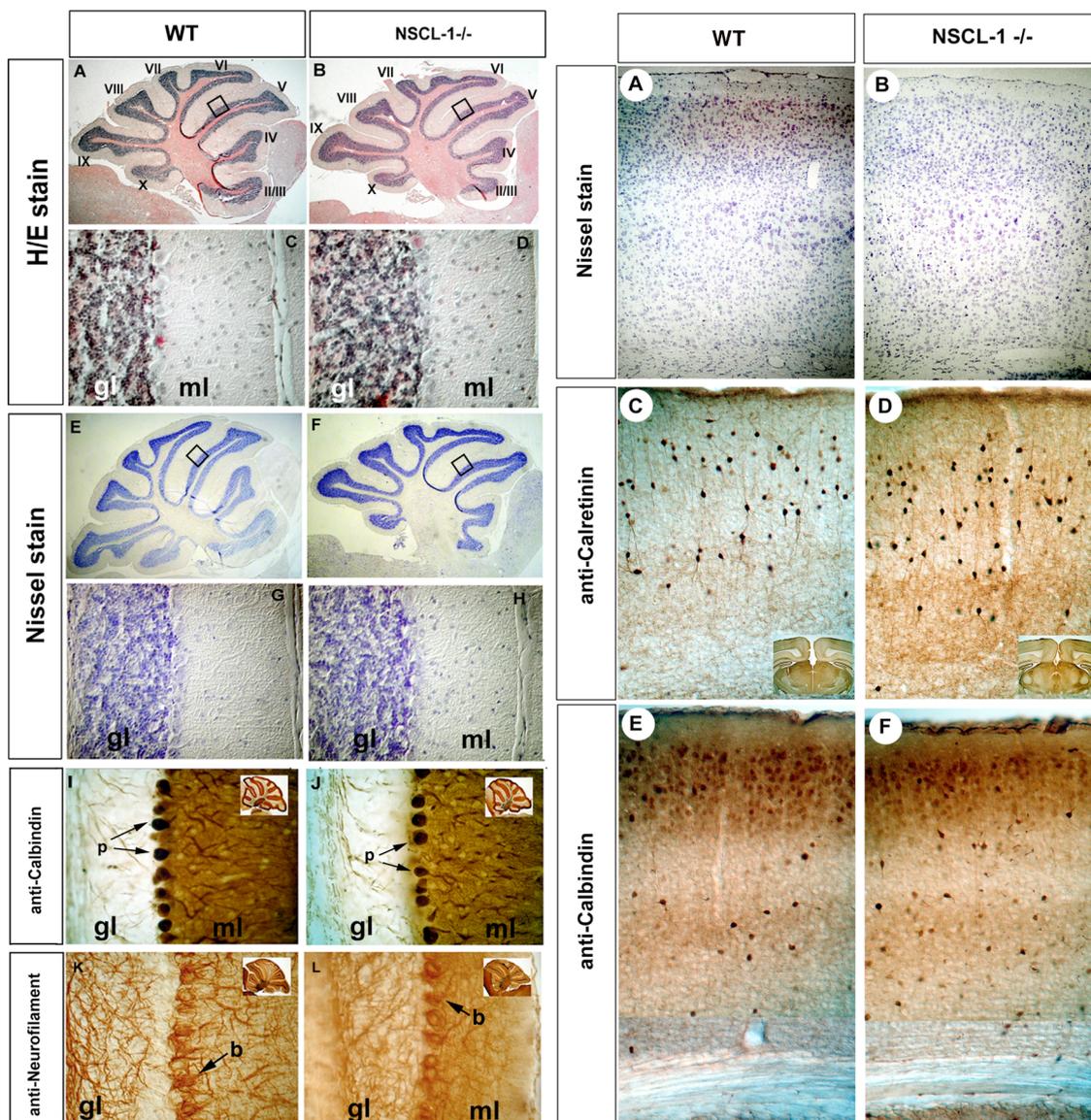


Abb.34: NSCL-1 homozygote Mutanten zeigen keine offensichtlichen Veränderungen im adulten Gehirn (P60).

Die linke Seite stellt repräsentative Schnitte aus dem Kleinhirn dar. Rechts sind repräsentative Bereiche aus dem Kortex gezeigt. A-H (links) Sagittale Paraffin (Schnittdicke 10 μ m) wurden einer Hämatoxylin-(A-D) und einer Nissel Färbung (E-H) unterzogen. In C,D und G,H sind jeweils Ausschnittsvergrößerungen dargestellt. Neben der unveränderten Morphologie und Anzahl der Kleinhirn-Lappen, ist keine offensichtliche Veränderung in der Schichtdicke der Körner- und Molekularschicht zu detektieren. In I-L (links) wurden Vibratomschnitte (Schnittdicke 50 μ m) mit Antikörpern gegen anti-Calbindin-D28K und anti Neurofilament-200 immunhistochemisch angefärbt. Die Pfeile in I und J markieren Purkinje Zellen. Bei den Neurofilament positiven Zellen handelt es sich um Korbzellen. Die Übersichten sind jeweils in der rechten oberen Ecke dargestellt. A,B (rechts) Nissel Färbung frontaler Paraffinschnitte durch den Neokortex. C-F Frontale Vibratomschnitte (Schnittdicke 50 μ m). Die Differenzierung von Interneuronen innerhalb des Neokortex wurde mit Antikörpern gegen Calretinin(C,D) und Calbindin-D28K (E,F) dargestellt. Neben der unveränderten Schichtdicke zeigten NSCL-1 Nullmutanten im Vergleich zu Wildtyp-Gehirnen keine Veränderung in der Anzahl und Differenzierung von Interneuronen. Abkürzungen: b Korbzellen (Basket cell),gl Granuläre Schicht, P Purkinje Zellen, ml Molekulare Schicht.

3.5 NSCL-1 und NSCL-2 doppelt homozygote Mutanten sind nicht lebensfähig.

Zur Generierung von NSCL-1 und NSCL-2 Doppelmutanten wurden zunächst doppelt heterozygote Tiere gezüchtet und untereinander verpaart. Die folgende Tabelle zeigt die möglichen Genotypen und die beobachteten klinischen Phänotypen:

Tabelle: Übersicht über mögliche Genotypen und die daraus resultierenden Phänotypen.

NSCL-1	NSCL-2	Phänotyp
+/-	+/-	kein offensichtlicher Phänotyp
-/-	+/-	einige Tiere zeigen lahmes Hinterbein, weibliche Tiere zeigen teilweise veränderten Zyklus, ansonsten unauffällig
+/-	-/-	infertil und fettleibig wie NSCL-2 -/-
-/-	-/-	letal kurz nach der Geburt

Für die Generierung doppelt homozygoter Mutanten wurden weibliche Tiere mit den Genotypen NSCL-1 +/- x NSCL-2 +/- oder NSCL-1 -/- x NSCL-2 +/- und männliche Tiere mit dem Genotyp NSCL-1 -/- x NSCL-2 +/- eingesetzt. Nach Auswertung von 100 Nachkommen doppelt heterozygoter Verpaarungen konnten bei der Trennung der Nachkommen von den Muttertieren keine doppelt homozygoten Mutanten gefunden werden. Für alle anderen möglichen Genotypen wurde hingegen keine Abweichung vom erwarteten Mendelschen Verteilungsmuster beobachtet. Für die Analyse wurden doppelt homozygote Mutanten, entweder mit NSCL-1 +/- x NSCL-2 +/- oder mit NSCL-1 -/- x NSCL-2 +/- Mutanten, verglichen. Ein Vergleich von doppelt heterozygoten Mutanten, bzw. NSCL-1 -/- x NSCL-2 +/- Mutanten mit Wildtyp-Kontrolltieren, zeigte keine offensichtlichen Veränderungen.

3.5.1 NSCL-1xNSCL-2-Doppelmutanten zeigen keine Störung früher Differenzierungsvorgänge des ZNS

Die Untersuchung früher neuronaler Differenzierungsvorgänge erfolgte mittels whole mount in situ Hybridisierungen. Zur Analyse wurden jeweils Tiere der Genotypen WT, NSCL-1 $-/-$, NSCL-2 $-/-$ und NSCL-1 $-/-$ x NSCL-2 $-/-$ verwendet. Die in situ Hybridisierungen mit cRNA Sonden für Neurogenin-2/Math-4a (nicht gezeigt), NeuroD, und SCG-10 ergab kein verändertes Expressionsmuster bei E10,5 im Vergleich zur Wildtyp-Situation (Abb. 35). Neben der unveränderten Expression in den kranialen Ganglien zeigten auch die Expressionsdomänen im zentralen Nervensystem keine Abweichungen. Die immunhistochemische Anfärbung mit einem anti- β -Tubulin III Antikörper wies ebenfalls nicht auf deutliche, durch die Doppelmutation bedingte Veränderungen hin (nicht gezeigt).

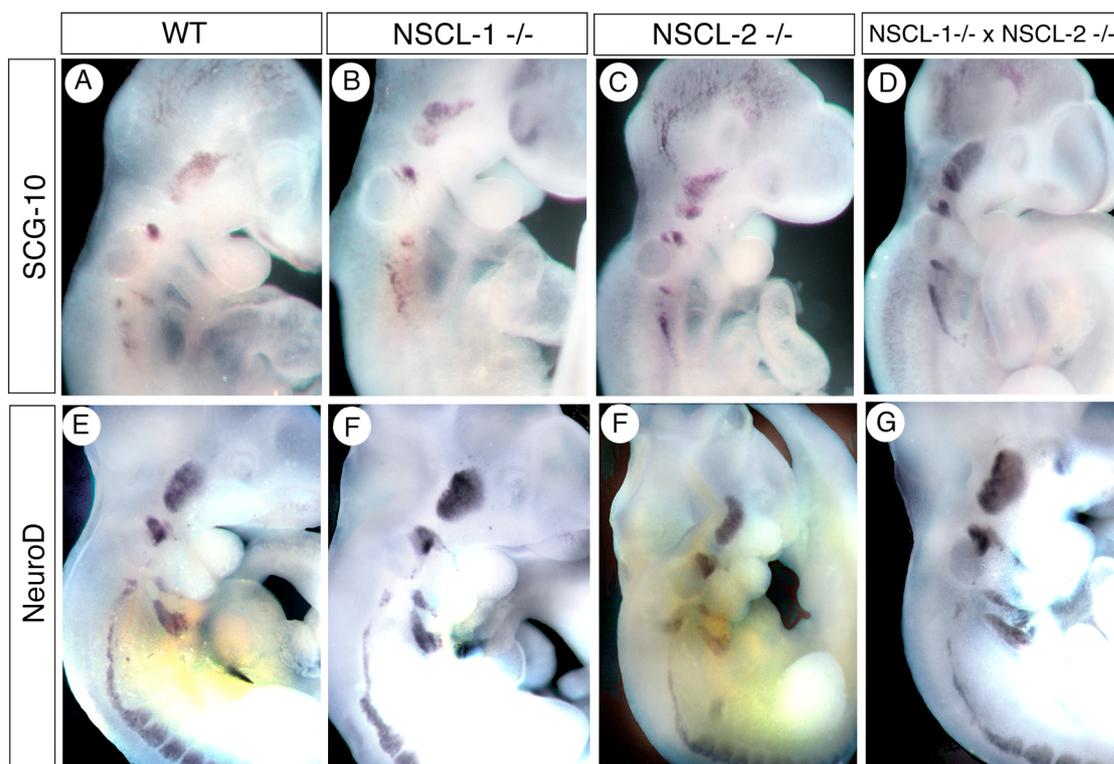


Abb.35: NSCL-1xNSCL-2 Doppelmutanten weisen keine Auffälligkeiten bei der frühen neuronalen Differenzierung auf. Laterale Ausschnitte aus kranialen Bereichen von WT (A,E), NSCL-1 $-/-$ (B,F), NSCL-2 (C,F) und NSCL-1 $-/-$ x NSCL-2 $-/-$ (D,G) Embryonen bei E10,5. Leichte Unterschiede in der Intensität der Hybridisierungssignale sind auf geringfügige Abweichungen in der Somiten-Anzahl zurückzuführen. Neben der unveränderten Expression in den Ganglien trigeminale, vestibulo-cochlearis, geniculatum, petrosus und nodosus, zeigten auch die Expressionsdomänen in Diencephalon, Riechgrube, Neuralrohr und dorsalen Wurzelganglien keine Abweichungen

Bei E14,5 zeigt NSCL-1 im Bereich der subventrikulären Zone und NSCL-2 in marginalen Schichten der kortikalen Platte des Telenzephalons eine starke Expression. Die überlappende

Expression von NeuroD und NeuroD2 innerhalb der kortikalen Platte des Telenzephalons bei E14,5 zeigte in NSCL-1 x NSCL-2 doppelt homozygoten Mutanten keine Veränderung (Abb.36).

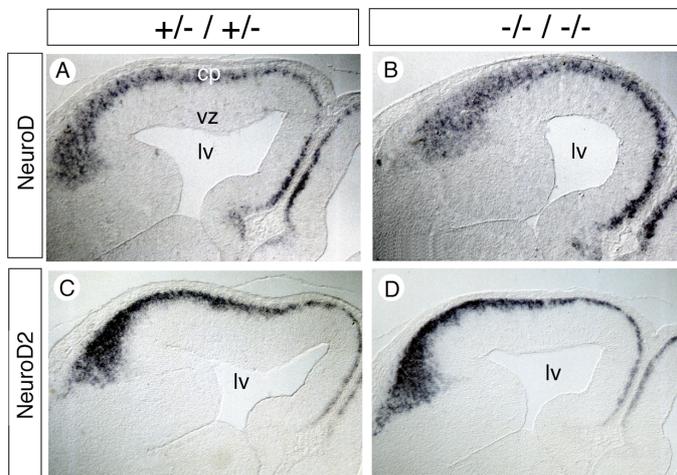


Abb.36: Neuronale Entwicklung der kortikalen Platte von NSCL-1xNSCL-2 Doppelmutanten

Kryotomschnitte (Schnittdicke 20 μ m) von doppelt- hetero (A,C) - und homozygoten (B,D) NSCL-1xNSCL-2 Mutanten. Die Schnitte wurden mit einer cRNA-Sonde für NeuroD (A,B) und NeuroD2 (C,D) hybridisiert. Die überlappende Expression von NeuroD und NeuroD2 innerhalb der kortikalen Platte des Telenzephalons bei E14,5 zeigte in doppelt homozygoten Mutanten keine Abweichung gegenüber doppelt-heterozygoten Kontrolltieren. Abk.: cp kortikale Platte, vz ventrikuläre Schicht, lv laterales Ventrikel

3.5.2 Doppelt homozygote NSCL-1xNSCL-2 Mutanten sterben kurz nach der Geburt.

Doppelt homozygote NSCL-1xNSCL-2 Mutanten zeigten nach der Geburt eine Reihe von Auffälligkeiten. Neben einer Gewichtsreduktion von durchschnittlich 10-20% fand sich bei NSCL-1^{-/-} x NSCL-2^{-/-} Mutanten eine gekrümmte Körperhaltung, gekrümmte Vorderarme und ein arhythmischer Atmungsrythmus (Abb.37). Doppelt homozygote neugeborene Mutanten säugten nicht und hatten daher niemals Milch in ihrem Bauch. Doppelmutanten überlebten nur einige Stunden und wurden in den meisten Fällen vom Muttertier vorher aus dem Nest entfernt. Für die Isolierung lebender doppelmutanter Embryonen wurden diese bei E18,5 kurz vor der Geburt durch Kaiserschnitt entwickelt. Die Anfärbung von Knorpel und Knochen demonstriert die gekrümmte Haltung der Vordergliedmaßen, ansonsten fanden sich im Skelettsystem keine morphologischen Abweichungen.

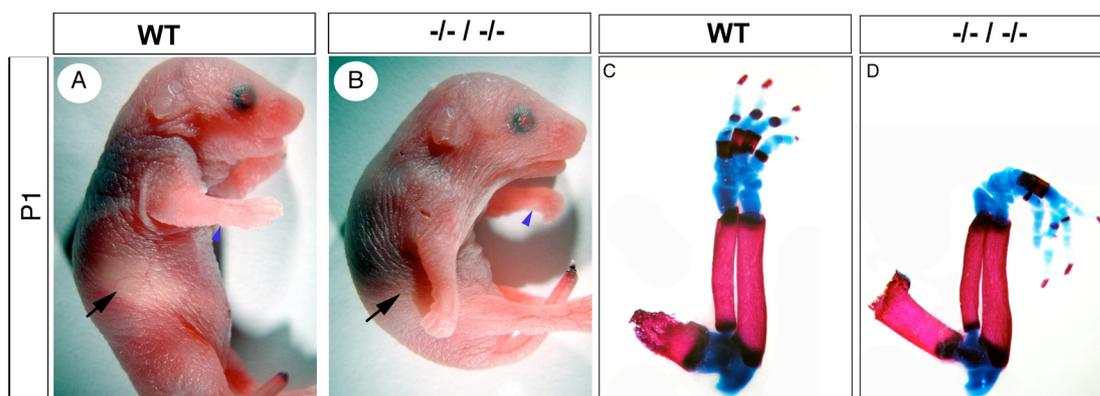


Abb.37: NSCL-1 x NSCL-2 Doppelmutanten sterben kurz nach der Geburt.

Darstellung von Geschwistern einer Verpaarung des Genotyps NSCL-1 +/- x NSCL-2 +/- bei P1. Neben der gekrümmten Körperhaltung zeigen Doppelmutanten nach innen gekrümmte Vordergliedmaßen. Der schwarze Pfeil markiert die von außen sichtbare Milch im Magen eines WT Kontrolltieres. Der blaue Pfeil weist auf die gekrümmten Vordergliedmaßen hin. In C,D wurden die Knorpel (blau) und Knochen (rot) mittels verschiedener Farbstoffe angefärbt. Neben der deutlich sichtbaren Krümmung waren keine morphologischen Veränderungen detektierbar.

Einige Tiere (ca.1-3%) mit dem Genotyp NSCL-1 -/- x NSCL-2 +/- zeigten während früher postnataler und adulter Stadien einen einseitig nach innen gekrümmten und lahmen Hinterlauf (Abb.38). Solche Tiere waren fertil, erreichten ein normales Alter und zeigten keine weiteren Auffälligkeiten. Da sehr wenige Tiere des Genotyps NSCL-1 -/- x NSCL-2 +/- diese Störung zeigten, ist ein direkter Zusammenhang zwischen Genotyp und Phänotyp nicht eindeutig geklärt.

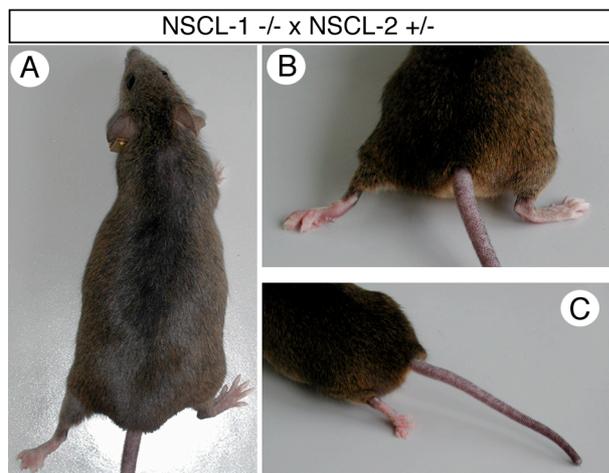


Abb.38. Einige NSCL-1-/- x NSCL-2 +/- Mutanten zeigen einen gelähmten und gekrümmten Hinterlauf. Die Aufnahmen zeigen ein adultes Weibchen des Genotyps NSCL-1 -/- x NSCL-2 +/- von oben (A), von hinten (B) und die lateral (C). Der linke Fuß ist leicht nach innen gedreht und kann von der Mutante nicht aktiv bewegt werden.

3.5.3 Analyse von NSCL-1 x NSCL-2 Doppelmutanten durch in situ Hybridisierung und Immunhistochemie.

3.5.3.1 Kleinhirn

Da doppelt homozygote Mutanten nicht lebensfähig waren, konzentrierten sich die Analysen auf das Stadium E18,5 –P1. Mit Hilfe von in situ Hybridisierungen und Antikörperfärbungen auf Schnitten wurden frontale und sagittale Gehirnschnitte von neugeborenen Doppelmutanten und Kontrolltieren untersucht. Die Analyse mittels Hämatoxylin-Färbung, zeigte keine Abweichung in Größe und Form des Kleinhirns bei doppelt homozygoten Tieren im Vergleich zu Kontrolltieren (Abb.39 A,B). Als cRNA Sonden dienten NeuroD, Reelin, Id1, Id2, und Math-1. Zur Darstellung von Purkinje-Zellen wurde ein anti-Calbindin-D28K Antikörper verwendet. Die Analyse sagittaler und frontaler Kryptoschnitte wies keine wesentlichen Veränderungen in NSCL-1-/-xNSCL-2-/- Doppelmutanten gegenüber Kontrolltieren auf (Abb. 39 u. 40).

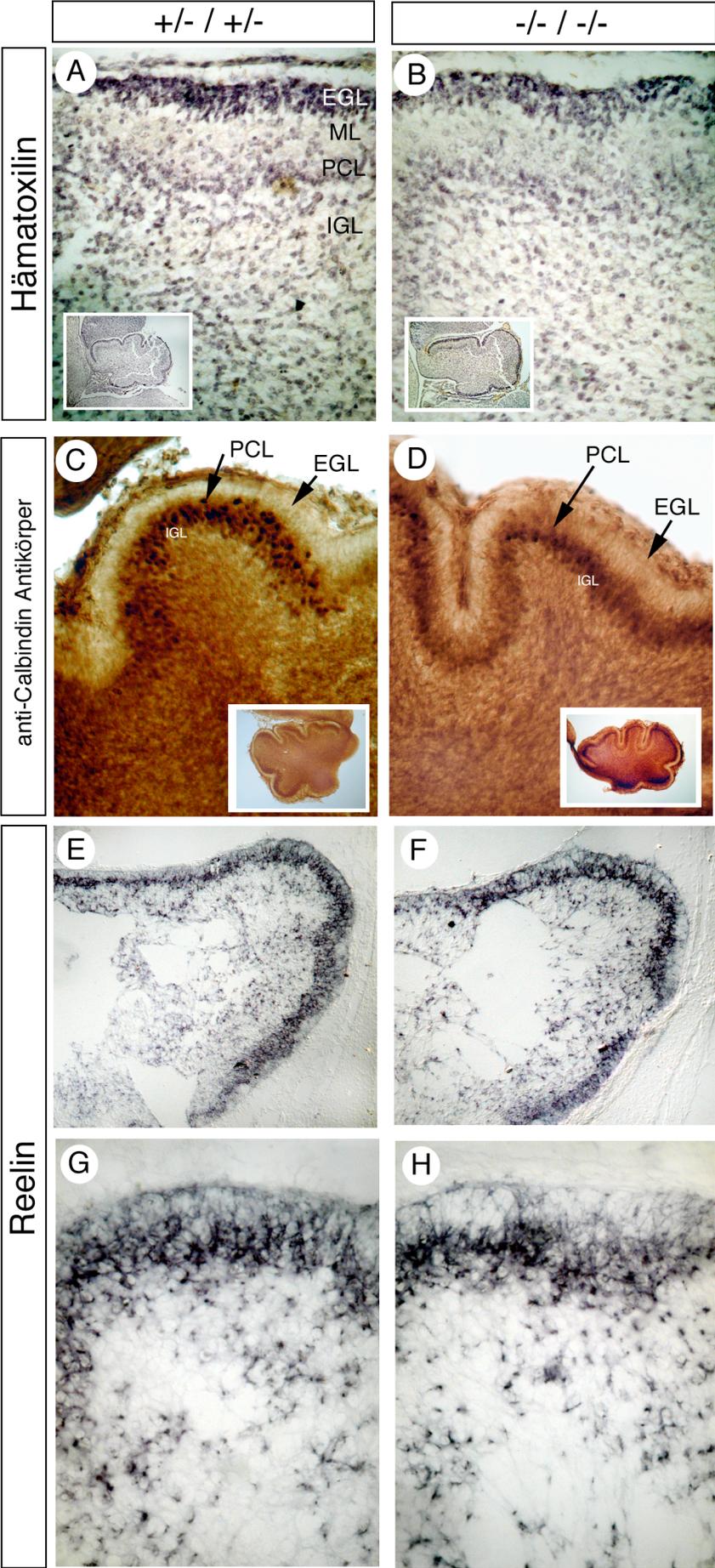


Abb.39 Sagittale und frontale Schnitte bei E18,5 von hetero- und homozygoten NSCL-1x NSCL-2 Doppelmutanten.

A,B Sagittale Paraffinschnitte wurden mit Hämatoxylin gefärbt. Die Formation der einzelnen Schichten sowie die beginnende Entwicklung der Kleinhirnlappen (Lobus) zeigen keine wesentlichen Abweichungen in doppelt homozygoten Mutanten. Die Übersichten sind jeweils links unten in A und B dargestellt. C,D Antikörperanfärbung (mit anti-Calbindin-D28K Antikörper) von freischwebenden Vibratomschnitten (Schnittdicke $50\mu\text{m}$). Übersichten rechts unten in C und D. Die Pfeile in C und D markieren die EGL und die Purkinje-Zellschicht (PCL). Die vergleichende Analyse ergab keine offensichtliche Störung bei der Entwicklung von Purkinje-Zellen in doppelt homozygoten NSCL-1x NSCL-2 Mutanten. E-H Die in situ Hybridisierungen von frontalen Kryotomschnitten (Schnittdicke $30\mu\text{m}$) mit einer Reelin spezifischen cRNA Sonde, zeigte in Doppelmutanten und Kontrolltieren das gleiche Expressionsmuster. Transkripte konnten vor allem in der prä migratorischen Zone der EGL detektiert werden. In G und H sind die entsprechenden Vergrößerungen von E und F dargestellt. Abkürzungen: EGL (external granular layer) externe Körnerzellschicht, IGL (internal granular layer) interne Körnerzellschicht, MI (molecular layer) molekulare Schicht, PCL (Purkinje cell layer) Purkinje Zellschicht.

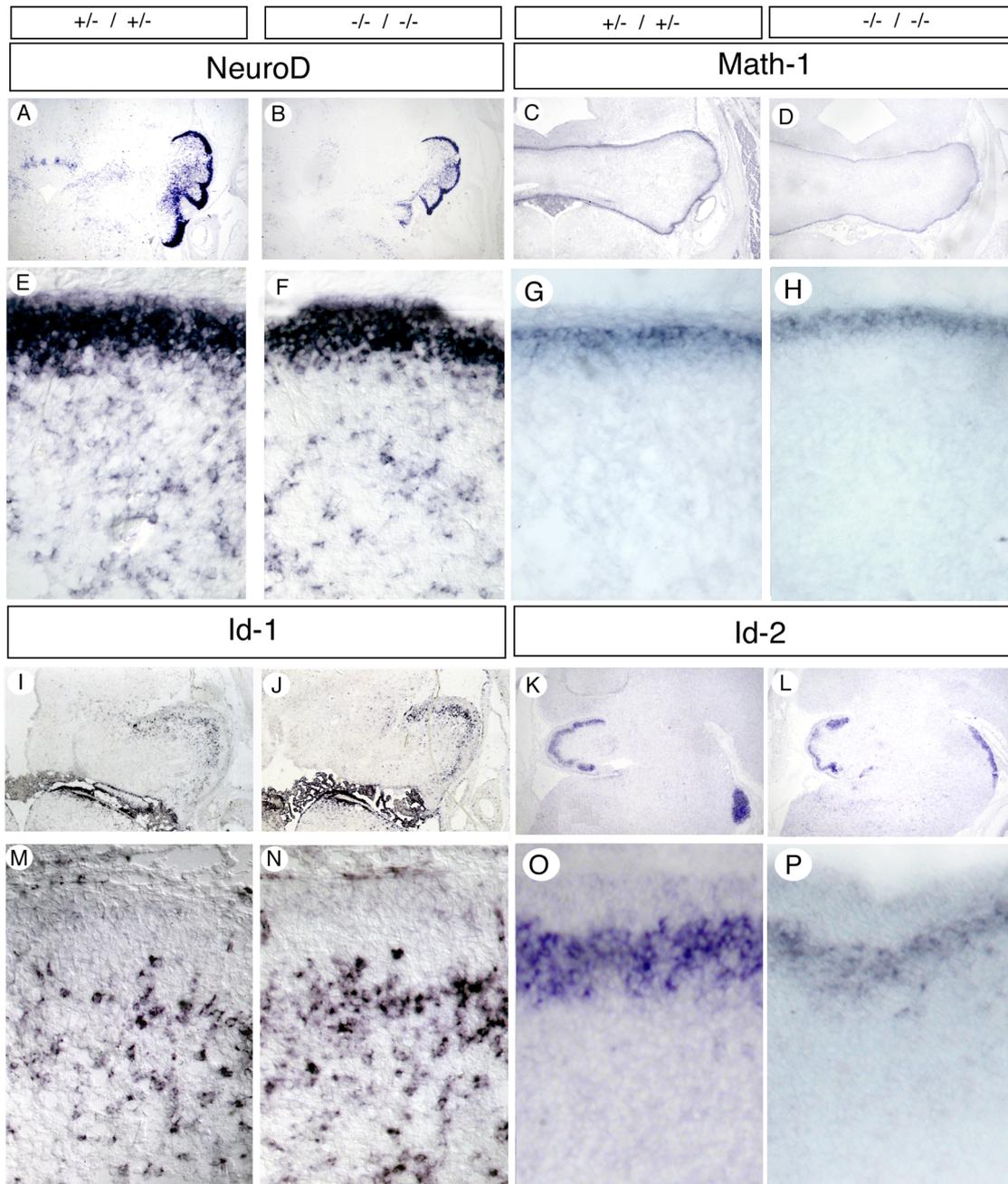


Abb.40: Keine abweichende Expression im Kleinhirn von NeuroD, Math-1, Id1 und Id2 in NSCL-1xNSCL-2 Doppelmutanten bei E18,5. Frontale und sagittale Kryotomschnitte (Schnittdicke 30µm) wurden mit cRNA Sonden für NeuroD, Math-1, Id1 und Id2 hybridisiert. A-H NeuroD und Math-1 werden in der EGL des Kleinhirns detektiert und zeigen kein abweichendes Expressionsmuster in Doppelmutanten. In E-H sind jeweils die Ausschnittsvergrößerungen gezeigt. Die Id2 Expression innerhalb der Purkinje-Zellschicht ist in Doppelmutanten leicht reduziert. A-J und M,N frontale Schnitte, K,L und O,P sagittale Schnitte. Vergrößerungen: Übersichten A-D und I-L 50x; Ausschnittsvergrößerungen: E-H und M-P 400x.

3.5.3.2 Neokortex

Die Analyse des Kortex von neugeborenen Doppelmutanten wies ebenfalls keine wesentlichen Veränderungen gegenüber den Kontrolltieren auf (Abb. 41-42). In einigen Fällen konnte jedoch eine leicht reduzierte Schichtdicke des Neokortex beobachtet werden.

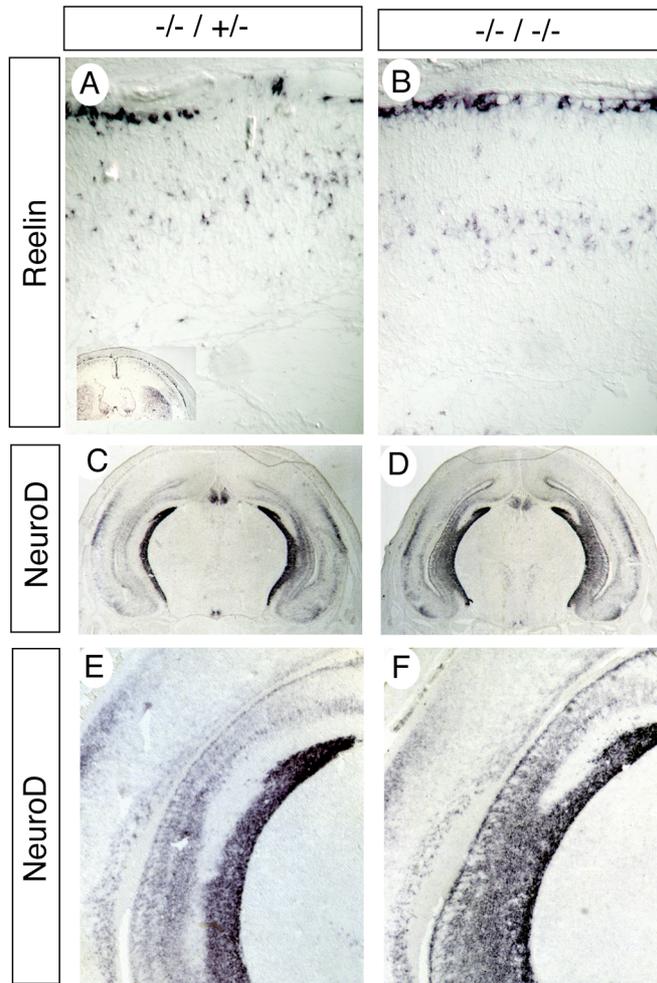


Abb.41 Keine abweichende Expression von Reelin und NeuroD.

Frontale Kryotomschnitte (Schnittdicke 30 μm) von P1 Gehirnen der Genotypen NSCL-1-/- x NSCL-2+/- und NSCL-1-/- x NSCL-2-/- A,B Hybridisierung mit einer Reelin cRNA Sonde. Keine abweichende Expression im Bereich marginaler und intermediärer Schichten. C,D Hybridisierung mit einer NeuroD cRNA Sonde. In E,F sind Ausschnittsvergrößerungen aus dem Hippokampus Bereich dargestellt. Weder Kortex, noch Hippokampus Formation zeigen abweichende NeuroD Expression in doppelt homozygoten Mutanten.

Vergößerungen: A,B 200x; C,D 25x und E,F 100x

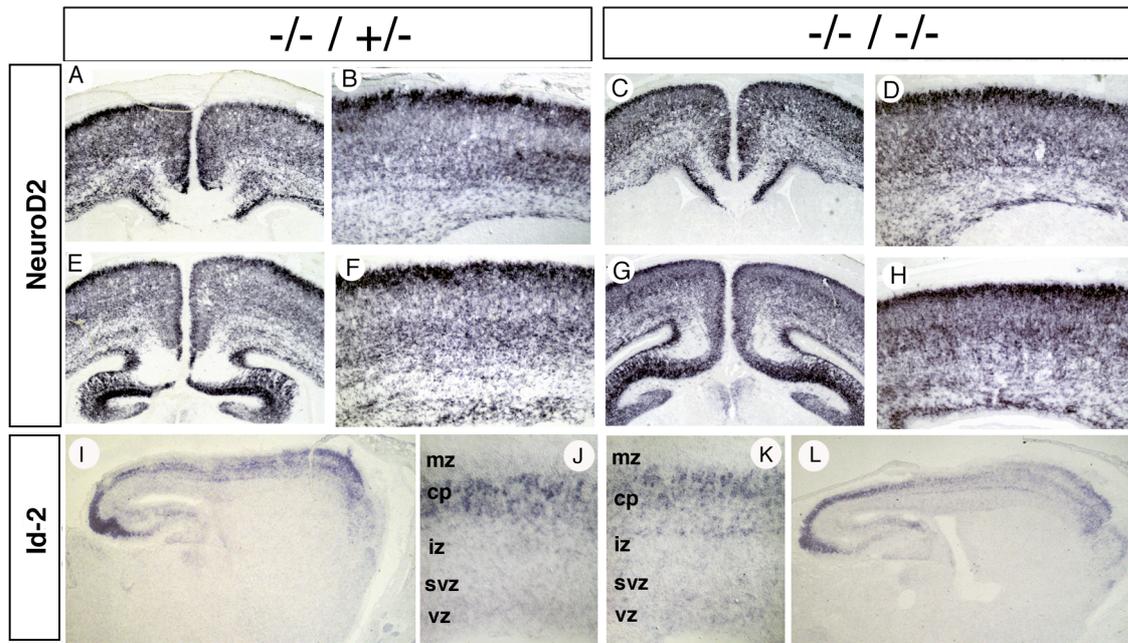


Abb.42 NSCL-1xNSCL-2 doppelt homozygote Mutanten zeigen eine unveränderte NeuroD2 und Id-2 Expression.

A,B, E,F und I,J NSCL-1^{-/-}x NSCL-2^{+/-}; C,D, G,H und K,L NSCL-1^{-/-}x NSCL-2^{-/-}. Frontale Kryotomschnitte (Schnittdicke 30 μ m) wurden mit einer NeuroD2 und Id-2 cRNA Sonde hybridisiert. Der Vergleich von NSCL-1^{-/-}x NSCL-2^{+/-} und NSCL-1^{-/-}xNSCL-2^{-/-} zeigt, daß bis P1 keine deutlichen Unterschiede in der NeuroD2 und Id-2 Expression vorliegen. Die Ausschnittsvergrößerungen in B,F und D,H zeigen deutliche NeuroD2 Signale im Bereich der kortikalen Platte. Der Vergleich der Hybridisierungssignale von Id2 innerhalb des Kortex zeigte keine Abweichungen in NSCL-1^{-/-} xNSCL-2^{-/-} Doppelmutanten gegenüber den Kontrolltieren. Id2 Transkripte konnten in der kortikalen Platte und in der intermediären Zone lokalisiert werden. In J und K sind jeweils Ausschnittsvergrößerungen von I und L dargestellt. Vergrößerungen: A,E und C,G 50x und BD und F,H 100x.

3.5.3.3 Die Anzahl mitotisch aktiver Zellen in NSCL-1xNSCL-2-Doppelmutanten ist reduziert.

□

Die Auswertung derjenigen Zellen, die BrdU inkorporiert hatten, ergab eine Reduktion der Anzahl mitotisch aktiver Zellen in NSCL-1^{-/-}xNSCL-2^{-/-} Mutanten bei E18,5 (Abb.43). Zur Analyse wurden trächtige Muttertiere jeweils für 3h und 9h mit BrdU inkubiert.

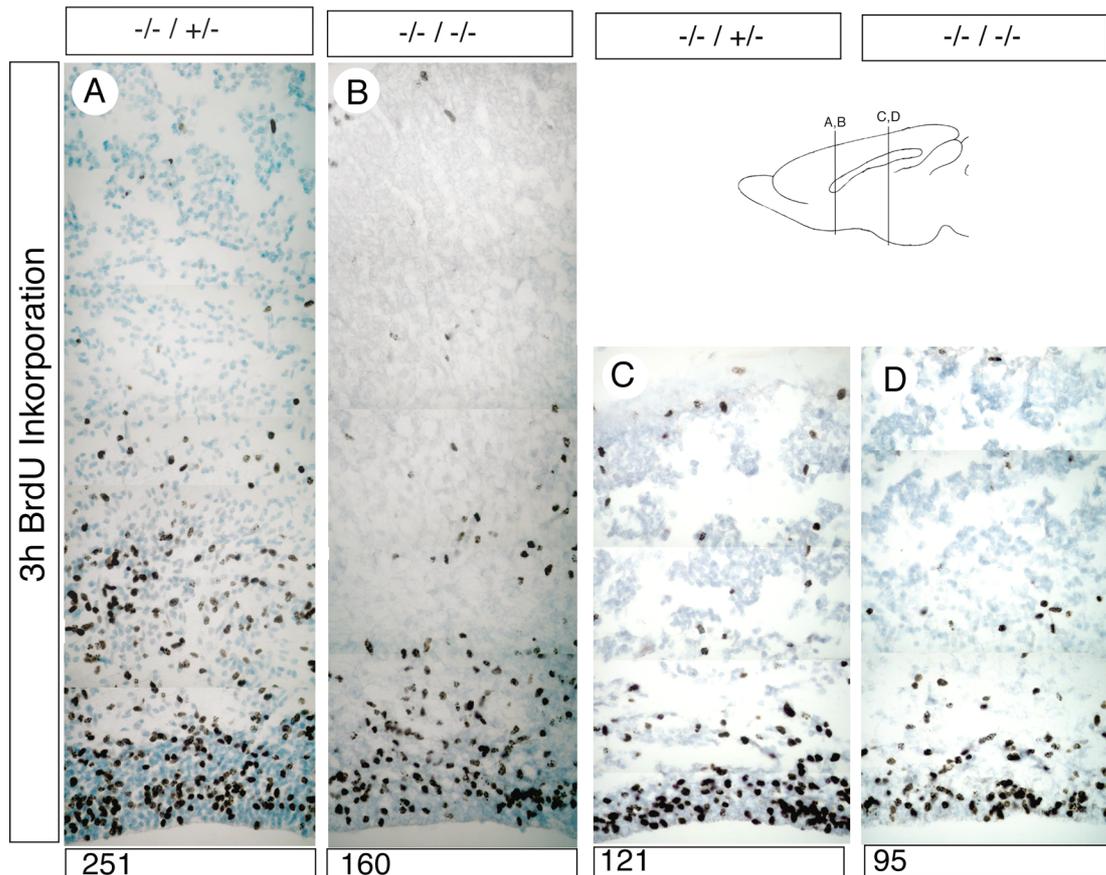


Abb.43: Die Anzahl mitotisch aktiver Zellen ist im Neokortex von NSCL-1xNSCL-2 Doppelmutanten Mäusen reduziert.

Frontale Paraffinschnitte (Schnittdicke 10 μ m) aus rostralen und medialen Bereichen. Die Schnittebenen sind im Schema (rechts oben) eingezeichnet. Nach 3h BrdU Inkorporation wurden die Gehirne isoliert. BrdU positive Zellen wurden immunhistochemisch dargestellt. Die vergleichende Analyse von NSCL-1^{-/-}xNSCL-2^{+/-} und NSCL-1^{-/-}xNSCL-2^{-/-} Mutanten bei E18,5 zeigte eine deutliche Reduktion BrdU positiver Zellen im Neokortex bei NSCL-1^{-/-}xNSCL-2^{-/-} Nullmutanten. Die Anzahl BrdU positiver Zellen ist jeweils im unteren Kasten angegeben. A,B Schnitte aus rostralen Bereich; C,D Schnitte aus medialen Bereichen. Vergrößerungen 400x.

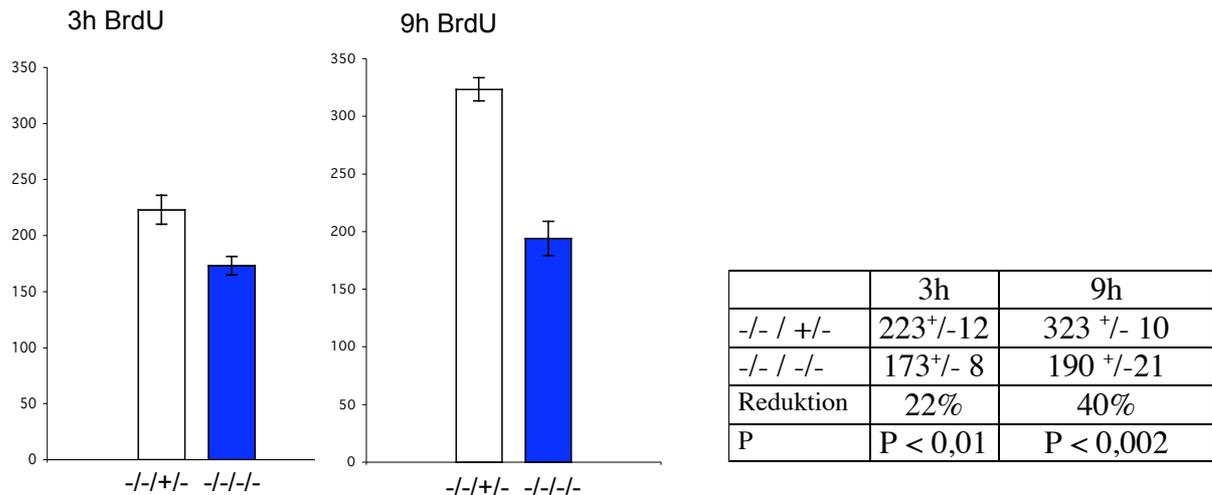
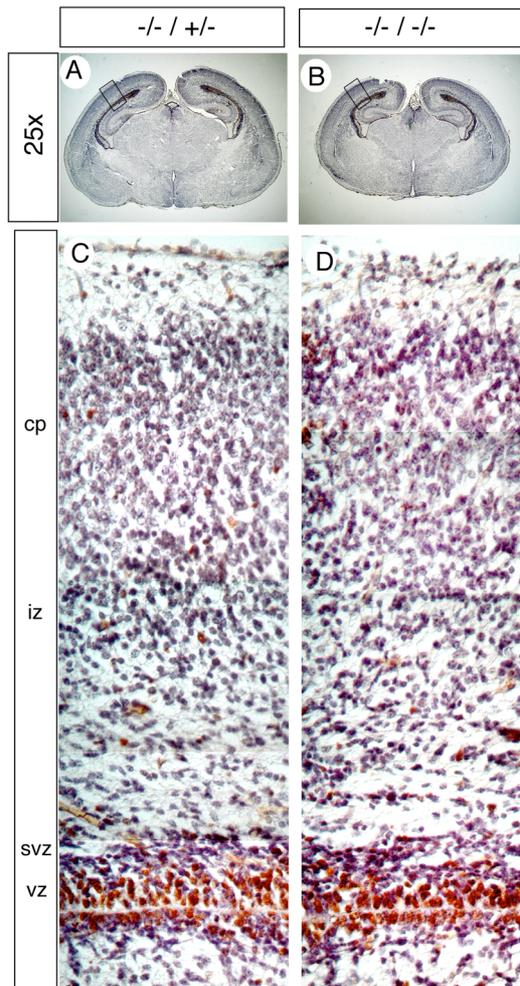


Diagramm 6: Reduktion BrdU positiver Zellen in NSCL-1xNSCL-2 doppelt homozygoten Mutanten.

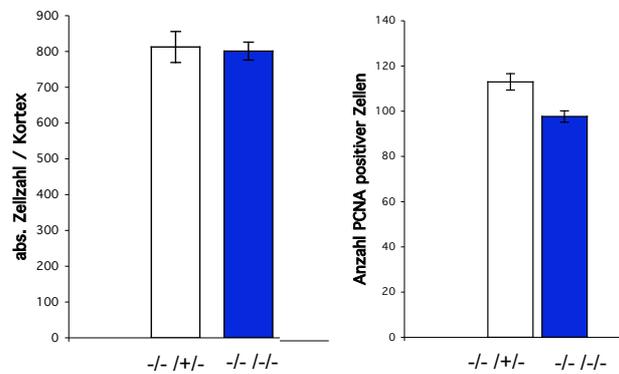
Zur Analyse wurden jeweils 3 mediale Schnitte (n=3) aus dem Bereich des Neokortex von NSCL-1/-xNSCL-2 +/- und NSCL-1xNSCL-2 -/-/-/- Mutanten verwendet. Nach 3h BrdU Inkorporation konnte eine 22%ige Reduktion bzw. nach 9h eine 40%ige Reduktion BrdU positiver Zellen beobachtet werden. Die weißen Säulen markieren NSCL-1/-xNSCL-2 +/-, Die blauen Säulen stellen entsprechend doppelt homozygote Mutanten dar.

Die Markierung mitotisch aktiver Zellen mit einem PCNA Antikörper (Proliferating cellular and nuclear antibody) ergab eine geringere Reduktion in der Anzahl mitotisch aktiver Zellen (14%). Unverändert erscheint die Gesamtzellzahl im Kortex bei P1. Eine mögliche Erklärung für die vergleichsweise geringe Reduktion PCNA positiver Zellen, im Vergleich zu BrdU-positiven Zellen, könnte in der höheren Sensitivität der BrdU-Methode begründet sein. Die Anzahl BrdU positiver Zellen ist ein Integral aller in einer bestimmten Zeiteinheit (Inkubationszeit hier 3h und 9h) mitotisch aktiven Zellen. Dagegen markiert die PCNA Anfärbung lediglich diejenigen Zellen, die zum Zeitpunkt der Anfärbung mitotisch aktiv waren.

**Abb.44 PCNA Antikörperanfärbung**

Frontale Paraffinschnitte (Schnittdicke $10\mu\text{m}$) wurden mit einem anti-PCNA hybridisiert. Nach Antikörperanfärbung erfolgte eine Hämatoxylin-Anfärbung. Neben der unveränderten Zytoarchitektur ergab die Auswertung der Gesamtzellzahl keine wesentliche Abweichung. Die Anzahl PCNA positiver Zellen ist in doppelhomozygoten Mutanten leicht reduziert. Anzahl der ausgewerteten Schnitte (n=3). Der Rahmen in A und B markiert den ausgewerteten Bereich.

NSCL-1xNSCL-2	abs. Zellzahl	PCNA positive Zellen
-/- / +/-	812+/- 43	113+/-2,6
-/- / -/-	801+/-25	97+/-2,5
Reduktion		14%
P		P < 0,01

**3.5.3.4 Retina**

Die Analyse der Retina von neugeborenen NSCL-1^{-/-}xNSCL-2^{-/-} Doppelmutanten und NSCL-1^{+/-}xNSCL-2^{+/-} Kontrolltieren mittels LacZ Färbung und cRNA Sonden für NeuroD und Id1, wies nicht auf wesentliche Veränderungen in NSCL-1xNSCL-2 Doppelmutanten hin. Die Analyse BrdU positiver Zellen innerhalb der NSCL-1/LacZ und NSCL-2/LacZ negativen ventrikulären Schicht ergab, im Gegensatz zu den Befunden im Kortex, keine abweichende Anzahl mitotisch aktiver Zellen (Abb.45)

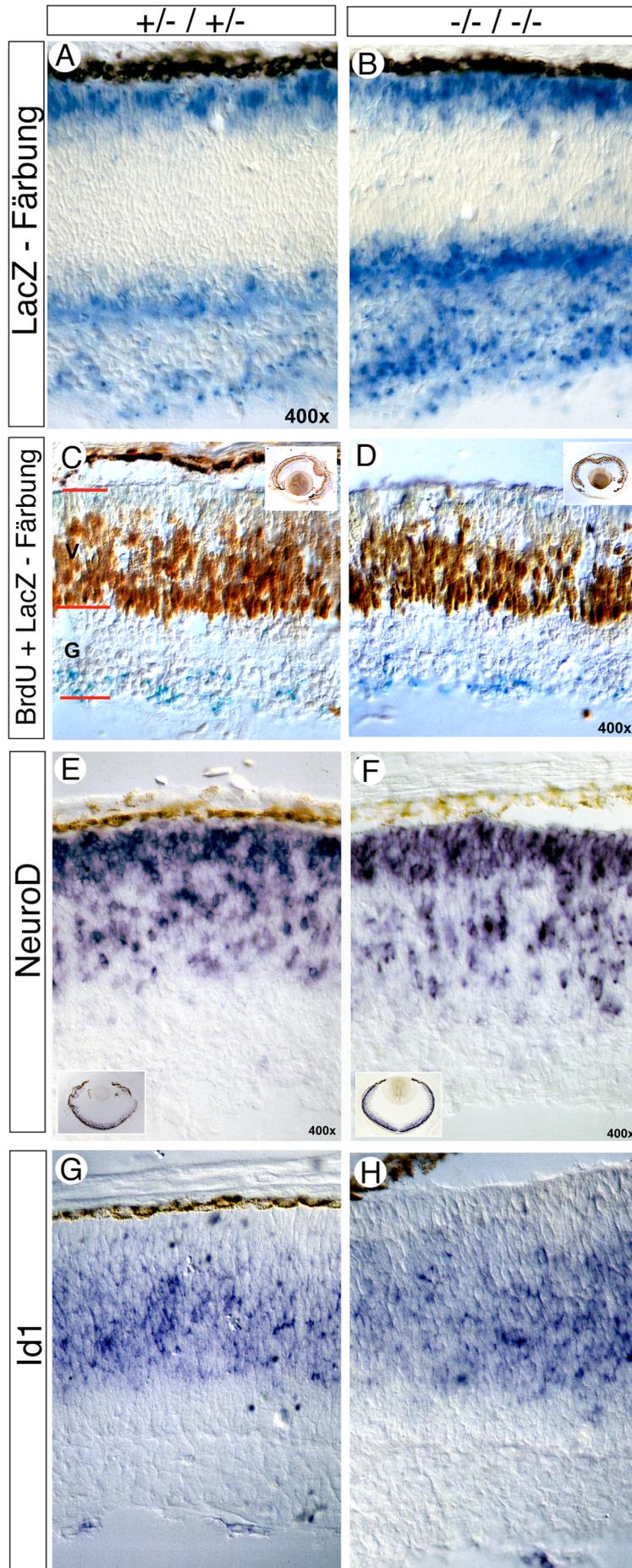


Abb.45: Die Retina von NSCL-1xNSCL-2 doppelmutanten Mäusen zeigt eine unauffällige Expression von NeuroD und Id1.

Frontale Kryotomschnitte (Schnittdicke 20 μ m). A,B LacZ Färbung; C,D immunhistochemische Darstellung BrdU positiver Zellen; E-H in situ Hybridisierung mit NeuroD (E,F) bzw. Id1 (G,H). Zur Orientierung wurde in C und D rechts oben die Übersicht der Retina dargestellt. Die in situ Hybridisierung mit NeuroD und Id1 zeigt keine deutlichen Unterschiede im Expressionsmuster der Retina von Doppelmutanten gegenüber Kontrolltieren bei P1. NeuroD Transkripte lassen sich in der äußeren Hälfte der Retina detektieren. Id1 wird im medialen Bereich der ventrikulären Schicht der Retina exprimiert. Die Auszählung BrdU positiver Zellen ergab keine Unterschiede. Die Doppelanfärbung von NSCL-1/LacZ und NSCL-2/LacZ sowie BrdU positiver Zellen zeigt auch hier keine überlappende Expression. Abweichungen in der Schichtdicke sind auf geringfügige Verschiebungen medialer Schnittebenen zurückzuführen. Abkürzungen: g Ganglion-Zellschicht, v ventrikuläre Schicht.

3.5.3.5 Olfaktorisches Epithel

Im Gegensatz zu den Störungen der terminalen Differenzierung von olfaktorischen Sinneszellen fanden sich keine signifikanten Veränderungen der frühen Schritte der Entwicklung des olfaktorischen Epithels. Die Untersuchung des olfaktorischen Epithels mit cRNA Sonden für NeuroD und Id1 führte nicht zur Aufdeckung größerer Abnormalitäten. Allerdings zeigte Id1 ein leicht erhöhtes Expressionsniveau in NSCL-1xNSCL-2 Doppelmutanten innerhalb der NSCL-1 und NSCL-2 negativen apikalen Zellschicht. Die Expression von NeuroD in der basalen Zellschicht war nicht gestört. Die Anfärbung des olfaktorischen Epithels mit OMP (olfaktorisches Marker Protein) und β -Tubulin III wies bei NSCL-1xNSCL-2 Doppelmutanten auf eine Störung der terminalen Differenzierung des olfaktorischen Neuroepithels hin. Die Differenzierung der ableitenden NSCL-1 und NSCL-2 positiven olfaktorischen Nervenfasern scheint jedoch nicht gestört zu sein (Abb.46).

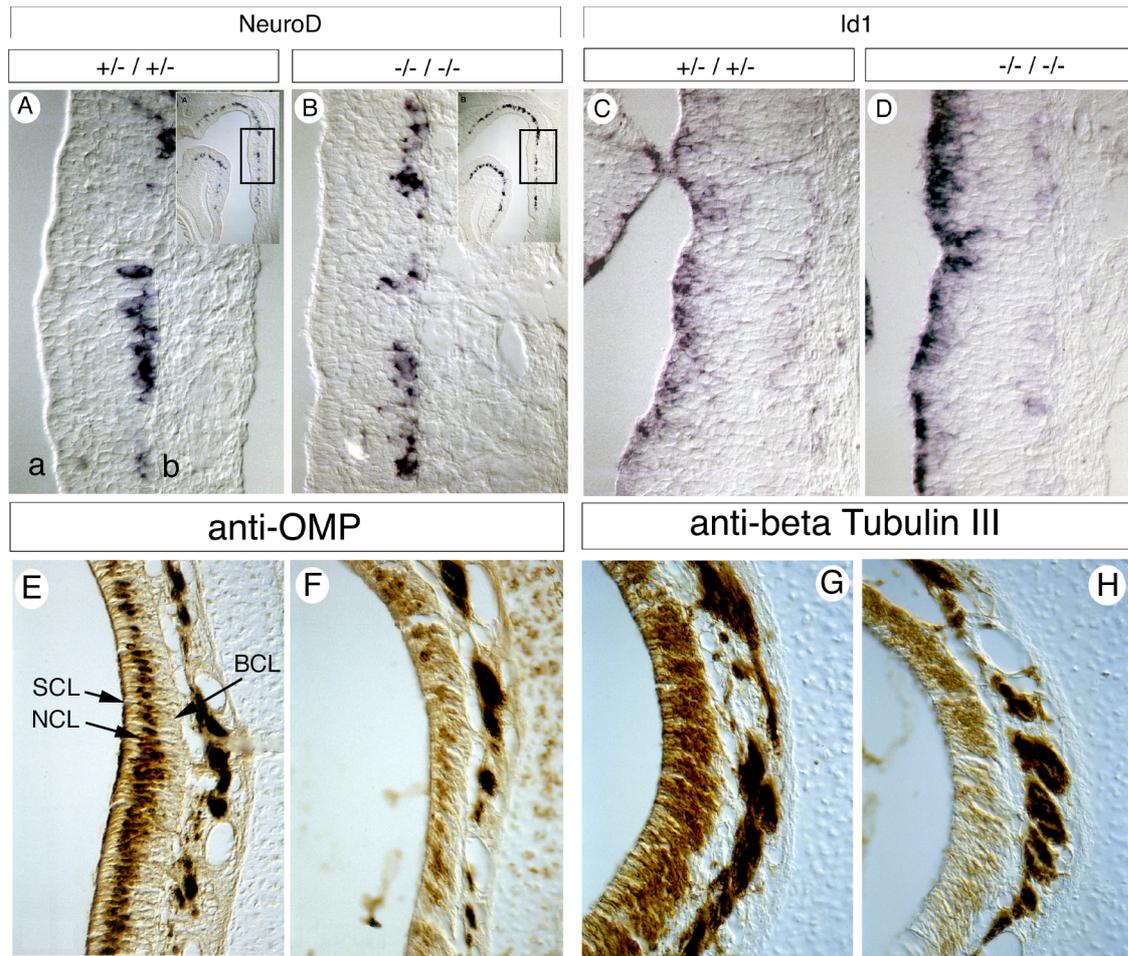


Abb. 46: Störung der terminalen Differenzierung innerhalb des olfaktorischen Neuroepithels.

A-D Frontale Kryotomschnitte (Schnittdicke $30\mu\text{m}$). In situ Hybridisierungen mit cRNA Sonden für NeuroD und Id1. Die Expression von NeuroD zeigt keine Auffälligkeiten. Demgegenüber ist die Expression von Id1 in Doppelmutanten leicht erhöht. E-H Die terminale Differenzierung wurde mittels anti-OMP und anti β -Tubulin III Antikörpern untersucht. In doppelt homozygoten Tieren ist die terminale Differenzierung gegenüber Kontrolltieren gestört. Die ableitenden Nervenfasern zeigen keine morphologischen Veränderungen. Abkürzungen: a apikal, b basal, NCL neuronale Zellschicht, SCL Stützzellschicht, BCL basale Zellschicht.

Innerhalb der apikalen Zellschicht konnte mittels BrdU Inkorporation eine Reduktion mitotisch aktiver Zellen ausgemacht werden. Während der Embryonalentwicklung (E11-E18) befinden sich 99%-50% der mitotisch aktiven Zellen innerhalb der apikalen Schicht. Nach Migration dieser mitotisch aktiven Vorläuferzellen in basale Zellschichten beginnt die Differenzierung olfaktorischer Neurone. Während früher postnataler Stadien lassen sich mitotisch aktive Vorläuferzellen (50%-85%) in basalen Zellschichten detektieren. In NSCL-1xNSCL-2 doppelt homozygoten Mutanten ist die Anzahl mitotisch aktiver Vorläuferzellen innerhalb des olfaktorischen Neuroepithels reduziert. Deutlich wird diese Reduktion in der apikalen Zellschicht (Abb. 47 markiert durch Pfeile), des sich entwickelnden olfaktorischen Epithels. Im sog. Vomeronasal Organ konnten keine Veränderungen der Anzahl mitotisch aktiver Zellen detektiert werden.

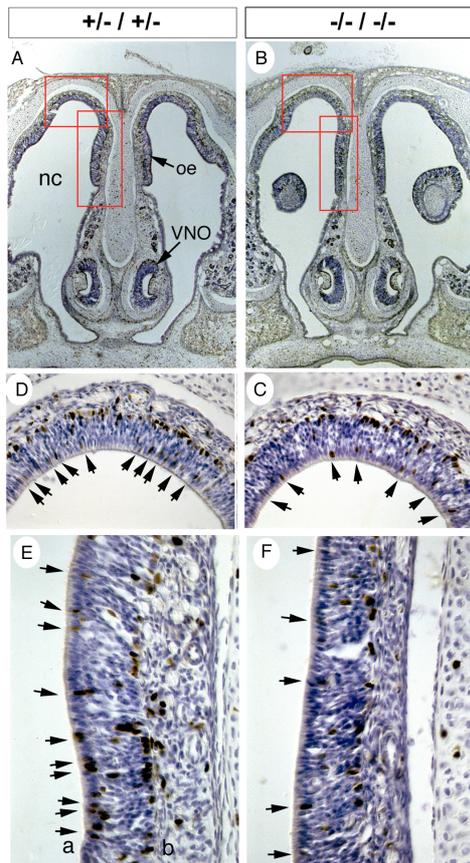


Abb.48 Reduzierte Anzahl mitotisch aktiver Zellen im olfaktorischen Epithel in NSCL-1xNSCL-2 Doppelmutanten bei E18,5.

Frontale Paraffinschnitte (Schnittdicke $10\mu\text{m}$). Nach 90 min. BrdU Inkorporation, wurden BrdU positive Zellen immunhistochemisch dargestellt. A,B Übersicht. In D,C und E,F sind jeweils Ausschnittsvergrößerungen gezeigt. Neben einer totalen Reduktion zeigen vor allem apikale Bereiche eine deutliche Reduktion BrdU positiver Zellen. Die Pfeile in D-F markieren mitotisch aktive Zellen in apikalen Zellschichten. Abkürzungen: a apikal, b basal, nc Nasenhöhle, oe olfaktorisches Neuroepithelium, VNO Vomeronasal Organ. Der rote Rahmen markiert jeweils die vergrößerten Bereiche in D,C und E,F. Die roten Rahmen legen ebenfalls den analysierten Bereich fest.

Tabelle: BrdU positive Zellen innerhalb der eingerahmten Bereiche. (n=3)

NSCL-1xNSCL-2	BrdU positive Zellen
-/- / +/-	53 +/-3
-/- / -/-	38 +/-5
Reduktion	18%
P	P < 0,002

3.6 Die Analyse des Phänotyps NSCL-1xNSCL-2 doppelmutanter Mäuse mittels DNA-Array-Hybridisierung

Bei der bislang dargestellten Analyse NSCL mutanter Mäuse wurde die Expression einzelner Gene untersucht, die exemplarisch für bestimmte Entwicklungsvorgänge stehen. Eine prinzipiell andere Vorgehensweise besteht in der simultanen Untersuchung des Expressionsmusters einer größeren Anzahl von Genen. Durch die Entwicklung von DNA-Array Techniken sind hierfür die technischen Voraussetzungen geschaffen worden. Zur Herstellung von Arrays werden Oligonukleotide oder cDNA Fragmente auf Nylonmembranen oder Glaschips gespottet. Anschließend werden Proben aus den zu untersuchenden Geweben hergestellt. Dies geschieht durch die Isolierung der mRNA aus dem Gewebe, gefolgt von ihrer reversen Transkription und radioaktiver Markierung. Nach Hybridisierung der Filter mit den markierten Proben und Autoradiographie werden die Signale auf den jeweiligen Filtern ausgewertet.

Für die Analyse der NSCL-1xNSCL-2 Mutanten wurde das Atlas 1.2 Array System der Firma Clontech verwendet. Bei diesem System sind 1176 cDNA Fragmente von 200bp-600bp auf eine positiv geladene Nylon Membran gespottet. Zur Generierung der Proben wurden jeweils 100mg Gehirngewebe von Embryonen des Entwicklungstages 18,5 als Ausgangsmaterial verwandt. Nach Isolierung der Gesamt-RNA und DNase Verdau, wurden 60µg (DNA freie) Gesamt-RNA für die Markierung der Proben verwandt. Die Markierung der Proben erfolgte durch spezifische Primer (CDS Primer Mix), so daß nur cDNA Fragmente amplifiziert und markiert werden die auf den jeweiligen Filtern vorhanden waren. Neben den zu untersuchenden Genen befanden sich weiterhin eine Reihe positiver und negativer Kontrollproben auf den Filtern (siehe Tabelle Seite 111). Die Markierung der cDNA Fragmente erfolgte mittels γ -³²P dATP. Die Filter wurden für 1 Woche exponiert. Die Auswertung der Signale wurde durch direkten Vergleich der Expressionstärke korrespondierender Signale vorgenommen. Durch ein Koordinatensystem konnten die Hybridisierungssignale den jeweiligen Genen zugeordnet werden. In der Tabelle auf Seite 111 sind die Gene aufgeführt, die in den Doppelmutanten ein erhöhtes oder erniedrigtes Expressionsniveau zeigen.

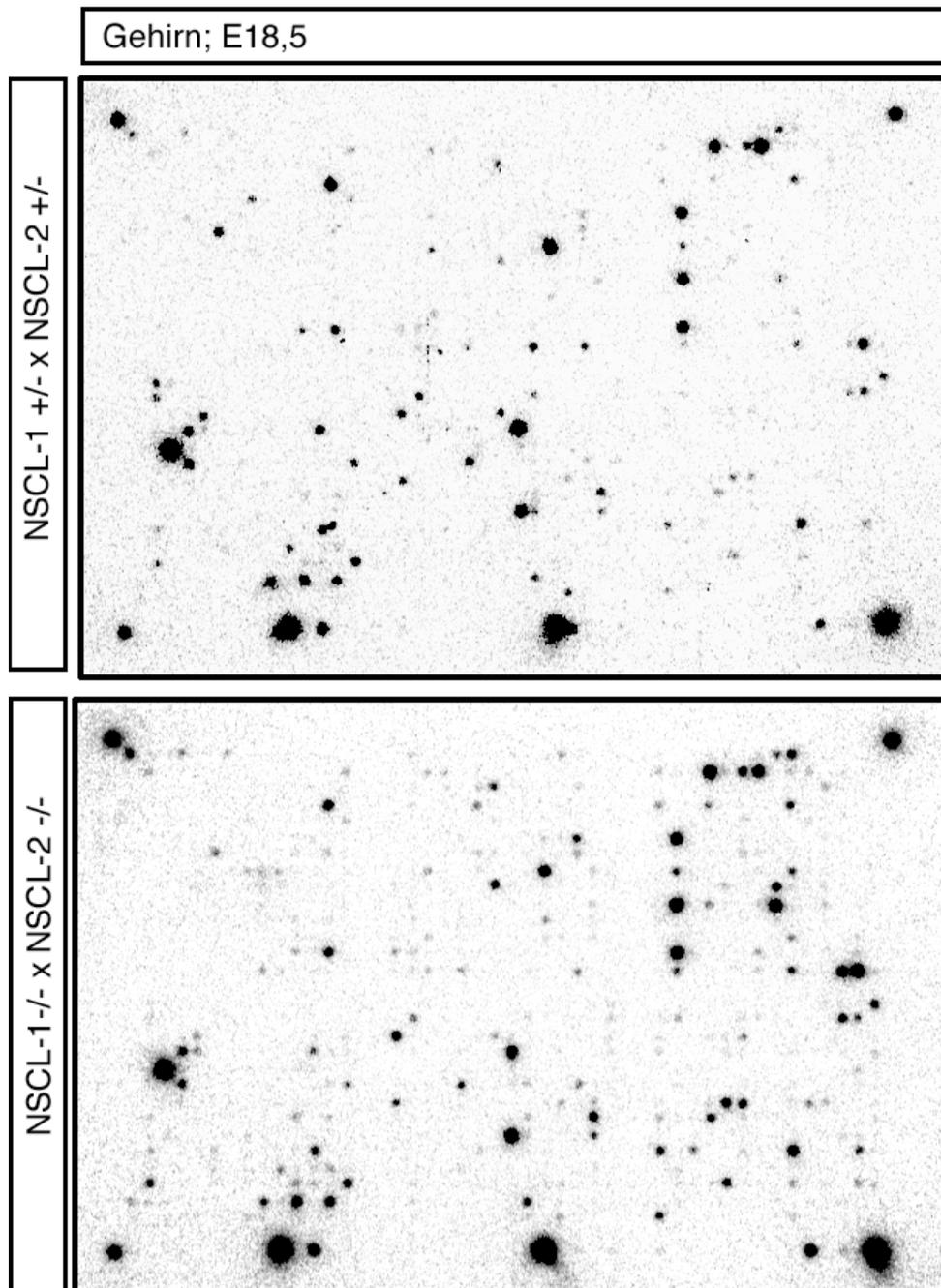


Abb.49: Hybridisierung mit markierten cDNA Proben aus Gehirnen von NSCL-1^{+/-}xNSCL-2^{+/-} und NSCL-1^{-/-}xNSCL-2^{-/-} bei E18,5.

Oben: NSCL-1^{+/-}xNSCL-2^{+/-} und unten NSCL-1^{-/-}xNSCL-2^{-/-}. Nach Amplifizierung der cDNA mit dem CDS Primer Mix in Gegenwart von γ -³²P dATP erfolgte die Hybridisierung der Filter über Nacht bei 65°C. Ein Vergleich der Filter mit Hilfe eines Koordinatensystems ergab eine Reihe von veränderten Hybridisierungssignalen in der Doppelmutante (unten).

Tabelle : Veränderte Genexpression in NSCL-1/-xNSCL-2 Mutanten.

Angegeben sind die Gene, die in der NSCL-1/-xNSCL-2/- Mutante gegenüber der doppelt heterozygoten Situation kein Signal, ein schwächeres oder stärkeres Hybridisierungssignal zeigen. Die Kandidaten sind in 6 Bereiche eingeteilt A-F.

Koordinaten Genbank Nr.	kein Signal	schwächeres Signal	stärkeres Signal
A			
A08e U45665	CUT-Related Homeobox Cux-1 CUTL1		
A06g M80840		Necdin (NDN)	
A01a X17320			Purkinje cell protein-4 (PCP4), brain specific polypeptide PEP19
B			
B09n U62638	Cyclin C (G1-specific)		
B10h M83749		Cyclin D2 (G1/S- specific)	
B12f X56135			Prothymosin alpha (PTMA) Cell cycle protein
B07i X57621			Y box-binding protein 1
C08j X68193			Nucleoside diphosphate kinase B (NDP kinase B)
C			
C08i U65594			Breast cancer type 2 (BRCA2)
C09h U13705			Plasma glutathione peroxidase precursor (GPX-3)
C12n			Prostaglandin D2 Synthase (21kDa, brain)
C09a			Heat shock 84kDa protein HSP90beta
D			
D02a U17162	BCL2-binding athanogene 1 (BAG1)		
D02b L22472	BCL2-associated X Protein Membran-Isoform		
D12d X16053		Prothymosin beta 4 TMSB4	
D09m S49542		5-hydroxytryptamine- Rezeptor2Serotonin Rezeptor	
D05c M28998		FGFR-1	
D02l M94335			Rac β -Serin/Threonin Kinase; c-akt
E			
E07c M60778		LFA1- β ; Integrin α -L	
E11n M20473		cAMP-dependent protein- kinase type 1	

F			
F05g D00611			Basic innunglobulin superfamily precursor (BASIGIN)
F06g U52826			Syndecan 3
F04h M59470			Cystatin C precursor (CST3)
F05l			Non-muscle cofilin 1 (CFL1)
F01n			14-3-3 Protein eta; protein Kinase C inhibitor protein 1 (KCIP1)

Alle Negativkontrollen (z.B. Lambda DNA, pUC 18 Plasmid DNA und genomische Maus DNA) zeigten keine Signale. Positivkontrollen (z.B. „housekeeping“ Gene wie GAPDH, Ubiquitin und HPRT) zeigten die erwarteten Signale und vergleichbare Intensitäten.

Interessanterweise waren die Gene in ihrer Expression verändert, die eine Rolle bei der Regulation des Zellzyklus spielen. Hier sind besonders die Gene Cyclin D2 und Cyclin C zu nennen, die in NSCL-1xNSCL-2 defizienten Gehirnen deutlich reduziert waren. Die Inaktivierung von Cyclin D2 in der Maus führt zu einer deutlichen Entwicklungsstörung von Körnerzellen im Kleinhirn (siehe Einleitung), (Huard *et al.*, 1999). Ähnlich wie Cyclin D wird auch Cyclin C eine wichtige Rolle bei der Kontrolle des G₁/S-Phase-Übergangs zugesprochen. Die Überexpression von Cyclin C *in vivo* führt jedoch ebenfalls zu einer Induktion von CDC2, einer „cyclin dependent kinase“, die eine wichtige Rolle bei der Regulation des G₂/M Phase Übergangs spielt (Liu *et al.*, 1998). Ob Cyclin C tatsächlich eine ambivalente Funktion bei der Regulation des G₁/S und G₂/M Übergangs innerhalb des Zellzyklus einnimmt, ist noch unklar.

Ebenfalls reduziert war die Expression des Homeobox Proteins Cux-1. Neben der Expression in der Niere und Lunge wird Cux-1 während embryonaler Entwicklungsstadien in postmitotischen Zellen des zentralen und peripheren Nervensystems exprimiert (Heuvel *et al.*, 1996). Weiterhin konnte *in vivo* gezeigt werden, daß Cux-1 als Repressor des neuronalen Zell-Adhensionsmoleküls (NCAM) fungiert (Valarche *et al.*, 1993). Neuere Untersuchungen konnten zeigen, daß die Inaktivierung von Cux-1 in der Maus zu einer deutlichen Abnahme der Reproduktivität führt (Nepveu, 2001). Ob in Cux-1 defizienten Mäusen eine Störung des GnRH Systems vorliegt, ist nicht bekannt.

Die Inaktivierung von Necdin in Mäusen führt ebenfalls, wie bei NSCL-2 defizienten Mäusen, zu einer deutlichen Störung des GnRH Systems. So konnte in Necdin defizienten Mäusen eine 29%ige Reduktion GnRH positiver Zellen beobachtet werden (Muscatelli, *et al.*, 2000).

Neben Zellzyklus regulierenden Genen waren auch einige Gene verändert, die eine wichtige Rolle innerhalb apoptotischer Prozesse spielen. So konnten in NSCL-1xNSCL-2 defizienten Gehirnen deutlich reduzierte Signale für zwei Mitglieder der Bcl-2 Familie detektiert werden. Die meisten Mitglieder der Bcl Familie haben eine hemmende Wirkung auf apoptotische Vorgänge. Bcl-2 blockiert die Apoptose, die durch Ca^{2+} Ionen induziert wird. Da die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration eine wichtige Rolle bei der Apoptose spielt, haben dieser und andere Befunde zu der Hypothese geführt, daß Bcl-2 direkt oder indirekt an der zellulären Verteilung von Ca^{2+} - Ionen beteiligt ist. Die in NSCL-1xNSCL-2 mutanten Mäusen herunterregulierten Gene Bax-1 und Bag-1 sind potentielle Bindungspartner von Bcl-2 (Oltvai., 1993), (Takayama *et al.*, 1995)

Ein deutlich erhöhtes Signal konnte für das BRCA-2 Gen (Breast Cancer 2-Gen) beobachtet werden. Das BRCA-2 Gen kodiert für einen Transkriptionsfaktor (Zinkfingerprotein), der die Expression anderer Gene reguliert, die für das Zellwachstum von Bedeutung sind (Zheng *et al.*, 2000).

FGF-2 defiziente Mäuse zeigen eine deutliche Reduktion in der Schichtdicke der Großhirnrinde (Dono *et al.*, 1998). Die Analyse von Dono und Mitarbeitern ergab für FGF-2 eine Funktion als Differenzierungsfaktor von neuronalen Zellen innerhalb kortikaler Strukturen. Bindungsstudien haben gezeigt, daß FGF-2 an den FGF-1 Rezeptor bindet (Clarke *et al.*, 2001). Durch die deutliche Reduktion des FGF-1 Rezeptors in NSCL-1xNSCL-2 defizienten Gehirnen könnte eine mögliche Funktion von FGF-2 inhibiert werden. Ob eine mögliche Blockierung von FGF-2 tatsächlich in NSCL-1xNSCL-2 mutanten Mäusen für Störungen kortikaler Strukturen sorgt, müssen weitere Untersuchungen klären.

Der am weitesten verbreitete Calcium-Rezeptor ist das Calmodulin. Durch die Bindung von Ca^{2+} wird die Affinität zu verschiedenen Zielenzymen innerhalb der Signalkaskade von Calmodulin stark erhöht. Bei niedrigem Ca^{2+} -Spiegel in der Zelle assoziiert Calmodulin mit verschiedenen Protein wie Neuromodulin (GAP-43), Neurogranin (RC3) und PEP-19. Bisher wird vermutet, daß Proteine wie Neuromodulin oder PEP-19 die Aktivität von Calmodulin bei basalem Ca^{2+} -Spiegel inhibieren (Erhardt *et al.*, 2000). Welchen Einfluß das erhöhte PEP-19 Signal in NSCL-1xNSCL-2 mutanten Mäusen hat, konnte bisher noch nicht geklärt werden.

4. Diskussion

Durch molekularbiologische Methoden konnte eine Vielzahl von neuronalen bHLH Transkriptionsfaktoren identifiziert und charakterisiert werden. Für die vorliegende Arbeit wurden transgene Mauslinien mit einer Nullmutation für NSCL-1 und NSCL-2 generiert. Frühere Untersuchungen haben gezeigt, daß die Inaktivierung des NSCL-2 Gens zu einem hypogonadalen Hypogonadismus und einer deutlichen Gewichtszunahme nach der Pubertät führt. Ein Schwerpunkt der Arbeit lag darin, die Mechanismen näher zu analysieren, die für die Steuerung der Fertilität und Gewichtsregulation verantwortlich sind. Weitgehend unverstanden ist die Funktion von NSCL-1 während embryonaler und postnataler Entwicklungsstadien. Durch Inaktivierung in der Maus sollte die Rolle des NSCL-1 Gens während neuronaler Entwicklungsvorgänge näher charakterisiert werden. Das Einfügen eines transgenen Reportergens, welches für die β -Galaktosidase kodiert, erlaubte die Darstellung des räumlichen und zeitlichen Expressionsmusters von NSCL-1 und NSCL-2.

Ein weiterer Schwerpunkt der Arbeit lag in der kombinierten Inaktivierung beider Gene. Durch die Kreuzung der jeweiligen Einzelmutanten wurden Mausmutanten gezüchtet, die doppelt homozygot für NSCL-1 und NSCL-2 waren. Die Inaktivierung beider Gene sollte mögliche redundante Funktionen zwischen NSCL-1 und NSCL-2 aufklären.

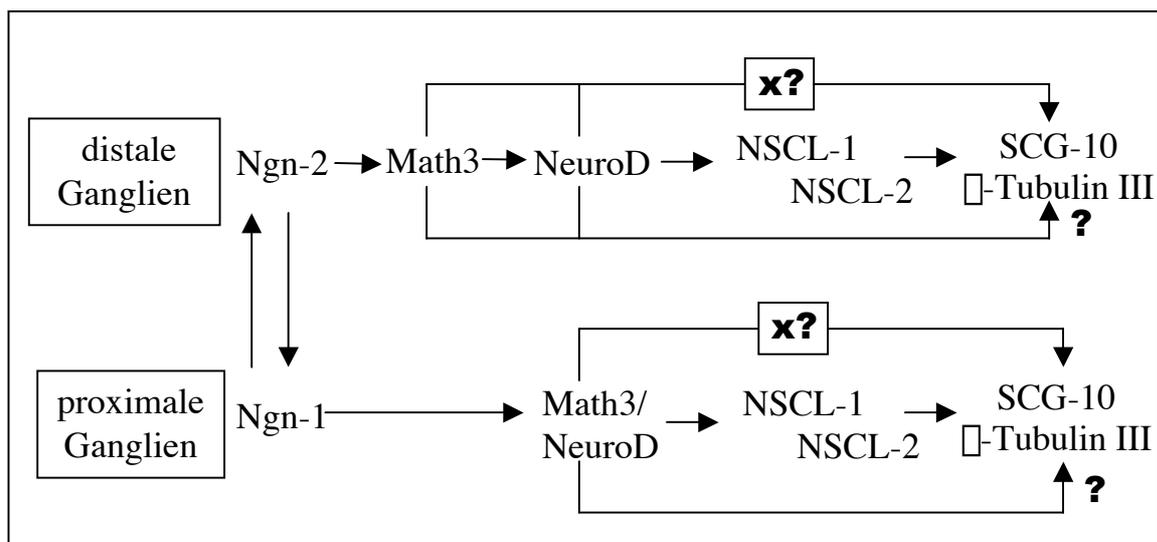
4.1 NSCL-2/LacZ positive Zellen spiegeln das endogene NSCL-2 Expressionsmuster wieder.

Durch das Einfügen des β -Galaktosidase-Gens in den NSCL-2 Locus war es möglich, mittels einer einfachen Farbreaktion die Aktivität des NSCL-2 Gens während embryonaler Entwicklungsvorgänge zu verfolgen. Zunächst wurde untersucht, ob eine Insertion der β -Galaktosidase-Kassette das endogene NSCL-2 Expressionsmuster widerspiegelt. Die vergleichende Analyse mittels in situ Hybridisierungen mit einer spezifischen antisense cRNA Sonde für NSCL-2 ergab keine Abweichungen zwischen dem endogenen NSCL-2 Expressionsmuster und dem NSCL-2/LacZ Muster in NSCL-2 heterozygoten Mutanten. Durch die Integration des „Zielvektors“ wurde die Kontrolle des NSCL-2 Locus nicht verändert wie nach der Integration der PGK-Neo Kassette in anderen Mutationen z.B. bei Myf-5 (Kaul et al., 2000).

4.2 NSCL-1 und NSCL-2 sind nicht notwendig für die Differenzierung kranialer Ganglien

Die Formierung peripherer Ganglien während embryonaler Entwicklungsstadien wurde durch sog. „fate-mapping“ Experimente in Hühnchenembryonen sehr gut untersucht (Übersicht: Graham and Begbie, 2000). Es konnte gezeigt werden, daß sensorische Vorläuferzellen kranialer Ganglien aus Neuralleistenzellen und ektodermalen Plakoden rekrutiert werden. Kraniale Ganglien können daher in zwei Gruppen eingeteilt werden: I. Distale Ganglien, welche die Ganglien geniculatum (VII.), petrosum (IX). und nodosum (X.) bilden, entstehen aus epibranchialen Plakoden; II. Proximale Ganglien, wie die Ganglien trigeminale (V.) und vestibulo-cochlear (VIII.), entstehen dagegen aus Neuralleistenzellen und aus der trigeminalen bzw. vestibulo-cochlearen Plakode. Welche Faktoren für die Induktion ektodermaler Plakoden verantwortlich sind, ist weitgehend unklar. Zumindest für die Induktion epibranchialer Plakoden wird eine Beteiligung von BMP-7 diskutiert (Begbie, 1999). Nach der Induktion delaminieren die Vorläuferzellen aus den ektodermalen Plakoden und bilden die entsprechenden Ganglien (Webb and Noden, 1993). Durch Inaktivierung von Neurogenin 1 und Neurogenin 2 in der Maus konnte gezeigt werden, daß beide bHLH Gene eine essentielle Rolle bei der Determinierung epibranchialer Vorläuferzellen spielen. So führt die Inaktivierung von Ngn1 zu einer kompletten Blockierung proximaler Ganglien, wohingegen die Inaktivierung von Ngn-2 zu einem Verlust distaler Ganglien führt, mit Ausnahme des Ganglion nodosum (Fode *et al.*, 1998), (Ma *et al.*, 1998). Der Entwicklungsblock führt des weiteren zum Fehlen der Expression von stromabwärts gelegenen Faktoren wie NeuroD, Math-3 und NSCL-1. Vermutlich spielen Ngn1 und Ngn2 eine kritische Rolle bei der Vermittlung unterschiedlicher sensorischer Zell-Identitäten (Anderson, 1999). Direkt nach der Aktivierung der Neurogenine folgt die Expression von NeuroD und Math3 in den epibranchialen Plakoden ab E8,75 (14S im G. trigeminale). Für NSCL-1 haben Ma und Mitarbeiter ein Einsetzen der Expression ab E9,0 (20S im G. trigeminale) beschrieben. Eigene Untersuchungen konnten zeigen, daß NSCL-1/LacZ Signale initial ab dem Embryonalstadium 8,75 (14 Somiten) in dem sich entwickelnden Ganglion trigeminale detektierbar sind. Durch die höhere Sensivität der LacZ Färbung gegenüber einer RNA Hybridisierung ist diese Diskrepanz schwer zu erklären. Bei E9,0 (16-18 Somiten) konnten starke NSCL-1/LacZ Signale sowohl in proximalen (Ngn1 abhängig) als auch in distalen (Ngn2 abhängig) Ganglien detektiert werden. NSCL-2/LacZ Signale zeigten ein nahezu identisches Expressionsmuster innerhalb kranialer Ganglien. Initiale Signale konnten zeitversetzt ab E9,0 im Ganglion trigeminale detektiert werden. Ab E11,5 sinkt das

Expressionsniveau von NSCL-1 und NSCL-2 in den kranialen Ganglien. Die Auswertung histologischer Schnitte bestätigte die Abwesenheit NSCL-1 und NSCL-2 positiver Zellen in den jeweiligen kranialen Plakoden. Obwohl NSCL-1 und NSCL-2 relativ früh während neuronaler Entwicklungsvorgänge exprimiert werden, scheint beiden Proteinen eine eher transiente Funktion innerhalb migratorischer und/oder differenzierender Prozesse zuzukommen, die sich innerhalb postmitotischer Zellen abspielen. Die Abwesenheit von NSCL-1 und NSCL-2 innerhalb epibranchialer Plakoden und die Expression während früher Schritte der Ganglion Formierung unterstützen die Hypothese, daß NSCL-1 und NSCL-2 als Migrations- und/oder frühe Differenzierungsfaktoren fungieren. Doppelmarkierungen von mitotisch aktiven Zellen mittels BrdU Inkorporation und NSCL-1/LacZ Anfärbungen zeigten zumindest im kranialen Ganglion keine Expression von NSCL-1 in mitotisch aktiven Zellen. Da weder NSCL-1^{-/-} noch NSCL-2^{-/-} Mutanten offensichtliche Störungen während der Formierung kranialer Ganglien zeigten lag die Vermutung nahe, daß aufgrund des zeitlich und räumlich überlappenden Expressionsmusters von NSCL-1 und NSCL-2 kompensatorische Effekte wirksam werden könnten. Interessanterweise zeigten jedoch auch NSCL-1xNSCL-2 doppelt homozygote Mutanten keine Defekte während der Formierung und Differenzierung kranialer Ganglien. Durch in situ Hybridisierung konnte gezeigt werden, daß die Expression von SCG-10, einem neuronalen Markerprotein, in doppelt homozygoten Mutanten gegenüber Kontrolltieren nicht verändert war. Das folgende Schema gibt eine Übersicht über die epistatischen Zusammenhänge während früher Entwicklungsvorgänge kranialer Ganglien.



Schema 1: Molekulare Zusammenhänge zwischen verschiedenen bHLH Genen während der Formierung kranialer Ganglien. Die Abbildung wurde teilweise aus (Ma *et al.*, 1998) entnommen.

Da auch die kombinierte Ausschaltung von NSCL-1 und NSCL-2 keine Auswirkungen auf die Entwicklung kranialer Ganglien hatte, lassen sich verschiedene Hypothesen ziehen: NSCL-1 und NSCL-2 haben keine Funktion während der Generierung kranialer sensorischer Ganglien. Diese Vermutung scheint jedoch eher unwahrscheinlich, da sowohl die kodierenden Gensequenzen von NSCL-1 und NSCL-2 wie auch die Expressionsprofile in verschiedenen Organismen, wie beispielsweise im Huhn und Mensch, hochkonserviert sind. Dies deutet auf einen hohen Selektionsdruck beider Gene während evolutionärer Entwicklungsvorgänge hin. Die wohl wahrscheinlichere Erklärung für die korrekte Entwicklung kranialer sensorischer Ganglien in den jeweiligen Einzel- und Doppelmutanten bietet das Modell der funktionellen Redundanz. Hier wird vermutet, daß verwandte Proteine die ein zeitlich und räumlich überlappendes Expressionsprofil besitzen, sich gegenseitig funktionell kompensieren können. Eingehend untersucht wurden diese Mechanismen bei myogenen Entwicklungsprozessen. Hier konnte für Myf-5 und MyoD eine partielle funktionelle Kompensation gefunden werden. Zwar kommt es in Myf-5^{-/-} Mutanten zunächst zu einem Ausfall der ersten Welle der myogenen Differenzierung, doch die Aktivierung von MyoD führt zu einer Kompensierung des myogenen Phänotyps (Arnold and Braun, 2000). Neuere Untersuchungen mittels Cre-Rekombinase vermittelter Myf-5 Deletion bestätigten die vollständige Kompensierung der Myf-5 Funktion über weite Strecken des myogenen Entwicklungsprozesses (Kaul *et al.*, 2000).

Ein weiteres Beispiel für redundante Funktionen zwischen eng verwandten Genen konnte bei Engrailed 1 und Engrailed 2 gezeigt werden. In der Mittel- und Hinterhirnregion und in den Vorläuferzellen dopaminerger Neurone werden in der Embryonalentwicklung die Transkriptionsfaktoren En1 und En2 exprimiert. Geninaktivierungen von En1 und En2 haben gezeigt, daß diese Faktoren gemeinsam für die Entwicklung der gesamten Mittel- und Hinterhirnregion verantwortlich sind (Simon *et al.*, 2001). Während En1 homozygote mutante Mäuse eine Deletion von großen Teilen des Mittelhirns- und Kleinhirns zeigen (Wurst *et al.*, 1994), führt eine Inaktivierung von En2 nur zu Veränderungen in der Musterbildung des Kleinhirns (Millen *et al.*, 1994). En1^{-/-}x En2^{-/-} doppelt homozygote Mutanten zeigen dagegen einen Verlust der gesamten Mittel- und Kleinhirnregion. Durch eine sog. „knock in“ Strategie wurde die kodierende Gensequenz von En1 durch En2 ersetzt. Der Austausch führte zu einer Kompensierung des normalerweise auftretenden Phänotyps. Dadurch konnte gezeigt werden, daß die kodierende Region von En2 in vivo die Funktion von En1 übernehmen und den mutationsbedingten Phänotyp „heilen“ kann (Hanks *et al.*, 1995).

Ein drittes Beispiel für funktionelle Kompensation bieten die Mitglieder der NeuroD Subfamilie. So wird vermutet, daß in Nex1/Math2 Nullmutanten Mäusen NeuroD und/oder NeuroD2 die Funktion von Nex übernehmen. Zwar zeigen beide Gene in Nex^{-/-} Mäusen kein erhöhtes Expressionsniveau, aber aufgrund ihrer ähnlichen Proteinsequenz und des räumlich und zeitlich stark überlappenden Expressionsprofils werden NeuroD und NeuroD2 als potentielle Kandidaten für eine funktionelle Kompensation angesehen (Schwab *et al.*, 1998). Bestätigt wurde diese Annahme durch Generierung von Nex1xNeuroD doppelt homozygoten Mutanten. Solche Nex1^{-/-} x NeuroD^{-/-} Doppelmutanten zeigen weitaus deutlichere Störungen in der Hippokampus Formation als NeuroD^{-/-} oder Nex1 Einzelmutanten (Schwab *et al.*, 2000).

Könnten Math3 und/oder NeuroD die Funktion von NSCL-1 und NSCL-2 innerhalb distaler und proximaler kranialer Ganglien kompensieren?

NeuroD/Math3 und NSCL-1/2 zeigen während der Formierung kranialer Ganglien ein sehr ähnliches Expressionsmuster. Erste NeuroD und Math3 Transkripte lassen sich ab E8,75 detektieren und zeigen wie NSCL-1 und NSCL-2 ein ansteigendes Expressionsniveau in den kranialen Ganglien. NeuroD positive Zellen finden sich jedoch auch in der trigeminalen und otischen Plakode. Es wird vermutet, daß NeuroD nicht nur als Differenzierungsfaktor fungiert, sondern auch während der Delaminierung von mitotisch aktiven Vorläuferzellen aus den entsprechenden Plakoden eine wichtige Rolle spielt (Ma *et al.*, 1998). Während der Entwicklung distaler Ganglien ist die Expression von Math3, NeuroD und NSCL-1/2 auf migratorische, postmitotische Vorläuferzellen beschränkt und Signale innerhalb distaler Plakoden sind nicht detektierbar (Fode *et al.*, 1998).

Obwohl die Analyse der NeuroD Expression mittels in situ Hybridisierung in den jeweiligen NSCL-1 und NSCL-2 Einzel- und Doppelmutanten kein erhöhtes oder anderweitig verändertes Expressionsniveau innerhalb proximaler und distaler Ganglien aufwies, wird durch das nahezu identische Expressionsmuster eine wichtige Forderung für eine funktionelle Kompensation erfüllt.

Gegen die Vorstellung einer Kompensation der NSCL- Funktion durch NeuroD sprechen jedoch die Unterschiede in der Sequenz beider Proteine. NeuroD und NSCL-1/2 besitzen eine 50%ige Übereinstimmung auf Proteinebene innerhalb der bHLH Domäne. Ob dieser geringe Verwandtschaftsgrad ausreichend für eine funktionelle Kompensation ist, ist unklar. In NeuroD^{-/-} und Math3^{-/-} Einzelmutanten wurden bisher keine Störungen kranialer Ganglien beobachtet und zumindest im Fall von NeuroD^{-/-} wird vermutet, daß Math3 die Funktion von

NeuroD in den kranialen Ganglien kompensieren kann. Ein direkter Nachweis kann durch die Generierung weiterer Doppel- bzw. Trippelmutanten gegeben werden. So könnte eine Kombination von NSCL-1xNSCL-2 Doppelmutanten mit NeuroD oder Math3 defizienten Mäusen letztlich Störungen innerhalb kranialer Ganglien zeigen.

4.3 Expressionsanalyse von NSCL-1 und NSCL-2.

Eine umfassende vergleichende Analyse der Expression von NSCL-1 und NSCL-2 während embryonaler und postnataler Stadien fehlte bislang. Es existierte lediglich eine lückenhafte Beschreibung der Expression von NSCL-1 und NSCL-2 (Begley *et al.*, 1992), (Haire and Chiamello, 1996), (Lipkowitz *et al.*, 1992), (Uittenbogaard *et al.*, 1999). Bemerkenswerterweise konnte eine Expression von NSCL-1 und NSCL-2 zwischen E14,5 und E18,5 in den meisten Arealen des ZNS nachgewiesen werden. So zeigten vor allem Bereiche wie Neokortex, Kleinhirn, Hippokampus, Thalamus, Hypothalamus und Rückenmark prominente NSCL-1 und NSCL-2 Expressionen. Weitere NSCL-1 und NSCL-2 positive Domänen fanden sich in der Retina, Riechepithel, und den dorsalen Wurzelganglien. Zumeist fand sich eine Expression in differenzierenden postmitotischen Zellen, die allerdings ihre endgültige Position und Funktion noch nicht eingenommen hatten. Es liegt daher nahe, die Funktion von NSCL-1 und NSCL-2 in der Steuerung der Transition von Neuroblasten zu postmitotischen Neuronen zu sehen.

4.3.1 NSCL-1 und NSCL-2 defiziente Mausmutanten zeigen keine Auffälligkeiten bei der Bildung und der Gewebsarchitektur des Neokortex.

NSCL-1/LacZ Signale konnten bei E14,5 innerhalb der subventrikulären Schicht des Neokortex nachgewiesen werden. Dagegen wurden NSCL-2/LacZ Signale in den marginalen Bereichen der kortikalen Platte detektiert. Zwischen E16,5 und E18,5 konnten prominente NSCL-1 und NSCL-2 Signale innerhalb der intermediären Zone detektiert werden. Die Signale wurden der zu diesem Zeitpunkt entstehenden Subplatte zugeordnet. Weder NSCL-1/LacZ noch NSCL-2/LacZ positive Signale wurden in mitotisch aktiven ventrikulären Schichten beobachtet. Obwohl starke NSCL-1/LacZ Signale in der subventrikulären Zone detektiert wurden, fand sich keine NSCL-1 Genaktivität in sich teilenden Zellen. Ab E18,5 konnten NSCL-1 positive Zellen ebenfalls in den marginalen Schichten der kortikalen Platte detektiert werden.

Der Vergleich des endogenen NSCL-1 und NSCL-2 Expressionsmusters mit den NSCL-1/LacZ und NSCL-2/LacZ Signalen zeigte in allen Fällen eine vollständige Übereinstimmung. Da jedoch die Stabilität des Reporterproteins höher ist als die Stabilität des endogenen Proteins bzw. die Halbwertszeit der mRNA, spiegelt der Nachweis LacZ positiver Zellen nicht in allen Fällen das endogene Expressionsmuster wieder. Ob es sich daher bei den NSCL-1/LacZ positiven Zellen innerhalb der marginalen Bereiche der kortikalen Platte tatsächlich noch um NSCL-1 positive Zellen handelt, ist unklar. Wahrscheinlich handelt es sich hier um Zellen die während embryonaler Entwicklungsstadien ausgehend von subventrikulären Bereichen nach außen gewandert sind und weiterhin das Substrat X-Gal durch die hohe Stabilität des Reporterproteins umsetzen. Das Fehlen von NSCL-1 und NSCL-2 mRNA in den marginalen Bereichen der kortikalen Platte deutet auf diese Interpretation hin.

Bei den NSCL-1/LacZ positiven Domänen innerhalb marginaler Bereiche der kortikalen Platte handelt es sich wahrscheinlich um Cajal-Retzius Zellen. Es wird vermutet, daß Cajal-Retzius Zellen innerhalb der marginalen Schicht (spätere Schicht I) und Zellen aus der Subplatte (spätere Schicht VII) ein phylogenetisch sehr altes kortikales System darstellen. Beide Schichten bilden eine Art Gerüst für die Entwicklung phylogenetisch jüngerer kortikaler Schichten. Mit zunehmender Entwicklung der kortikalen Platte zu einer komplexen laminaren Struktur wird die primordiale plexiforme Schicht in eine marginale (Schicht I) und tiefe Schicht (Schicht VII, Subplatte) aufgetrennt. Es wird vermutet, daß die marginale Schicht und die Subplatte als Organisator für die Entwicklung der kortikalen Platte fungieren (Bayer and Altman, 1991). Die Hypothese konnte vor allem durch die Analyse der sog. Reeler Maus bestätigt werden (siehe Einleitung). Das Fehlen von Reelin, welches normalerweise von Cajal-Retzius Zellen sekretiert wird, führt zu einer Umkehrung laminarer Schichten (Frotscher, 1998). Nach Ausbildung aller laminaren Strukturen im Kortex verschwinden Cajal-Retzius Zellen (Mienville, 1999).

Das transiente Expressionsmuster von NSCL-1 und NSCL-2 innerhalb der Subplatte und der marginalen Schicht während embryonaler Entwicklungsstadien läßt vermuten, daß NSCL-1 und NSCL-2 bei der Generierung dieser Schichten eine Rolle spielen. Eine wesentliche Funktion kann jedoch ausgeschlossen werden, da weder die Inaktivierung von NSCL-1 noch die von NSCL-2 zu einer detektierbaren Störung der Architektur des Neokortex führten. Die Analyse adulter Großhirnhemisphären mittels Nissl und Hämatoxylin Anfärbung zeigte keine Abweichung in der laminaren Struktur der Großhirnrinde. Des weiteren war die immunhistochemische Darstellung Calbindin und Calretinin positiver Neurone in NSCL-1/-/

und NSCL-2-/- Mutanten unauffällig. Möglicherweise sind die Veränderungen in den jeweiligen Mutanten so gering, daß sie mit den angewandten Methoden nicht aufgedeckt werden konnten. Zwar waren bei NSCL-1 und NSCL-2 defizienten Mutanten keine offensichtlichen Verhaltensstörungen nachzuweisen; weitergehende Untersuchungen zu möglichen Störungen im Lern- und Gedächtnisvermögen stehen jedoch noch aus.

Starke NSCL-1/LacZ Signale wurden besonders innerhalb der subventrikulären Schicht des Neokortex detektiert. Die unmittelbare Nähe zu mitotisch aktiven Zellen in der ventrikulären Schicht deutet auf eine mögliche Beteiligung bei der Regulation des Zellzyklus hin.

4.3.2 Die Rolle von NSCL-1 und NSCL-2 im Kleinhirn.

Das Kleinhirn bietet ähnlich wie die Großhirnhemisphären gute Möglichkeiten, Prozesse wie Determinierung, Migration und Differenzierung von Neuronen zu untersuchen. Während embryonaler Entwicklungsstadien findet eine starke Proliferation von Körnervorläuferzellen innerhalb der Rhombischen Lippe statt. Während der weiteren Entwicklung bilden diese Vorläuferzellen die externe Körnerzellschicht EGL (external granular layer). Aus dieser externen Schicht entstehen peri- und postnatal drei verschiedene Typen von Zellen: die Stern-, Korb- und Körnerzellen. Durch Einwanderung dieser zunächst in der externen Schicht gelegenen Zellen entsteht die interne Körnerzellschicht IGL (internal granular layer). Zwischen E13-E15 bilden sich durch eine zweite Wanderwelle aus der Matrixzone des Neuraletpithels die sog. Purkinje Zellen und formen die Purkinje Zellschicht PCL (Purkinje cell layer). Die Expressionsanalyse von NSCL-1 und NSCL-2 im Bereich des sich entwickelnden Kleinhirns wurde bisher von verschiedenen Gruppen untersucht (Uittenbogaard *et al.*, 1999), (Haire and Chiamello, 1996), (Duncan *et al.*, 1997) und führte teilweise zu widersprüchlichen Ergebnissen.

Durch eigene Untersuchungen konnten NSCL-1/LacZ Signale während embryonaler Entwicklungsstadien in migrierenden mitotisch aktiven Körnervorläuferzellen detektiert werden. Der letztere Befund deckt sich mit Arbeiten von Uittenbogaard (Uittenbogaard *et al.*, 1999). Ebenso wurden bei E18,5 NSCL-1 positive Zellen in proliferierenden und in prä-migratorischen Schichten der EGL detektiert. Diese Ergebnisse stehen im Widerspruch zu Beobachtungen von Duncan und Mitarbeitern, die NSCL-1 Transkripte nur innerhalb prä-migratorischer Schichten der EGL auffanden (Duncan *et al.*, 1997). Weiterhin konnten NSCL-1/LacZ positive Zellen in Zellen der internen Körnerzellschicht detektiert werden.

Postnatal wurden NSCL-1/LacZ Signale sowohl in Zellen der externen und internen Körnerzellschicht beobachtet.

Die Expressionsanalyse von NSCL-2 mittels LacZ Färbung im Kleinhirn zeigt deutliche Unterschiede zu den in situ Hybridisierungsdaten früherer Untersuchungen (Haire and Chiaramello, 1996). Erste NSCL-2/LacZ positive Zellen konnten ab E16,5 in dorsalen Bereichen der prä migratorischen Schicht der EGL detektiert werden. Bei E18,5 waren NSCL-2/LacZ positive Zellen über die gesamte prä migratorische Zone der EGL und in der IGL detektierbar. Haire und Chiaramello konnten mit einer cRNA Sonde erste Transkripte ab P2 (postnatal Tag 2) beobachten, wobei sich die Expression von NSCL-2 ebenfalls auf die prä migratorische Schicht der EGL beschränkte (Haire and Chiaramello, 1996). In der IGL und Purkinje Zellschicht konnten keine Signale beobachtet werden. Vermutlich ist die von Haire und Chiaramello später beobachtete initiale NSCL-2 Expression und die Abwesenheit NSCL-2 positiver Zellen in der IGL auf die geringere Sensitivität der in situ Hybridisierungstechnik gegenüber der LacZ Färbung zurückzuführen. Eine weitere Erklärung für die abweichenden Ergebnisse könnte jedoch auch in der höheren Stabilität des Reporterproteins liegen. So könnten postmitotische Zellen aus der prä migratorischen Zone der EGL (NSCL-2 positiv) nach ihrer Wanderung in die IGL weiterhin funktionell aktives Reporterprotein besitzen und eine NSCL-2 Expression vortäuschen. Da aber LacZ positive Zellen zeitgleich in externen und internen Körnerzellschichten aufgefunden wurden, sind die LacZ positiven Signale wahrscheinlich nicht durch eine verlängerte LacZ Aktivität zu erklären. Weitere NSCL-2/LacZ positive Zellen konnten in der sog. weißen Substanz (Lamina alba) detektiert werden. Die vergleichende Analyse des Expressionsmusters von NSCL-1 und NSCL-2 zeigt während der Entwicklung des Kleinhirns, neben gemeinsamen Expressionsdomänen, auch deutliche Unterschiede:

Während NSCL-1 in mitotisch aktiven Zellen der EGL und in postmitotischen Zellen der IGL nachgewiesen wurde, beschränkte sich die NSCL-2 Expression auf postmitotische Zellen in der prä migratorischen Schicht der EGL und auf Zellen in der IGL. Insgesamt deutet die Expression beider Gene auf eine Funktion während der Migration und der frühen Differenzierung hin. Ob NSCL-1 auch eine Rolle bei der Determinierung von mitotisch aktiven Körnervorläuferzellen spielen könnte ist, jedoch noch unklar. Die deutliche Reduktion des Expressionsniveaus von NSCL-1 und NSCL-2 (ab P10) nach Entwicklung des Kleinhirns bestätigt die transiente Funktion innerhalb früher postnataler Entwicklungsvorgänge. Da weder die Inaktivierung von NSCL-1 noch von NSCL-2 zu evidenten Störungen innerhalb des Kleinhirns führte, hat jedes der beiden Gene für sich wahrscheinlich keine essentielle

Funktion bei der Kleinhirnentwicklung. Ob NSCL-1 und NSCL-2 in der prä migratorischen Zone der EGL redundante Funktionen ausüben, sollte durch die kombinierte Inaktivierung der beiden Gene untersucht werden (s. unten).

4.3.3 Welche Funktion kommt NSCL-1 und NSCL-2 in der Retina und im Riechepithel zu

Sowohl Retina als auch das olfaktorische Neuroepithel zeigen im Gegensatz zum Neokortex keine abgrenzbare Ventrikularschicht. In der Retina fanden sich keine NSCL-1 Signale in mitotisch aktiven Zellen. Dagegen war NSCL-1 im olfaktorischen Epithel auch in sich teilenden Zellen zu finden. NSCL-2/LacZ positive Zellen waren nur innerhalb basaler Schichten lokalisiert und zeigten im Vergleich zu NSCL-1 ein deutlich schwächeres Expressionsniveau. Starke NSCL-1/LacZ und NSCL-2/LacZ Signale konnten im Vomeronasalorgan beobachtet werden. Die Geninaktivierung führte allerdings auch hier zu keiner offensichtlichen Störung.

In der Retina konnte eine erste NSCL-1 und NSCL-2 Expression ab E11,5 im Augenbecher detektiert werden. Schwache NSCL-1/LacZ und NSCL-2/LacZ Signale konnten ab E14,5 in der Ganglionzellschicht detektiert werden, wobei ab E16,5 NSCL-1 und NSCL-2 auch im Bereich der zukünftigen inneren nukleären Schicht detektiert wurden. Im Bereich der äußeren Zone der nukleären Schicht konnte eine zusätzliche NSCL-1 Expressionsdomäne lokalisiert werden. Diese Expressionsdomäne korreliert vermutlich mit der Generierung amakriner Zellen (Morrow *et al.*, 1999a). Die Expression innerhalb der inneren Schicht der prospektiven inneren nukleären Schicht INL (inner nuclear layer) deutet auf differenzierende amakrine Zellen hin (Morrow *et al.*, 1999a). Das transiente Expressionsmuster innerhalb der Retina, spiegelt auch hier eine mögliche Funktion bei frühen Migrations- und Differenzierungsprozessen wieder.

Das Expressionsniveau von NSCL-1 und NSCL-2 sinkt postnatal, bis auf einige Ausnahmen, deutlich ab; in adulten Stadien (ab P30) konnten keine Signale in der Retina, Neokortex, Kleinhirn und Rückenmark detektiert werden. In Geweben wie dem olfaktorischen Neuroepithel wurden jedoch weiterhin NSCL-1 und NSCL-2 Signale gefunden. Diese Expression korreliert vermutlich mit der regenerativen Fähigkeit des Neuroepithels. Es ist anzunehmen, daß die Expression von NSCL-1/2 innerhalb der basalen Zellschicht mit den dort lokalisierten Stammzellen überlappt. Neben der Expression im Riechepithel und

Vomeronasalorgan, konnten auch im Bereich des olfaktorischen Nervs NSCL-1/LacZ und NSCL-2/LacZ positive Zellen lokalisiert werden.

4.4 NSCL-2 defiziente Mutanten sind infertil und zeigen eine Störung bei der Gewichtsregulation

4.4.1 Die Entstehung eines hypogonadalen Hypogonadismus in NSCL-2 mutanten Mäusen.

Frühere Untersuchungen hatten gezeigt, daß die Inaktivierung des NSCL-2 Gens zu einer deutlichen Gewichtszunahme nach der Pubertät und zu einem hypogonadalen Hypogonadismus führt (Good *et al.*, 1997). Good und Mitarbeiter hatten vermutet, daß die Inaktivierung von NSCL-2 zu einer Störung der Hypothalamus-Hypophysen Achse führt, die neben der Gewichtsregulation auch die Fertilität steuert.

Die in der vorliegenden Arbeit dargestellte Analyse des NSCL-2 Expressionsmusters innerhalb des sich entwickelnden Hypothalamus ergab eine breite Expression innerhalb verschiedener Kerngebiete. So wurden starke Signale in septalen Bereichen, im Nucleus paraventricularis (PVN) und im Nucleus arcuatus lokalisiert. Besonders der Nucleus arcuatus gilt als wichtige Schaltzentrale innerhalb des Hypothalamus für die hormonelle Steuerung (Übersicht: Beck, 2001).

In der sich entwickelnden Hypophyse (Rathke's Tasche) konnten während embryonaler Stadien keine NSCL-2/LacZ positiven Zellen detektiert werden. Lediglich bei P20 wurde eine schwache Expression innerhalb der Adenohypophyse lokalisiert. Dies steht im Widerspruch zu früheren Beobachtungen von Good und Mitarbeitern (Good *et al.*, 1997), die NSCL-2 positive Zellen mittels in situ Hybridisierung innerhalb der Rathke'schen Tasche sowie in der adulten Adenohypophyse detektiert haben. Eine mögliche Erklärung für diese Befunde könnte eine Kreuzhybridisierung mit NSCL-1 Transkripten sein, da eine NSCL-1 Expressionsanalyse deutliche Signale innerhalb der Adenohypophyse während embryonaler und früher postnataler Stadien zeigte. Des weiteren könnte eine Kreuzhybridisierung mit weiteren bisher noch unbekannt Genen vorliegen.

Aus früheren Untersuchungen war bekannt, daß die Intensität von GnRH innerhalb des Nucleus arcuatus in NSCL-2/- Mutanten reduziert war, eine Analyse GnRH positiver Neurone in septalen und präoptischen Kerngebieten lag jedoch nicht vor. Während embryonaler Entwicklungsvorgänge migrieren GnRH-Vorläuferzellen von der olfaktorischen

Plakode entlang des Riechnervs in den Hypothalamus ein und sezernieren dort schubweise das Gonadotropin-Releasing Hormon (s. Einleitung). Die immunhistochemische Darstellung GnRH positiver Neurone während der Entwicklungsstadien E14,5–E18,5 offenbarte eine zunehmende Reduktion GnRH positiver Neurone in NSCL-2 defizienten Mutanten. Bei E14,5 zeigten NSCL-2^{-/-} Mutanten zunächst nur eine 4%ige Reduktion GnRH positiver Neurone, wohingegen NSCL-2^{-/-} Mutanten bei E18,5 eine 24%ige Reduktion gegenüber Kontrolltieren zeigten.

Ogleich die Anzahl GnRH-positiver Neurone somit reduziert war, fand sich keine Veränderung des Migrationsverhaltens dieser Neurone. Eine Arretierung migrierender GnRH positiver Neurone wird beim sog. Kalmann Syndrom beobachtet (Schwanzel-Fukuda *et al.*, 1989). Humane Patienten mit dieser Krankheit zeigen Fertilitätsstörungen und eine deutliche Gewichtszunahme ähnlich den NSCL-2 mutanten Mäusen. Die Auswertung GnRH positiver Neurone während adulter Stadien ergab eine Reduktion von 27% in NSCL-2^{-/-} Mutanten. Vor allem in lateralen Kerngebieten des Hypothalamus konnte eine deutliche Abnahme GnRH positiver Neurone detektiert werden.

Welchen Einfluß hat NSCL-2 auf die Entwicklung und Regulation GnRH positiver Neurone ? Diese Frage sollte durch die Darstellung einer möglichen Kolo-kalisierung von NSCL-2 in GnRH positiven Neuronen beantwortet werden. Die durchgeführten Doppelanfärbungen bestätigten die Kolo-kalisation von NSCL-2 in GnRH positiven Neuronen während embryonaler Entwicklungsstadien. In der adulten Situation konnten dagegen keine NSCL-2/LacZ Signale innerhalb GnRH positiver Neurone mehr gefunden werden. Die vergleichsweise geringe Reduktion GnRH positiver Neurone und das normale Migrationsverhalten während früher embryonaler Stadien deuten darauf hin, daß NSCL-2 nicht als entscheidender Determinierungsfaktor für diese Zellpopulation dient, sondern als ein Differenzierungsfaktor unter anderen.

Es kann allerdings nicht ausgeschlossen werden, daß NSCL-1 während früher Phasen eine Funktion bei der Rekrutierung GnRH positiver Vorläuferzellen übernimmt und so eine mögliche Funktion von NSCL-2 kompensiert. Die Expressionsanalyse konnte auch für NSCL-1 deutliche Signale im Bereich der olfaktorischen Plakode zeigen. Die NSCL-1 Expression innerhalb GnRH positiver hypothalamischer Kerngebiete ist dagegen deutlich geringer. Da jedoch die Inaktivierung von NSCL-1 keine Auswirkungen auf die Fertilität hat, scheint eine essentielle Beteiligung bei der Rekrutierung von GnRH-Vorläuferzellen eher unwahrscheinlich.

Weiterhin besteht die Möglichkeit, daß eine zunächst geringe nicht detektierbare Reduktion von GnRH Vorläuferzellen in NSCL-2 Mutanten vorliegt. Während der Expansion dieser Vorläuferzellen könnte sich ein solcher zunächst geringer Unterschied amplifizieren und zu einer deutlichen Reduktion während späterer Entwicklungsstadien führen. Um das Verhalten von GnRH positiven Zellen genauer zu analysieren generierten Spergel und Mitarbeiter eine GnRH-GFP Reporter-Maus (Spergel *et al.*, 1999). Mit Hilfe des GFP Reporterproteins lassen sich GnRH positive Zellen leicht identifizieren. Durch die Züchtung von GnRH-GFP x NSCL-2+/- bzw. GnRH-GFP x NSCL-2-/- Mausmutanten wäre in Zukunft eine genauere Beschreibung des Verhaltens GnRH und NSCL-2 positiver Zellen möglich. Interessant wäre in diesem Zusammenhang zu untersuchen, ob die verbleibenden GnRH positiven Zellen elektrophysiologische Veränderungen zeigen und diese evtl. in einer Störung der schubweisen GnRH Ausschüttung resultieren.

GnRH positive Neurone projizieren ihre Axone zur Eminentia medialis, wo die Ausschüttung von GnRH in das Blutssystem stattfindet. Nach der Freisetzung bindet GnRH an spezifische Membran-Rezeptoren innerhalb der Adenohypophyse. Durch die schubweise GnRH Ausschüttung findet gleichzeitig auch eine entsprechend gepulste Freisetzung von LH und FSH aus gonadotropen Zellen innerhalb der Hypophyse in das periphere Blutssystem statt. Untersuchungen haben gezeigt, daß die hypothalamische Kontrolle der Freisetzung von LH und FSH über gemeinsame wie auch über separate Mechanismen erfolgte (Lumpkin and McCann, 1984). So führt eine externe Zugabe von GnRH (LHRH) in Mäusen lediglich zu einer erhöhten LH Freisetzung und hat keine Auswirkungen auf die FSH Ausschüttung (Huang *et al.*, 2001). Daher wird vermutet, daß die Stimulierung von FSH über einen weiteren Faktor, den FSH-RF (FSH releasing factor) verläuft. Zwar konnte bisher noch kein m-FSH-RF (Maus-FSH-RF) isoliert werden, aber durch in vitro Experimente mit L-LHRH III (Lamprey GnRH III) konnte eine selektive Ausschüttung von FSH in Ratten Hypophysen nachgewiesen werden (Yu *et al.*, 1997). Ob zu dem L-GnRH III tatsächlich ein entsprechend homologes m-FSH-RF in Ratten und Mäusen existiert, ist jedoch noch unklar.

Ein weiterer Kandidat für eine spezifische Kontrolle der LH und/oder FSH Sekretion könnte das GnRH II (auch als c-LHRH-II bezeichnet) sein, welches ebenfalls eine leichte Selektivität für FSH zeigte (Yu *et al.*, 1997). Im Widerspruch hierzu stehen dagegen Injektionsversuche von GnRH II bei Hühnern und Primaten, welche eine erhöhte Ausschüttung von LH bewirkten (Lescheid *et al.*, 1997). Weiterhin konnte gezeigt werden, daß zumindest im Rhesus Affen GnRH I und GnRH II von unterschiedlichen Zellpopulationen exprimiert werden (Latimer *et al.*, 2000). Die sog. „hypogonadale“ Mausmutante zeigt jedoch, daß

GnRH II nicht ausreichend für die Induktion des reproduktiven Systems ist (Cattanach *et al.*, 1977). Hier führt das Fehlen von GnRH I zu einer deutlichen Störung des reproduktiven Systems (niedriger Spiegel von LH und FSH) und wird nicht durch GnRH II kompensiert.

Frühere Untersuchungen von Good und Mitarbeitern haben ergeben, daß NSCL-2 defiziente Mutanten einen 4 fach reduzierten Serum FSH Spiegel aufweisen, wohingegen der Serum LH Spiegel nicht verändert ist (Good *et al.*, 1997). Ob in NSCL-2^{-/-} Mutanten eine reduzierte Anzahl FSH-RF positiver Neurone vorliegt ist bisher nicht bekannt. McCann und Mitarbeiter (McCann *et al.*, 1998) vermuten eine Lokalisierung FSH-RF positiver Neurone innerhalb des Nucleus paraventricularis und Nucleus anteriorer hypothalami Gebiete. In beiden Gebieten konnten ebenfalls prominente NSCL-2 Signale detektiert werden. Da in der vorliegenden Arbeit eine deutliche Reduktion GnRH positiver Neurone nachgewiesen werden konnte, läßt sich eine alleinige FSH Reduktion schwer begründen zumal GnRH auch einen selektiven Einfluß auf den Serum FSH Spiegel hat. Zumindest für das Gonadotropin-releasing hormone associated peptide (GAP) konnte eine schwache FSH releasing Aktivität nachgewiesen werden (McCann *et al.*, 1998). Obwohl es sich bei GnRH positiven Neuronen um eine sehr kleine Zell-Population handelt, trägt vermutlich nur ein geringer Teil dieser Neurone zur Aufrechterhaltung der Gehirn-Hypophysen-Gonaden Achse bei. Durch Transplantation einer kleinen Anzahl GnRH positiver Neurone (nur 5-10 Neurone) in den 3.Ventrikel von hypogonadalen (GnRH^{-/-}) Mausmutanten, konnte die pulsatile Ausschüttung der Gonadotropine wiederhergestellt werden (Krieger *et al.*, 1982). Weitere Versuche mit Affen und Meerschweinchen bewiesen, daß die Abtrennung oder Entfernung großer GnRH positiver Gehirnareale keinen Einfluß auf die Gonadotropinsekretion hat (Krey *et al.*, 1975). Ob in NSCL-2 defizienten Mutanten, die 27 %ige Reduktion von GnRH vernachlässigbar ist und der hypogonadale Phänotyp durch eine Abnahme des FSH-FR hervorgerufen wird, müssen zukünftige Versuche klären.

Die redundante Funktion des GnRH Systems spiegelt sich vermutlich auch in der variablen Ausprägung des Phänotyps wieder. So besitzen einige weibliche NSCL-2^{-/-} Mutanten die in Gegenwart von Männchen gehalten wurden normal entwickelte Gonaden und sind fertil. Dagegen zeigen weibliche NSCL-2^{-/-} Mutanten, die in Abwesenheit von Männchen gehalten wurden, immer verkleinerte Gonaden und sind immer infertil. Good und Mitarbeiter vermuten, daß männliche Pheromone in der Lage sind, die in weiblichen NSCL-2^{-/-} Mutanten auftretenden Störungen zu kompensieren. Verschiedene Studien haben gezeigt, daß der Kontakt mit Pheromonen aus männlichem Urin, bei weiblichen Tieren (Ratten) eine vorzeitige Pubertät auslöst (Zhou and Moss, 1997). Solche Pheromone werden über das

Vomeronasalorgan (auch Jakob'sches Organ genannt) detektiert. Die prominenten NSCL-2 Signale innerhalb dieses Organs deuten zwar auf eine mögliche Beteiligung von NSCL-2 bei der Entwicklung vomeronasaler Rezeptor Neurone hin, eine essentielle Funktion ist aber eher unwahrscheinlich, da keine offensichtlichen morphologischen Störungen vorliegen. Weiterhin konnte gerade in weiblichen NSCL-2 homozygoten Mutanten eine Kompensierung des infertilen Phänotyps durch männlichen Kontakt beobachtet werden. Interessant wäre sicherlich zu untersuchen, ob in NSCL-2 defizienten weiblichen Mutanten eine Störung bei der Detektierung bestimmter männlicher Pheromone vorliegt.

4.4.2 Störungen der Gewichtsregulation in NSCL-2 mutanten Mäusen

Das reproduktive System steht im engen Zusammenhang mit der Kontrolle des Körpergewichts. Verschiedene Studien haben gezeigt, daß ein vermindertes Nahrungsangebot zu einer abnehmenden Reproduktivität führt. Bei Frauen führt Untergewicht zu einem Verlust des Zyklus und deutlicher Rückbildung sekundärer Geschlechtsmerkmale. Bei Männern verursacht ein entsprechender Nahrungsmangel einen reduzierten Testosteronspiegel und verminderte Spermatogenese (Übersicht: Zigmond *et al.*, 1999). Ein Vermittler zwischen Nahrungsangebot und Reproduktivität ist das NPY (Neuropeptid Y) System (Widdowson and Wilding, 2000). Injektionen von NPY in den Hypothalamus von Ratten führen, neben einer deutlichen Steigerung der Nahrungsaufnahme, zu einer Reduktion des Serum LH Spiegels (Wilding *et al.*, 1997). Es wird vermutet, daß NPY u.a. über den NPY Y1 Rezeptor die Aktivität GnRH positiver Neurone reguliert. Zwar konnten auf GnRH positiven Zellkörpern bisher keine NPY Y1 Rezeptoren lokalisiert werden, es bestehen aber enge Kontakte mit GnRH positiven Nervenfasern innerhalb der Eminentia medialis (Li *et al.*, 1999).

Die immunhistochemische Darstellung NPY positiver Nervenfasern im Hypothalamus zeigte in NSCL-2 defizienten Mäusen gegenüber Kontrolltieren keine Abweichung. Im Bereich der Großhirnrinde konnte eine Abnahme NPY positiver Zellen um 22% beobachtet werden. Allerdings ist eine Interpretation dieser Befunde schwierig, da die Funktion NPY positiver Neurone im Kortex noch nicht geklärt ist. Bisher wird eine mögliche Beteiligung an Gedächtnisfunktionen diskutiert.

Ein Vergleich mit anderen „Obesity“ Modellen zeigt, daß NPY nur dann erhöht ist, wenn eine Leptin oder Leptin-Rezeptor Störung vorliegt (z.B. in ob/ob oder db/db Mausmutanten). Die Inaktivierung des MC4-R Gens, ein „Obesity“ Modell ohne Leptin Beteiligung, verursacht hingegen keine Veränderung des NPY Spiegels im Nucleus arcuatus (Beck, 2001). Obwohl

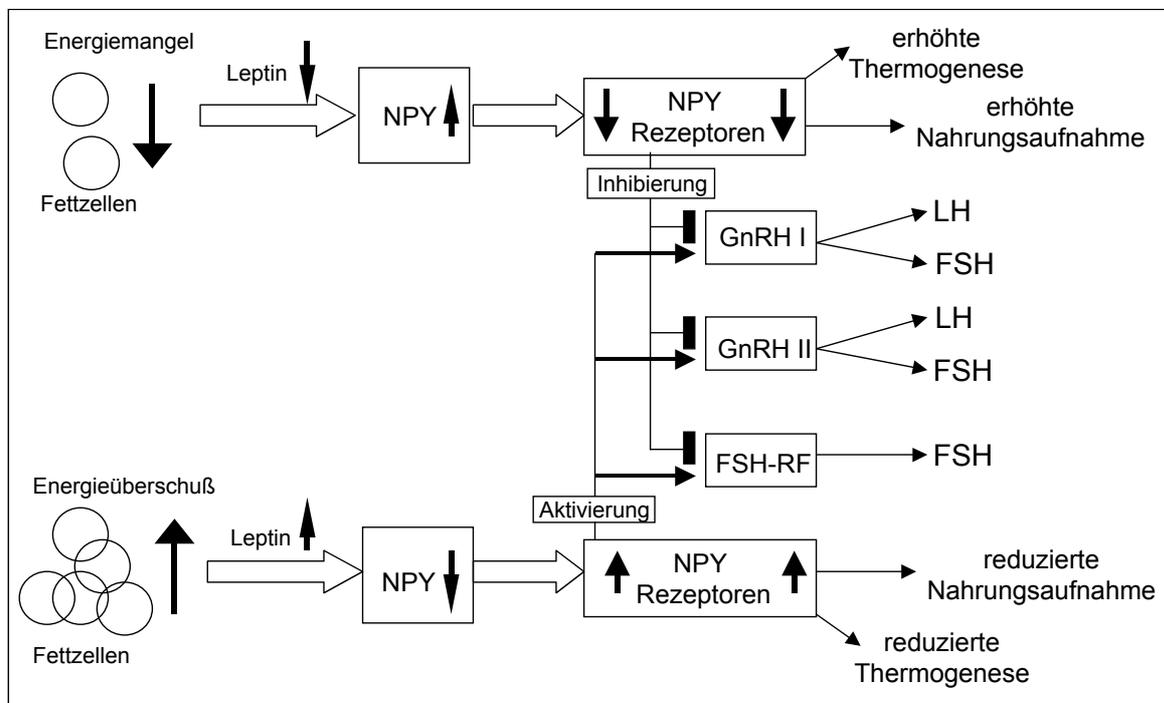
NPY als Stimulator für die Nahrungsaufnahme gilt, resultiert eine Inaktivierung überraschenderweise nicht in einer Veränderung des Körpergewichts. Die Blockierung des NPY Y1 oder des NPY Y5 Rezeptors durch pharmakologische Antagonisten oder antisense Oligonukleotide führt hingegen zu einer deutlich reduzierten Nahrungsaufnahme bei Mäusen und Ratten (Widdowson and Wilding, 2000). Eine vergleichende Analyse von NPY Y1^{-/-} und NPY Y5^{-/-} Mutanten bestätigte, daß NPY Y1 defiziente Mutanten nach NPY Injektion deutlich weniger Nahrung aufnehmen als NPY Y5 Nullmutanten. Dies impliziert, daß der NPY Y1 Rezeptor eine kritische Rolle bei der Vermittlung von NPY Signalen spielt (Kanatani *et al.*, 2000). Interessanterweise, zeigen NPY Y1 Rezeptor defiziente Mausmutanten eine moderate Gewichtszunahme (Weibchen mehr als Männchen). Eine mögliche Erklärung könnte eine Störung weiterer gewichtsregulatorischer Mechanismen sein. Die Darstellung NPY Y1 Rezeptor positiver Neurone im Bereich des Nucleus arcuatus von NSCL-2 defizienten Mutanten zeigte eine Reduktion um 34% gegenüber Kontrolltieren. Weiterhin fanden sich Störungen bei der Regulation der Anzahl NPY Y1 Rezeptor positiver Zellen unter Nahrungsmangel. In Kontrolltieren konnte nach 2 Tagen ohne Nahrung eine deutliche Reduktion NPY Y1 Rezeptor positiver Zellen beobachtet werden. In NSCL-2^{-/-} Mutanten konnte hingegen keine Veränderung des ursprünglichen Spiegels NPY Y1 Rezeptor positiver Zellen gefunden werden.

Welchen Einfluß hat eine reduzierte Anzahl NPY Y1 Rezeptor positiver Neurone innerhalb des Nucleus arcuatus auf die Reproduktivität?

Klar ist, das NPY negativ durch Leptin reguliert wird. Die Bindung von Leptin an Leptinrezeptoren, die u.a. auf NPY Neuronen lokalisiert sind, bewirkt eine Inhibierung der NPY Aktivität, wobei die Rezeptoren NPY Y1 und/oder NPY Y5 vermehrt präsentiert werden (Schaffhauser *et al.*, 1997). Bei Energieüberschuß erfolgt so eine Inhibierung des Hungergefühls und eine erhöhte GnRH Aktivität. Es ist nicht bekannt, welche molekularen Mechanismen eine Kopplung zwischen NPY Rezeptoren und GnRH Aktivität vermitteln. Bei Nahrungsmangel führt die Abnahme der NPY Y1 und/oder NPY Y5 Rezeptoren zu einer Steigerung des Hungergefühls und einer geringeren GnRH (und vermutlich auch FSH-RF) Aktivität. Da in NSCL-2 defizienten Mutanten, unabhängig vom Energiehaushalt, eine reduzierte Anzahl von NPY Y1 Rezeptoren vorliegt, könnte eine stetige Inhibierung des reproduktiven Systems und ein entsprechendes Hungergefühl vorgetäuscht werden.

Zwar läßt sich mit dieser Begründung nicht der unveränderte LH Spiegel in NSCL-2-/- Mäusen erklären, denkbar wäre aber auch eine mögliche selektive Inhibierung der FSH-RF Aktivität.

Da NPY Y1 Rezeptor positive Zellen erst postnatal (ab P5) detektierbar sind, ist eine kombinierte Darstellung NSCL-2 und NPY Y1 Rez. positiver Zellen nicht möglich. Jedoch deuten die überlappenden Expressionsmuster auf eine mögliche Interaktion zumindest während früher peri- und postnataler Phasen hin. Ein besseres Verständnis der Kopplung von GnRH und NPY System könnte eine Markierung von NPY Y1 Rezeptoren auf Nervenfasern GnRH positiver Zellen in NSCL-2 defizienten Mäusen bringen. Eine Abnahme wäre ein deutlicher Hinweis auf eine mögliche Inhibierung des reproduktiven Systems durch „falsche“ Signale des NPY Systems.



Schema 2: Mögliche Interaktionen zwischen Leptin-NPY-NPY Rez. und GnRH positiven Neuronen. Das Schema wurde teilweise von (Widdowson and Wilding, 2000) übernommen.

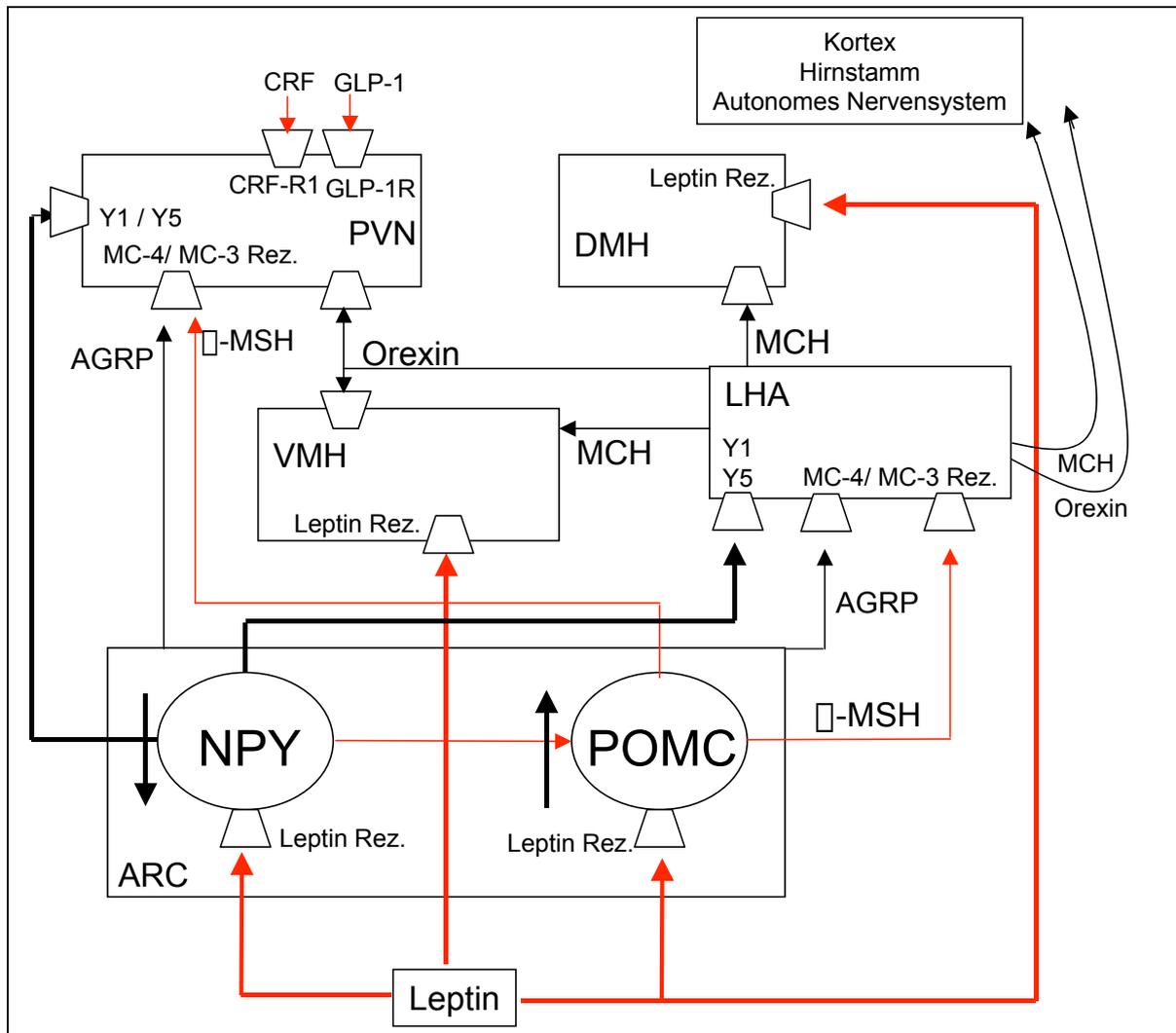
Welche Rolle spielt der Leptin-Rezeptor in NSCL-2 mutanten Mäusen?

Wegen der Expression von NSCL-2 im adulten Hypothalamus (ARC und PVN) beobachteten Good und Mitarbeiter eine Reduktion von Leptinrezeptor mRNA in verschiedenen hypothalamischen Kerngebieten bei NSCL-2 defizienten Mutanten. Eigene Untersuchungen mittels immunhistochemischer Analyse des Leptinrezeptors konnten hingegen keine wesentliche Reduktion des Leptinrezeptors in NSCL-2-/- Mutanten gegenüber Kontrolltieren beweisen. Ob der beobachtete Unterschied durch die verschiedenen Darstellungsmethoden

verursacht wird (in situ Hybridisierung – Immunhistochemie) sei dahingestellt. Im Widerspruch zu einer wichtigen Rolle von NSCL-2 bei der Regulation von Leptin-Rezeptoren steht auch die fehlende NSCL-2 Expression in adulten hypothalamischen Kerngebieten. Zwar konnten vereinzelt postnatal sehr schwache Signale im Hypothalamus detektiert werden, aber diese Signale sind wahrscheinlich durch die hohe Stabilität des Reporterproteins zu erklären. Eine mögliche Rolle innerhalb gewichtsregulatorischer Prozesse, wie von Good und Mitarbeitern vermutet, erscheint daher eher unwahrscheinlich. Weiterhin führte eine 2 Tage Null Diät nicht zu einer Induktion der NSCL-2/LacZ Expression. Eigene Arbeiten und Untersuchungen von (Begley *et al.*, 1992) sprechen gegen eine mögliche Funktion innerhalb „reifer“ Neurone, mit Ausnahme des regenerativen olfaktorischen Neuroepithels. Die Analyse verschiedener Gehirnareale wie Kortex und Kleinhirn bestätigten ebenfalls die transiente Funktion während neuronaler Differenzierungsvorgänge.

Die Bindung von Leptin an seinen Rezeptor reguliert den Energiehaushalt des Körpers und entsprechende Prozesse im Gehirn. Neben der Inhibierung der NPY Expression bewirkt ein erhöhter Leptinspiegel eine Aktivierung der POMC Expression. Das Prohormon Proopiomelanokortin (POMC) wird im Gehirn und in der Hypophyse exprimiert. Durch posttranslationale Modifikation entsteht eine Reihe von verschiedenen Hormonen. In der Adenohypophyse wird POMC zu ACTH prozessiert, wobei ACTH neben dem β -Lipoprotein eine wichtige Rolle bei der Regulierung der Nebennierenrinde spielt. Im Hypothalamus und im intermediären Hypophysenlappen findet eine weitere Prozessierung statt; ACTH wird in β -MSH und dem corticotropin-like intermediate lobe Peptide (CLIP) gespalten. Das β -Lipoprotein wird zum β -Lipoprotein und β -Endorphin gespalten. Eine Inaktivierung von POMC bei Mäusen führt zu einer deutlichen Gewichtszunahme. Die gleichen Effekte lassen sich auch bei Inaktivierung des MC-4 Rezeptors beobachten. In der folgenden Abbildung (S. 135) sind die wichtigsten Zusammenhänge innerhalb verschiedener NSCL-2 positiver Kerngebiete gezeigt. In der vorliegenden Arbeit wurde die Anzahl POMC (ACTH) positiver Neurone im Hypothalamus und in der Hypophyse immunhistochemisch detektiert. In NSCL-2 Mutanten konnte eine deutliche Reduktion POMC (ACTH) positiver Zellen im Hypothalamus (Nucleus arcuatus) detektiert werden. Im Gegensatz dazu zeigte die Analyse der Hypophyse keine Reduktion POMC (ACTH) positiver Neurone. Eine POMC Inaktivierung führt in der Maus zu Störungen der Nebennierenrinde, zu Pigmentveränderungen und einer deutlichen Gewichtszunahme. Die Gewichtszunahme bei POMC mutanten Mäusen ist auf einen erhöhten

Nahrungsbedarf zurückzuführen (Yaswen *et al.*, 1999) ähnlich wie bei NSCL-2 mutanten Mäusen (siehe Ergebnisse).



Schema 3: Schematische Darstellung hypothalamischer Signalwege. Die roten Pfeile markieren katabolische Signalwege, wobei die Stärke der Pfeile in Korrelation mit der jeweiligen Wirkung steht. Die schwarzen Pfeile markieren anabolische Signalwege. Die NPY, Orexin, CRF und GLP-1 Signale basieren auf pharmakologischen Studien. Die Abbildung wurde teilweise aus (Salton *et al.*, 2000) entnommen. Abkürzungen: AGRP Agouti related protein; α -MSH (α -Melanozyten-stimulierendes Hormon); ARC Nucleus arcuatus; CRF Corticotropin-Releasing Factor; CRF-R1 CRF Rezeptor; DMH Nucleus dorsomedialis hypothalami; GLP-1 Glucagon-like Peptid; GLP-1R GLP Rezeptor; LHA Laterales hypothalamisches Gebiet; MC-3/4 Rez. Melanocortin- 3/4 Rezeptor; MCH Melano-concentrating Hormon; NPY Neuropeptid Y; PVN Nucleus paraventricularis; VMH Ventromedialer Hypothalamus; Y1 / Y5 Neuropeptid Y1 / Y5 Rezeptor.

Bei Menschen führt eine POMC Deletion ebenfalls zu einer Nebenniereninsuffizienz, roten Haaren und einer deutlichen Gewichtszunahme (Krude *et al.*, 1998). Zwar zeigen NSCL-2 defiziente Mutanten weder Pigmentstörungen noch eine Nebenniereninsuffizienz, aber die

reduzierte Anzahl POMC (ACTH) positiver Zellen im Bereich des NSCL-2 positiven Nucleus arcuatus und die deutliche Gewichtszunahme deuten auf eine Störung des Leptin/POMC Signalweges hin. Unklar ist jedoch, ob die Störung durch eine geringere POMC Expression verursacht wird, oder ob Komponenten des Signalweges verändert sind. Weiterhin ist denkbar, daß die vorhandenen POMC positiven Zellen keine Störungen der POMC-Prozessierung zeigen und lediglich die verringerte Expression von POMC aufgrund der geringeren Zellzahl, die Störungen in NSCL-2 defizienten Mutanten verursacht.

Frühere Untersuchungen haben gezeigt, daß der Serum Leptin Spiegel in NSCL-2 defizienten Mäusen um das 4 fache erhöht ist. Könnte dieser erhöhte Spiegel zu einem verringerten Ansprechen des Leptinrezeptors führen? Bei Ratten konnte gezeigt werden, daß eine Fütterung mit hohem Fettanteil zu einer deutlichen Gewichtserhöhung führt. Der ebenfalls erhöhte Leptinspiegel führt jedoch nicht mehr zu einer Gewichtsabnahme. Ähnlich wie bei übergewichtigen Menschen wurde daher eine Leptin-Resistenz angenommen. Auf der anderen Seite reagiert das NPY-System bei übergewichtigen Ratten normal. In den übergewichtigen Ratten wurde eine reduzierte Aktivität des NPY Systems beobachtet und entsprechend eine erhöhte Dichte von NPY Rezeptoren. Es ist jedoch möglich, daß durch den erhöhten Leptinspiegel andere Mechanismen, die ebenfalls zur Gewichtsregulation beitragen, gestört werden. So könnte beispielsweise auch eine dauerhafte Aktivierung POMC positiver Neurone eine Fehlregulation hervorrufen und zu einer Gewichtszunahme führen.

Aufgrund des transienten Expressionsmusters im sich entwickelnden Hypothalamus ist NSCL-2 sicherlich kein Faktor, der die Plastizität dieser hypothalamischen Prozesse steuert oder aufrecht erhält. Vermutlich wirkt NSCL-2 als Faktor während früher Phasen der Migration und Differenzierung hypothalamischer Neurone. Die beobachteten Störungen der Nahrungsaufnahme wären daher als Folge einer bereits früher stattgefundenen Veränderung neuraler Zellpopulationen zu verstehen.

Eine Inaktivierung von NSCL-2 hat in anderen neuronalen Systemen wie Kleinhirn und Kortex keine wesentlichen Auswirkungen. Offensichtlich findet in diesen Systemen eine Kompensierung durch andere Faktoren statt. Im Hypothalamus scheint eine Kompensierung durch andere Faktoren jedoch nur teilweise oder gar nicht zu erfolgen. Zwar konnten auch NSCL-1 positive Neurone im Hypothalamus lokalisiert werden, aufgrund des unterschiedlichen Expressionsmusters zwischen NSCL-1 und NSCL-2 scheint aber eine Kompensierung eher unwahrscheinlich. Bisher konnte nur für sehr wenige bHLH Gene eine Aktivität im Hypothalamus nachgewiesen werden. Die NeuroD Expressionsanalyse ergab

Transkripte im Hypothalamus und in der Hypophyse, zudem fungiert NeuroD als Aktivator für eine POMC Expression in der Hypophyse. Da eine Inaktivierung von NeuroD zu einem frühen letalen Phänotyp führt, sind gewichtsregulatorische Funktionen von NeuroD bisher noch unklar. Die Inaktivierungen der bHLH-PAS Faktoren SIM-1 und Arnt-2 in der Maus verursachen massive Störungen innerhalb hypothalamischer Kerngebiete. Sim1 heterozygote Mausmutanten zeigen eine deutliche Gewichtszunahme, wobei Defekte im Nucleus paraventricularis des Hypothalamus beobachtet werden konnten (Michaud *et al.*, 1998), (Holder *et al.*, 2000). Ob mögliche Interaktionen zwischen NSCL-2 und Mitgliedern der bHLH-PAS Familie bestehen, ist jedoch unbekannt und muß durch zukünftige Untersuchungen gezeigt werden (Michaud *et al.*, 2000).

4.4.3 Die Analyse des Maus NSCL-2 Promotors ergab Homologien zum humanen NSCL-2 Promotor

Bei der Sequenzanalyse des Maus NSCL-2 Promotors konnten eine Reihe verschiedener Bindungsmotive gefunden werden. Neben STAT Bindungsmotiven konnten, E2A, SP-1, Oct-1, APF-2□ und GATA-1 Bindungstellen lokalisiert werden. Ein Sequenzvergleich zwischen Maus und Mensch zeigte eine hohe Konservierung im proximalen Promotorbereich. Interessanterweise konnten innerhalb des humanen NSCL-2 Promotors ebenfalls verschiedene STAT Bindungsmotive lokalisiert werden. Es konnte gezeigt werden, daß Leptin über den Leptinrezeptor den JAK/STAT Signaltransduktionsweg aktiviert wird. Zwar besteht zwischen den humanen und Maus STAT Bindungsstellen eine hohe Konservierung, eine mögliche Einordnung in den JAK/STAT Signaltransduktionsweg kann aber nur durch entsprechende Bindungsstudien belegt werden.

4.5 Analyse der NSCL-1xNSCL-2 Doppelmutanten

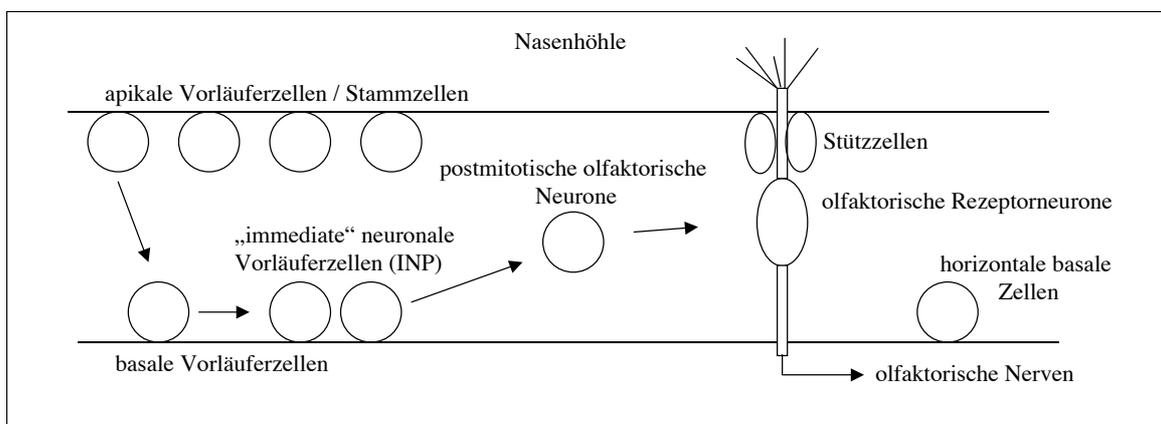
Da weder die Inaktivierung von NSCL-1 noch von NSCL-2 zu massiven Störungen der Neurogenese führten, wurden NSCL-1 und NSCL-2 doppelt mutante Tiere generiert, um eine mögliche Redundanz beider Gene zu untersuchen. Interessanterweise fanden sich bereits bei einigen der zur Herstellung doppelt mutanter Tiere gezüchteten NSCL-1^{-/-}xNSCL-2^{+/-} Tieren Auffälligkeiten. Bei einigen Tieren konnte ein gelähmtes Hinterbein beobachtet werden. Weiterhin wurde bei Verpaarungen von NSCL-1^{-/-} x NSCL-2^{+/-} Doppelmutanten eine Reduktion der statistisch zu erwartenden Anzahl von Vaginal-Pfropfen beobachtet werden. Die Analyse von Vaginal-Abstrichen aus NSCL-1^{-/-} x NSCL-2^{+/-} weiblichen Tieren bestätigte bei einigen Tieren eine Störung des Zyklus. Diese Ergebnisse deuten auf eine mögliche Funktion von NSCL-1 bei der Regulation reproduktiver Prozesse hin. Ob in NSCL-1^{-/-}x NSCL-2^{+/-} Störungen des GnRH Systems vorliegen, wurde jedoch nicht weiter analysiert. Bei NSCL-1 und NSCL-2 doppelt homozygoten Tieren fanden sich bei der Embryonalentwicklung keine signifikanten Auffälligkeiten. Dagegen war das Geburtsgewicht dieser Tiere reduziert, es fand sich ein reduzierter Muskeltonus, der zu einer gekrümmten Körperhaltung führte und unregelmäßige Atembewegungen.

Doppelt homozygote Tiere hatten niemals Milch in ihrem Magen und starben wenige Stunden nach der Geburt. Welche Ursachen für den letalen Phänotyp verantwortlich sind, konnte nicht geklärt werden. Ein Vergleich mit Mash-1 Nullmutanten Tieren zeigt interessanterweise deutliche Parallelen im klinischen Bild. Mash^{-/-} haben ebenfalls keine Milch in ihrem Magen, haben einen reduzierten Muskeltonus und sterben einige Stunden nach der Geburt (Lo *et al.*, 1994).

4.5.1 Störungen der Differenzierung des olfaktorischen Neuroepithels bei NSCL-1xNSCL-2 Doppelmutanten

Die Untersuchung des olfaktorischen Neuroepithels von NSCL-1xNSCL-2 Doppelmutanten mittels immunhistochemischer Analyse zeigte deutliche Störungen in der terminalen Differenzierung olfaktorischer Neurone. Während der Entwicklung olfaktorischer Rezeptorneurone migrieren zunächst apikale Vorläuferzellen in basale Schichten der olfaktorischen Plakode. Danach folgt die Generierung intermediärer Vorläuferzellen, welche letztendlich postmitotische, olfaktorische Neurone bilden. Neben olfaktorischen Rezeptorneuronen, entstehen Stützzellen und horizontale basale Zellen. Mash-1 gilt als früher

Determinierungsfaktor olfaktorischer Neurone und wird in apikalen und basalen Vorläuferzellen exprimiert (Cau *et al.*, 1997). In ventrokaudalen Domänen vermittelt vermutlich Ngn-2 die Determinierung apikaler und/oder basaler Vorläuferzellen. Nach der Migration in basale Schichten entstehen zunächst Ngn-1 und NeuroD positive „immediate“ neuronale Vorläuferzellen (auch als globuläre basale Zellen bezeichnet), welche die entsprechenden olfaktorischen Rezeptorneurone (ORN) bilden. NSCL-1 und NSCL-2 positive Signale können ab E10 innerhalb des olfaktorischen Epithels detektiert werden. Da das olfaktorische Neuroepithel keine strikte Trennung der einzelnen Schichten aufweist, ist eine genaue Zuordnung NSCL-1 und NSCL-2 positiver Zellen zu bestimmten Entwicklungsstadien schwer vorzunehmen. NSCL-1 positive Zellen lassen sich, mit Ausnahme der apikalen Stüttschicht, im gesamten olfaktorischen Neuroepithel detektieren. NSCL-2/LacZ Signale beschränken sich hingegen weitgehend auf basale Schichten. Die immunhistochemische Darstellung OMP (olfaktorisches Markerprotein) positiver olfaktorischer Rezeptorneurone zeigte eine deutliche Reduktion in NSCL-1xNSCL-2 Doppelmutanten. Weiterhin ist eine schwächere β -Tubulin III Expression detektierbar. Die unveränderte NeuroD Expression und die deutliche Reduktion terminaler Differenzierungsfaktoren deuten auf eine Rolle von NSCL-1 und NSCL-2 als Differenzierungsfaktoren parallel und/oder „downstream“ zu NeuroD hin. Ob jedoch NSCL-1 und NSCL-2 als „generelle“ Differenzierungsfaktoren fungieren oder nur in bestimmten ORN Subpopulationen exprimiert werden, ist noch nicht klar. Jedes ORN exprimiert ein oder mehrere Geruchsrezeptoren aus einer Familie von mehr als 1000 Mitgliedern. Bei Nagetieren werden innerhalb des olfaktorischen Epithels verschiedene Zonen mit unterschiedlichen Geruchsrezeptoren festgelegt.



Schema 3: Entwicklung des olfaktorischen Neuroepithels. Nach Migration apikaler Vorläuferzellen in basale Schichten, entstehen postmitotische olfaktorische Neurone, die zu olfakt. Rezeptorneuronen differenzieren.

NSCL-1 und NSCL-2 positive Zellen konnten jedoch in allen Zonen des olfakt. Epithels detektiert werden, was für eine Funktion als Differenzierungsfaktor innerhalb aller Subpopulationen spricht. Bei der Entwicklung des olfaktorischen Neuroepithels verschieben sich mitotisch aktive Zellen von apikalen zu basalen Schichten. Während embryonaler Stadien befinden sich die meisten olfaktorischen Zellen innerhalb apikaler Schichten, wohingegen postnatal die Mehrheit der mitotisch aktiven Zellen in basalen Schichten detektierbar ist. Ein vollständiges Verschwinden mitotisch aktiver Zellen aus apikalen Schichten wird jedoch nicht beobachtet. Vermutlich handelt es sich bei den apikalen, mitotisch aktiven Zellen um olfaktorische Stammzellen, die die lebenslange Regenerationsfähigkeit des olfaktorischen Neuroepithels sichern. Interessanterweise fand sich bei E18,5 innerhalb des olfaktorischen Neuroepithels eine Reduktion apikaler Vorläuferzellen in NSCL-1xNSCL-2 Doppelmutanten.

Die lebenslange Regenerationsfähigkeit olfaktorischer Neurone könnte sich in der verbliebenen Expression von NSCL-1 und NSCL-2 im adulten olfaktorischen Neuroepithel widerspiegeln. In allen anderen neuronalen Geweben, mit Ausnahme des NSCL-2 positiven Habenularkerns im Bereich des Thalamus, konnte dagegen während adulter Stadien keine NSCL-1 und NSCL-2 Aktivität beobachtet werden. Diese Resultate implizieren eine partiell überlappende Rolle von NSCL-1 und NSCL-2 bei der Differenzierung olfaktorischer Neurone und bei der Kontrolle des Zellzyklusaustritts.

4.5.2 Geringe Störungen der Großhirnrinden- und Kleinhirn- Entwicklung bei NSCL-1xNSCL-2 doppelt mutanten Tieren.

Die morphologische Analyse des Großhirns und Kleinhirns von NSCL-1xNSCL-2 Doppelmutanten ergab keine signifikanten Änderungen der Zytoarchitektur. Ähnliche Resultate fanden sich in Bezug auf die Expression diverser Marker wie α -Tubulin, Calretinin, Calbindin, NeuroD, NeuroD2, Math-1 und Reelin.

Lediglich die Expression von Id-2 im Bereich der Purkinje-Zellschicht des Kleinhirns war reduziert. Interessanterweise konnten bereits in anderem Zusammenhang Interaktionen von positiv wirkenden gewebsspezifischen bHLH Faktoren (wie NSCL-1 und NSCL-2) und negativ regulierenden bHLH Proteinen (wie Id-2) nachgewiesen werden (Benezra *et al.*, 1990), (Sun *et al.*, 1991). Weiterhin konnte *in vitro* gezeigt werden, daß NSCL-1 den Promotor von Id-2 stimuliert (Neuman *et al.*, 1995). Die beobachtete Reduktion der Id-2 Expressionshöhe *in vivo* in NSCL-1xNSCL-2 Doppelmutanten paßt daher gut ins Bild.

Die meisten Entwicklungsprozesse, wie die Bildung laminarer Schichten im Bereich des Kortex, laufen erst während früher postnataler Stadien ab. Da doppelt homozygote NSCL-1xNSCL-2 Mutanten kurz nach der Geburt sterben, können Mechanismen der Schichtenentwicklung bzw. terminale Differenzierungsvorgänge in Doppelmutanten nicht untersucht werden.

4.5.3 NSCL's und Zellzyklusregulation

Auf eine mögliche Regulation der Zellzyklusprogression durch NSCL-1 und NSCL-2 wurde bereits mehrfach hingewiesen. Es war daher von besonderem Interesse die Anzahl der sich teilenden Zellen im Kortex und im Cerebellum von NSCL-1xNSCL-2 Doppelmutanten zu untersuchen. In der Tat war die Anzahl BrdU positiver Zellen im Bereich der ventrikulären und subventrikulären Schichten des Kortex reduziert. Da jedoch nur NSCL-1 in der subventrikulären Schicht des Kortex also in unmittelbarer Nähe zu mitotisch aktiven Zellen exprimiert wird, ist ein möglicher Effekt durch die kombinierte Inaktivierung nur schwer zu erklären. Möglicherweise hat die Expression von NSCL-2 in intermediären Schichten auch einen Einfluß auf ventrikuläre bzw. subventrikuläre Schichten. Die absolute Zellzahl innerhalb des Kortex zeigte in NSCL-1xNSCL-2 Doppelmutanten keine wesentlichen Unterschiede in Vergleich zu Kontrolltieren. Überraschenderweise zeigte die Darstellung mitotisch aktiver Zellen mittels PCNA Antikörper eine deutlich geringere Reduktion sich teilender Zellen in NSCL-1xNSCL-2 Doppelmutanten als bei der BrdU Anfärbung. Die PCNA Anfärbung zeigt nur eine Momentaufnahme von mitotisch aktiven Zellen, wohingegen die BrdU Inkorporation mitotisch aktive Zellen während eines längeren Zeitraums (hier 3h) markiert, so daß sich auch geringe Unterschiede über die Zeit aufsummieren. Ein Vergleich der BrdU Inkorporation zu verschiedenen Zeitpunkten (E14,5-E18.5) und eine Variation der Inkubationszeiten (1h-24h) sollte eine genauere Auflösung möglicher Defekte in Bezug auf Zellteilungsereignisse geben.

Ein direkter Zusammenhang zwischen bHLH Faktoren und Zellteilungsprozessen wurde bisher nur für myogene bHLH Faktoren intensiv untersucht. Im Mittelpunkt der Zellzyklusregulation standen dabei Cyclin-abhängige Proteinkinasen (CDK's), Cycline und Inhibitoren der Cyclin-abhängigen Proteinkinasen (CKI's). Die zentrale Funktion dieses regulatorischen Systems wird von den CDK's ausgeübt, wobei deren Aktivität durch die Cycline und die zugeordneten Inhibitoren kontrolliert und bestimmt wird. Es konnte gezeigt

werden, daß in proliferierenden Zellen die Aktivität myogener bHLH Proteine durch die Überexpression von CyclinD-CDK Komplexen inhibiert wird (Guo *et al.*, 1995), (Guo and Walsh, 1997). Einige Autoren vermuten eine Hyperphosphorylierung von MyoD durch den CyclinD1-CDK Komplex, wodurch die Aktivität von MyoD inhibiert wird. Die Mechanismen dieser Phosphorylierung sind jedoch noch weitgehend unverstanden (Skapek *et al.*, 1995). Andere Untersuchungen deuten auf eine CyclinD1 abhängige direkte Interaktion von CDK4 und MyoD hin. Durch die direkte Interaktion kommt es zu einer Inhibition der DNA Bindung von MyoD und seiner transaktivierenden Eigenschaften. Da die nukleäre CDK4 Verteilung von CyclinD1 abhängig ist, wird hier ein CyclinD1 sensitiver Mechanismus zur Inaktivierung von MyoD postuliert (Zhang *et al.*, 1999). Ob neuronale bHLH Proteine wie NSCL-1 und NSCL-2 ähnlichen Regulationsereignissen unterliegen, ist noch unbekannt.

Ebenfalls gut untersucht wurden die dominant negativen Id HLH Proteine und ihr Einfluß auf die Zellzykluskontrolle. Es existieren zwei getrennte Mechanismen: Für Id2 und Id4 konnte eine direkte Interaktion mit dem Retinoblastoma (pRB) Protein nachgewiesen werden, als dessen Folge pRB nicht mehr in der Lage ist, die Funktion von E2F zu inhibieren (Iavarone *et al.*, 1994). E2F kontrolliert die Expression von Proteinen, die für den Fortgang des Zellzyklus benötigt werden. In einem zweiten Mechanismus interagiert Id1 mit bHLH-E2A Komplexen, die die Expression von p21 aktivieren (Prabhu *et al.*, 1997). Durch die Inhibierung des Cyclin-abhängigen Kinase Inhibitors p21 (auch als CIP1, Waf1 bezeichnet) können Cyclin A/E-CDK2 Komplexe das pRB Protein phosphorylieren und stellen damit die Weichen für den Eintritt in die S-Phase. Weiterhin existieren Arbeiten, die eine direkte Verbindung zwischen Id-bHLH Heterodimeren und Cyclinabhängigen Kinasen (CDK) hergestellt haben. So zeigten Hara und Mitarbeiter, daß Id2 als Substrat für Cyclin A und Cyclin E abhängige CDK2 Kinasen fungiert (Hara *et al.*, 1997), (Deed *et al.*, 1997). In vitro Versuche bestätigten, daß Id2 durch Phosphorylierung seine Fähigkeit als Antagonist bei der Formierung eines heterodimeren E12-MyoD-E-Box Komplexes verliert (Hara *et al.*, 1997). Zur Zeit ist es weitgehend unverstanden, welche Rolle neuronale bHLH Transkriptionsfaktoren bei diesen Prozessen spielen. Eine Überexpression von NeuroD in Secretin exprimierenden enteroendokrinen Zellen bewirkt einen Zellzyklusarrest und eine p21 Aktivierung. In PC12 Zellen führte jeweils eine Überexpression von NeuroD, Ngn-1 oder Mash-1 in Kombination mit E12 zu einer Aktivierung des CKI p27 (Kip1) (Farah *et al.*, 2000). Eine retrovirale Überexpression von NeuroD in kultivierten Retinazellen bewirkt ebenfalls eine deutliche Reduktion der Zellteilung (Morrow *et al.*, 1999b). Vorläufige eigene Arbeiten haben gleichfalls auf eine Hemmung der Zellteilungsrate durch die Überexpression von NSCL-1 und

NSCL-2 hingewiesen. Die beobachtete Reduktion der Zellteilungsrate in den NSCL-1xNSCL-2 Doppelmutanten erscheint als Paradoxon, das nur durch weitere sekundäre Regulationsphänomäne zu erklären ist.

Der Zusammenhang von Zellzykluskontrolle und den NSCL Funktionen wurde auch durch gänzlich anders motivierte Experimente bestätigt. So suchten Kannan und Mitarbeiter in einer humanen Krebszelllinie nach p53 Zielgenen. Hierzu bedienten sie sich einer temperatursensitiven p53 Mutante, die es ihnen erlaubte die Aktivität des p53 Proteins durch einfachen Temperaturwechsel zu kontrollieren. Bei diesen Versuchen fand sich eine Erhöhung der NSCL-2 Expression zusammen mit der Induktion des CDK-Inhibitors p21 als Folge eines p53 induzierten Zellzyklusarrestes (Kannan et al., 2001). Vermutlich stellt NSCL-2 einen frühen Marker für das Verlassen des Zellzyklus dar. Welche Mechanismen für die gesteigerte Expression von NSCL-2 verantwortlich sind ist jedoch völlig unklar. Interessanterweise zeigte auch Necdin bei diesen Versuchen ein gesteigertes Expressionsniveau, dessen Inaktivierung bei Mäusen, ähnlich wie bei NSCL-2^{-/-} Mutanten, zu einer deutlichen Gewichtszunahme und Infertilität führt. Die Hypothese, daß NSCL-1 und NSCL-2 an der Regulation des Zellzyklus beteiligt sind, wurde auch durch die Resultate der NSCL-1 und NSCL-2 Zielgensuche bestätigt. Bei der Suche nach NSCL-1 und NSCL-2 Zielgenen wurden Makroarrays der Firma Clontech verwandt, die mit markierten cRNA's aus Gehirnen von E18,5 NSCL-1xNSCL-2 Doppelmutanten hybridisiert wurden. Neben der Reduktion von Cyclin D2 konnte ein komplettes Fehlen von Cyclin C Signalen gezeigt werden. Ebenfalls reduziert war die Expression von Necdin in NSCL-1xNSCL-2 doppelt homozygoten Gehirnen im Vergleich zur doppelt heterozygoten Situation. Es ist wahrscheinlich, daß die Reduktion der Cycline D2 und C einen direkten Effekt auf die kombinierte NSCL-1xNSCL-2 Inaktivierung darstellt.

Im Gegensatz zu Cyclin D2 und Cyclin C, zeigte der Tumorsuppressor BRCA-2 (breast cancer type 2) ein leicht erhöhtes Expressionsniveau in NSCL-1xNSCL-2 Doppelmutanten. Die Untersuchung von Kannan und Mitarbeitern ergab nach p53 Induktion ein deutlich reduziertes Expressionsniveau von BRCA-1 (breast cancer type-1). Eine direkte Verknüpfung von Ergebnissen der p53 Induktion in humanen Lungenkrebszellen und der Analyse der NSCL-1xNSCL-2 doppelt homozygoten Mutanten ist sicherlich nicht möglich, die Ergebnisse weisen aber deutlich auf eine mögliche Beteiligung der NSCL-Gene bei zellzyklusregulatorischen Prozessen hin. Prinzipiell ist die NSCL-1 und NSCL-2 Expression bei erniedrigter Zellteilungsaktivität (entspricht hoher p53 Aktivität und niedrigem BRCA-

Spiegel) hoch. Dem entsprechend ist bei einem Verlust von NSCL-1 und NSCL-2 (wie in den NSCL-1xNSCL-2 Doppelmutanten) der BRCA-Spiegel hoch.

Zwar konnten die Ergebnisse im Rahmen dieser Arbeit nicht genauer analysiert werden, aber es ist möglich, daß die Inhibierung der Cycline Cyclin D2 und Cyclin C für die Reduktion BrdU positiver Zellen in NSCL-1xNSCL-2 doppelt homozygoten Mutanten verantwortlich ist. Zwar gibt es noch keine direkten Beweise für eine Beteiligung von NSCL-1 und/oder NSCL-2 an zellzyklusregulatorischen Prozessen, die Funktionsanalyse weist aber in Kombination mit dem zeitlichen und räumlichen Expressionsmuster auf einen Einfluß auf den Zellzyklusapparat hin. In Zukunft soll durch die Isolierung bestimmter Gewebe, wie beispielsweise des Kleinhirns und nachfolgenden „Expression Profiling“, eine bessere Auflösung des veränderten Expressionsniveaus in NSCL-1xNSCL-2 Doppelmutanten erreicht werden.

4.6 Ausblick

Mit der vorliegenden Arbeit wurde deutlich, daß eine Inaktivierung von Genen in der Maus nicht immer eindeutige Hinweise auf die Funktion des jeweiligen Proteins gibt. So führte die Inaktivierung von NSCL-2 zu einem sehr komplexen Phänotyp, wohingegen die Deletion von NSCL-1 keine offensichtlichen Störungen hervorrief. Die kombinierte Inaktivierung resultierte in einem perinatal letalen Phänotyp, schwerwiegende Störungen der Neurogenese konnten jedoch nicht detektiert werden. Es wurde eine mögliche funktionelle Kompensierung zwischen NSCL-1, NSCL-2 und/oder verschiedenen Mitgliedern der bHLH Familie als Ursache für den vergleichsweise milden Phänotyp diskutiert. Ob der Funktionsverlust von NSCL-1 und NSCL-2 zellautonom durch andere Mitglieder der neuronalen bHLH Familie erfolgt, ist noch unklar. Die Generierung von weiteren Doppelmutanten zwischen der NSCL-Subfamilie und Mitgliedern der NeuroD Familie könnte weitere Einblicke in mögliche kompensatorische Prozesse geben.

Durch die Kombination von Cre-Rekombinase exprimierenden Mäusen und von mit loxP Erkennungssequenzen modifizierten Genen lassen sich Gene zu einem bestimmten Zeitpunkt innerhalb spezifischer Gewebe inaktivieren. Eine derartige konditionelle Inaktivierung würde auch das Verständnis der Funktion von NSCL-2 verbessern. So könnte eine durch den GnRH Promotor vermittelte Cre-Rekombinase Aktivität das NSCL-2 Gen spezifisch in GnRH positiven Zellen inaktivieren. Solche Mäuse würden weitere Einblicke in die Interaktionen

zwischen Fertilität und Gewichtsregulation erlauben. Solche Mäuse sollten nach einer Inaktivierung von NSCL-2 eine deutliche Gewichtszunahme und eine Inhibierung des reproduktiven Systems zeigen. Durch die zeitlich regulierte Ausschaltung des NSCL-2 Gens könnte geklärt werden, ob NSCL-2 eine Funktion während der adulten Entwicklung besitzt. Schließlich würde eine konditionelle Inaktivierung des NSCL-2 Gens in Gehirnarealen wie dem Kleinhirn auf einem NSCL-1 mutanten genetischen Hintergrund wertvolle Einblicke in die kombinierte Rolle beider Gene für die Entwicklung verschiedener Nervenzelltypen liefern. Bislang kann diese Frage wegen der frühen Letalität der Doppelmutanten nicht untersucht werden.

Wie gezeigt, führt eine Geninaktivierung in der Maus nicht immer zu einem offensichtlichen Phänotyp. Eine andere Möglichkeit die Funktion von Genen zu analysieren, ist die spezifische Überexpression. Die kann u.a. durch entsprechende rekombinante Viren oder die Herstellung von transgenen Mausstämmen erfolgen, in denen BAC's, YAC's oder Plasmid basierte DNA-Konstrukte zur Expression gebracht werden. Ob durch einen solchen Ansatz die Funktion von NSCL-1 aufgeklärt werden kann, müssen zukünftige Arbeiten zeigen.

5. Literatur

Acampora, D., Maza, S., Lallemand, Y., Avantaggiato, V., Maury, M., Simeone, A., and Brulet, P. (1995). Forbrain and midbrain regions are deleted in *otx-2*^{-/-} mutants due to a defective anterior neuroectoderm specification during gastrulation. *Development* **121**, 3279-3290.

Akazawa, C., Ishibashi, M., Shimizu, C., Nakanishi, S., and Kageyama, R. (1995). Mammalian helix loop helix factor structurally related to the product of *Drosophila* proneural gene *atonal* is a positive transcriptional regulator expressed in the developing nervous system. *J. Biol. Chem.* **270**, 8730-8738.

Anderson, D. J. (1995). Neural development. Spinning skin into neurons. *Curr Biol* **5**, 1235-8.

Anderson, D. J. (1999). Lineages and transcription factors in the specification of vertebrate primary sensory neurons. *Curr Opin Neurobiol* **9**, 517-24.

Arnold, H., and Braun, T. (2000). "Genetics of muscle Determination and development." Academic press,

Atchley, W., and Fitch, W. (1997). A natural classification of the basic helix-loop-helix class of transcription factors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **94**, 5172-5176.

Auffray, C. and Rougen, F. (1980). Purification of mouse immunoglobulin heavy-chain messenger RNAs from total myeloma tumor RNA. *Eur. J. Biochem.* **107** 303-314

Ausubel FM, Brent R., Kingston RE., Moore DT., Seidmann JG., Smith JA., Struhl K., (1992) Current protocols in Molecular Biology. New York: Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience

Bao, J., Talmage, D., Role, L., and Gautier, J. (2000). Regulation of neurogenesis by interactions between HEN1 and neuronal LMO. *Development* **127**, 425-35.

Bartholoma, A., and Nave, K. A. (1994). NEX-1: a novel brain-specific helix-loop-helix protein with autoregulation and sustained expression in mature cortical neurons. *Mech Dev* **48**, 217-28.

Bayer, S., and Altman, J. (1991). Neocortical development.

Beck, B. (2001). KO's and organisation of peptidergic feeding behavior mechanisms. *Neuroscience and biobehavioral reviews.* **25**, 143-158.

Begbie, J. (1999). Induction of the epibranchial placodes. *Development* **126**, 895-902.

Begley, C., Lipkowitz, S., Gobel, V., Mahon, K., Bertness, V., Green, A., Gough, N., and Kirsch, I. (1992). Molecular characterization of NSCL, a gene encoding a helix-loop-helix. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 38-42.

- Ben-Arie, N., Bellen, H., Armstrong, D., McCall, A., Gordadze, P., Guo, Q., Matzuk, M., and Zoghbi, H. (1997). Math1 is essential for genesis of cerebellar granule neurons. *Nature* **390**, 169-72.
- Ben-Arie, N., McCall, A. E., Berkman, S., Eichele, G., Bellen, H. J., and Zoghbi, H. Y. (1996). Evolutionary conservation of sequence and expression of the bHLH protein Atonal suggests a conserved role in neurogenesis. *Hum Mol Genet* **5**, 1207-16.
- Benezra, R., Locksholm, D., Turner, D., and weintraub, H. (1990). The protein Id: a negative regulator of helix-loop-helix DNA binding proteins. *Cell* **61**, 49-59.
- Benzera, R., Davis, R., Locksholm, D., Turner, D., and Weintraub, H. (1990). The Protein Id: a negative regulator of helix-loop-helix DNA binding proteins. *Cell* **61**, 49-59.
- Bober, E, Franz T., Arnold HH., Gruss P. and Tremblay (1994). Pax-3 is required for the development of the limb muscles: A possible role for the migration of dermomyotomal muscle progenitor cells. *Development* **120** 603-612 !
- Bohner, A., Akers, R., and McConnell, S. (1997). Induction of deep layer cortical neurons in vitro. *Development* **124**, 915-923.
- Braun, T., and Arnold, H. (1996). Myf5 and myoD genes are activated in distinct mesenchymal stem cells and determine different mesenchymal skeletal muscle cell lineages. *EMBO* **15**, 310-318.
- Campos-Ortega, J. A. (1998). The genetics of the Drosophila achaete-scute gene complex: a historical appraisal. *Int J Dev Biol* **42**, 291-7.
- Cannossa, M., Griesbeck, O., Berninger, B., Campana, G., Kolbeck, R., and Thoenen, H. (1997). Neurotrophin release by neurotrophins: Implications for activity-dependent neural plasticity. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **94**, 13279-13286.
- Cattanach, B., Iddon, C., and Charlton, H. (1977). *Nature* **269**, 338-340.
- Cau, E., Gradwohl, G., Fode, C., and Guillemot, F. (1997). Mash1 activates a cascade of bHLH regulators in olfactory neuron progenitors. *Development* **124**, 1611-21.
- Chen, A., and McConnell, S. (1995). Cleavage orientation and the asymmetric inheritance of Notch1 immunoreactivity in mammalian neurogenesis. *Cell* **82**, 631-641.
- Chien, L., Peilin, C., and Smith, S. (1999). Morphological evidence for direct interaction between arcuate nucleus neuropeptide Y (NPY) neurons and Gonadotropin-releasing hormone neurons and the possible involvement of NPY Y1 receptors. *Endocrinology* **140**, 5382-5390.
- Clarke WE., Berry M., Smith C., Kent A., Logan A. (2001). Coordination of fibroblast growth factor receptor 1 (FGFR1) and fibroblast growth factor-2 (FGF-2) trafficking to nuclei of reactive astrocytes around cerebral lesions in adults rat. *Mol Cell Biol.* **17**,(1) 17-30.
- Coleman, D. (1978). Obese and diabetes: two mouse genes causing diabetes-obesity syndrome in mice. *Diabetologia* **14**, 141-148.

- Crews, S. (1998). Control of cell lineage-specific development and transcription by bHLH-PAS proteins. *Genes Dev.* **12**, 607-620.
- Dang, C., Dolde, D., Gillison, M., and Kato, G. (1992). Discrimination between related DNA sites by a single amino acid residue of myc-related basic-helix-loop-helix proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **89**, 599-602.
- Davis, R. L., and Weintraub, H. (1992). Acquisition of myogenic specificity by replacement of three amino acid residues from MyoD into E12. *Science* **256**, 1027-30.
- Deed, R. W., Hara, E., Atherton, G. T., Peters, G., and Norton, J. D. (1997). Regulation of Id3 cell cycle function by Cdk-2-dependent phosphorylation. *Mol Cell Biol* **17**, 6815-21.
- Dono R., Texido G., Dussel R., Ehmke H. and Zeller R. (1998). Impaired cerebral cortex development and blood pressure regulation in FGF-2 deficient mice. **17** 4213-4225.
- Duncan, K., Bordas, L., Dicicco-Bloom, E., and Chada, K. (1997). Expression of the helix-loop-helix genes Id-1 and NSCL-1 during cerebellar development. *Developmental Dynamics* **208**, 107-114.
- Duncan, M., DiCicco Bloom, E., Xiang, X., Benzera, R., and Chada, K. (1992). The gene for the helix-loop-helix protein, Id is specifically expressed in neural precursors. *Dev. Biol.* **154**, 1-10.
- D'Arcangelo, G., Miao, G., Chen, S., Soares, H., Morgan, J., and Curran, T. (1995). A protein related to extracellular matrix proteins deleted in the mouse mutant reeler. *Nature* **374**, 719-723.
- D'Arcangelo, G., Nakajima, K., Miyata, T., Ogawa, M., Mikoshiba, K., and Curran, T. (1997). Reelin is a secreted glycoprotein recognized by the CR-50 monoclonal antibody.
- Edlund, T., and Jessel, T. (1999). Progressing from extrinsic to intrinsic signaling in cell fate specification: a view from the nervous system. *Cell* **96**, 211-224.
- Erhard JA., Legos JJ., Johanson RA., Slemmon JR., Wang X. (2000) Expression of PEP-19 inhibits apoptosis in PC-12 cells. *Neuroreport* **11**, (17) 3719-23.
- Erickson, J., Hollopeter, G., and Palmiter, J. (1996). Attenuation of the obesity syndrome of ob/ob mice by the loss of neuropeptide Y. *Science* **274**, 1704-1707.
- Ericson, J., Morton, S., Kawakami, A., Roelinck, H., and Jessel, T. (1996). Two critical periods of sonic hedgehog signaling required for the specification of motor neuron identity. *cell* **87**, 661-673.
- Fan, W., Boston, B., Kesterson, R., Hruby, V., and Cone, R. (1997). Role of melanocortinergic neurons in feeding and the agouti obesity syndrome. *Nature* **385**, 165-168.
- Farah, M. H., Olson, J. M., Sucic, H. B., Hume, R. I., Tapscott, S. J., and Turner, D. L. (2000). Generation of neurons by transient expression of neural bHLH proteins in mammalian cells. *Development* **127**, 693-702.

- Feinberg AP., Vogelstein B. (1984) A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. Addendum. *Anal. Biochem*, **137** 266-267
- Ferre-D'Amare, A., Prendergast, G., Ziff, E., and Burley, S. (1993). Recognition by Max of its cognate DNA through a dimeric b/HLH/Z domain. *Nature* **363**, 38-45.
- Fode, C., Gradwohl, G., Morin, X., Dierich, A., LeMeur, M., Golidis, C., and Guillemot, F. (1998). The bHLH protein NEUROGENIN 2 is a determination factor for epibranchial placode-derived sensory neurons. *Neuron* **20**, 483-94.
- Frotscher, M. (1998). Cajal-Retzius cells, Reelin and the formation of layers. *Curr. opin. Neurobiol.* **8**, 570-575.
- Gao, W., Liu, X., and Hatten, M. (1992). The weaver gene encodes a non- autonomous signal for CNS neural differentiation. *Cell* **68**, 841-854.
- Gilbert. (1997). "Developmental Biology." Sinauer Associates, Inc., Sunderland, Massachusetts.
- Good, D. (2000). How tight are your genes. *Hormones and Behavior* **37**, 284-298.
- Good, D. J., Porter, F. D., Mahon, K. A., Parlow, A. F., Westphal, H., and Kirsch, I. R. (1997). Hypogonadism and obesity in mice with a targeted deletion of the *Nhlh2* gene. *Nat Genet* **15**, 397-401.
- Gradwohl, G., Fode, C., and Guillemot, F. (1996). Restricted expression of a novel murine atonal-related bhlh protein in undifferentiated neural precursors. *Dev. Biol.* **180**, 227-241.
- Graham, A., and Begbie, J. (2000). Neurogenic placodes: a common front. *Trends. Neurosci.* **23**, 313-316.
- Guillemot, F., and Joyner, A. (1993). Dynamic expression of the murine Achaete-Scute homologue Mash-1 in the developing nervous system. *Mech. Dev.* **42**, 171-185.
- Guo, K., and Walsh, K. (1997). Inhibition of myogenesis by multiple cyclin-cdk complexes. *J. Biol. Chem.* **272**, 791-797.
- Guo, K., Wang, J., Andres, V., Smith, R. C., and Walsh, K. (1995). MyoD- induced expression of p21 inhibits cyclin-dependent kinase activity upon myocyte terminal differentiation. *Mol. Cell. Biol.* **15**, 3823-3829.
- Haire, M. F., and Chiaramello, A. (1996). Transient expression of the basic helix-loop-helix protein NSCL-2 in the mouse cerebellum during postnatal development. *Brain Res Mol Brain Res* **36**, 174-8.
- Hanks, M., Wurst, W., Anson-Cartwright, L., Auerbach, A., and Joyner, A. (1995). Rescue of the En-1 mutant phenotype by replacement of En-1 with En-2. *Science* **269**, 679-682.
- Hara, E., Hall, M., and Peters, G. (1997). Cdk2-dependent phosphorylation of Id2 modulates activity of E2A-related transcription factors. *Embo J* **16**, 332-42.

- Hatten, E. (1993). The role of migration in central nervous system neuronal development. *Curr Opin Neurobiol* **1**, 38-44.
- Hatten, M., and Heintz, N. (1995). Mechanisms of neural patterning and specification in the developing cerebellum. *Ann. Rev. Neurosci.* **18**, 385-408.
- Helms, A., and Johnson, J. (1998). Progenitors of dorsal commissural interneurons are defined by MATH1. *Development* **125**, 919-28.
- Heuvel, Vanden, G.B., Bodmer, R., McConnell, K.R., Nagami, G.T. , and Igarashi, P. (1996) *Kidney Int.*, **50** 453-461.
- Holder, J. L., Jr., Butte, N. F., and Zinn, A. R. (2000). Profound obesity associated with a balanced translocation that disrupts the SIM1 gene. *Hum Mol Genet* **9**, 101-8.
- Huang, B., Leu, S., Yang, H., and Norman, R. (2001). Testosterone effects on luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone responses to gonadotropin-releasing hormone in the mouse. *Journal of Andrology* **22**, 507-513.
- Huard, J., Forster, C., Carter, M., Sicinski, P., and Ross, E. (1999). Cerebellar histogenesis is disturbed in mice lacking cyclin D2. *Development* **126**, 1927-1935.
- Huszar, D., Lynch, C., Fairchild-Huntress, V., Dummore, J., and Fang, Q. (1997). Targeted disruption of the melanocortin-4 receptor results in obesity mice. *Cell* **88**, 131-141.
- Iavarone, A., Garg, P., Lasorella, A., Hsu, J., and Israel, M. A. (1994). The helix-loop-helix protein Id-2 enhances cell proliferation and binds to the retinoblastoma protein. *Genes Dev* **8**, 1270-84.
- Ingalls, A., Dickie, M., and Snell, G. (1950). Obese, a new mutation in the house mouse. *J. Hered.* **41**, 317-318.
- Jan, Y., and Jan, Y. (1993). bHLH proteins, fly neurogenesis, and vertebrate myogenesis. *Cell* **75**, 827-30.
- Jarman, A., Grau, Y., Jan, L., and Jan, Y. (1993). atonal is a proneural gene that directs chordotonal organ formation in the Drosophila peripheral nervous system. *Cell* **73**, 1307-1321.
- Kanatani, A., Mashiko, S., Murai, N., Sugimoto, N., Ito, J., Fukuroda, T., Fukami, T., Morin, N., McNeil, J., Van der Ploeg, L., Saga, Y., Nisimura, S., and Ihara, M. (2000). Role of Y1 receptor in the regulation of neuropeptide y-mediated feeding: comparison of wild-type, Y1 receptor-deficient, and Y5 receptor-deficient mice. *Endocrinology* **141**, 1011-1016.
- Kannan, K., Amariglio, N., Rechavi, G., Jakob-Hirsch, J., Kela, I., Kaminski, N., Getz, G., Domany, E., and Givol, D. (2001). DNA microarrays identification of primary and secondary target genes regulated by p53. *Oncogene* **20**, 2225-2234.
- Karla, S., Dube, M., Sahu, A., Phelps, C., and Karla, P. (1991). Neuropeptide Y secretion increases in the paraventricular nucleus in association with increased appetite for food. *Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 931-935.

- Kaul, A., Köster, M., Neuhaus, H., and Braun, T. (2000). Myf-5 revisited: Loss of early myotome formation does not lead to a rib phenotype in homozygous myf-5 mutant mice. *Cell* **102**, 17-19.
- Krey, L., Butler, W., and Knobil, E. (1975). Surgical disconnection of the medial basal hypothalamus and pituitary function in the rhesus monkey. I. Gonadotropin secretion. *Endocrinology* **96**, 1073-1087.
- Krieger, D., Perlow, M., Gibson, M., Davies, T., Zimmermann, E., Ferin, M., and Charlton, H. (1982). Brain grafts reverse hypogonadism of gonadotropin releasing hormone deficiency. *Nature* **298**, 1-3.
- Krude, H., Biebermann, H., Luck, W., Horn, R., Brabant, G., and Gruters, A. (1998). Severe early-onset of obesity, adrenal insufficiency and red hair pigmentation caused by POMC mutations in humans. *Nat. Genet.* **19**, 155-157.
- Kume, H., Maruyama, K., Tomita, T., Iwatsubo, T., Saido, T. C., and Obata, K. (1996). Molecular cloning of a novel basic helix-loop-helix protein from the rat brain. *Biochem Biophys Res Commun* **219**, 526-30.
- Laird, P.W., Zijderveld A., Linders K., Rudnicki M.A., Jaenisch R., Berns A. (1991). Simplified mammalian DNA isolation procedure. *Nucleic Acids Res.* **19** 4293.
- Lamelot, B., Pulichino, A., Lamonerie, T., Gauthier, Y., and Drouin, J. (2001). A pituitary cell restricted T box, Tpit activates POMC transcription in cooperation with pitx homeoproteins. *Cell* **104**, 849-859.
- Latimer, V., Rodrigues, S., and VT., G. (2000). *Mol. Brain Res.* **75**, 287-292.
- Ledent, V., and Vervoort, M. (2001). The basic Helix-loop-Helix protein family: comparative genomics and Phylogenetic analysis. *Genome research* **11**, 754-770.
- Lee, J., Cho, J., Hwang, W., Lee, Y., Reu, D., and Suh-Kim, H. (2000). Expression of NeuroD/Beta2 in mitotic and postmitotic neuronal cells during the development of nervous system. *Dev. Dyn.* **217**, 361-367.
- Lee, J. E., Hollenberg, S. M., Snider, L., Turner, D. L., Lipnick, N., and Weintraub, H. (1995). Conversion of *Xenopus* ectoderm into neurons by NeuroD, a basic helix-loop-helix protein. *Science* **268**, 836-44.
- Lee, J. E. (1997). NeuroD and neurogenesis. *Dev Neurosci* **19**, 27-32.
- Lescheid, D., Terasawa, E., and Abler, L. (1997). *Endocrinology* **138**, 5618-5629.
- Li, C., Chen, P., and Smith, S. (1999). Morphological evidence for interaction between arcuate nucleus neuropeptide Y (NPY) neurons and gonadotropin-releasing hormone neurons and the possible involvement of NPY Y1 receptors. *Endocrinology* **140**, 5382-5390.
- Liem, K., Tremmi, G., Roelink, H., and Jessel, T. (1995). Dorsal differentiation of neural plate cells induced by BMP mediated signals from epidermal ectoderm. *cell* **82**, 969-979.

- Lipkowitz, S., Gobel, V., Varterasian, M. L., Nakahara, K., Tchorz, K., and Kirsch, I. R. (1992). A comparative structural characterization of the human NSCL-1 and NSCL-2 genes. Two basic helix-loop-helix genes expressed in the developing nervous system. *J Biol Chem* **267**, 21065-71.
- Lumpkin, M., and McCann, S. (1984). *Endocrinology* **115**, 2473-2480.
- Liu ZJ., Ueda T., Miyazaki T., Tanaka N., Mine S., Tanaka Y., Taniguchi T., Yamamura H., Minami Y. (1998) A critical role for Cyclin cell cycle by cooperation with c-Myc. **18** 3445-54
- Ma, Q., Chen, Z., del Barco Barrantes, I., de la Pompa, J. L., and Anderson, D. J. (1998). neurogenin1 is essential for the determination of neuronal precursors for proximal cranial sensory ganglia. *Neuron* **20**, 469-82.
- Ma, Q., Fode, C., Guillemot, F., and Anderson, D. J. (1999). Neurogenin1 and neurogenin2 control two distinct waves of neurogenesis in developing dorsal root ganglia. *Genes Dev* **13**, 1717-28.
- Ma, Q., Kintner, C., and Anderson, D. (1996). Identification of neurogenin, a vertebrate neuronal determination gene. *Cell* **87**, 43-52.
- Mason, A., Hayflick, J., Zoeller, R., Scott, W., Phillips, H., Nikolics, K., and Seeburg, P. (1986). A deletion truncating the gonadotropin-releasing hormone gene is responsible for hypogonadism in the hpg mouse. *Science* **234**, 1366-1371.
- Massari, M., and Murre, C. (2000). Helix-loop-helix proteins: regulators of transcription in eukaryotic organisms. *Mol. cell Biol.* **20**, 429-440.
- McCann, S., Kimura, M., A., W., Karanth, S., Rettori, V., and Yu, W. (1998). Hypothalamic control of gonadotropin secretion by LHRH, FSHRF, NO, cytokines and Leptin. *Domestic Animal Endocrinology* **15**, 333-344.
- McConnell, S., and Kaznowski, C. (1991). Cell cycle dependence of laminar determination in developing neocortex. *Science* **254**, 282-285.
- McCormick, M. B., Tamimi, R. M., Snider, L., Asakura, A., Bergstrom, D., and Tapscott, S. J. (1996). NeuroD2 and neuroD3: distinct expression patterns and transcriptional activation potentials within the neuroD gene family. *Mol Cell Biol* **16**, 5792-800.
- Michaud, J. L., DeRossi, C., May, N. R., Holdener, B. C., and Fan, C. M. (2000). ARNT2 acts as the dimerization partner of SIM1 for the development of the hypothalamus. *Mech Dev* **90**, 253-61.
- Michaud, J. L., Rosenquist, T., May, N. R., and Fan, C. M. (1998). Development of neuroendocrine lineages requires the bHLH-PAS transcription factor SIM1. *Genes Dev* **12**, 3264-75.
- Mienville, J. (1999). Cajal-Retzius cell physiology: Just in time to bridge the 20th century. *Cerebral cortex* **9**, 776-782.

- Millen, K., Wurst, W., Herrup, K., and Joyner, A. (1994). Two targeted mutations in En-2 causes an embryonic defect in patterning the cerebellum. *development* **120**, 695-706.
- Miyata, T., Maeda, T., and Lee, J. E. (1999). NeuroD is required for differentiation of the granule cells in the cerebellum and hippocampus. *Genes Dev* **13**, 1647-52.
- Morrow, E. M., Furukawa, T., Lee, J. E., and Cepko, C. L. (1999a). NeuroD regulates multiple functions in the developing neural retina in rodent. *Development* **126**, 23-36.
- Morrow, E. M., Furukawa, T., Lee, J. E., and Cepko, C. L. (1999b). NeuroD regulates multiple functions in the developing neural retina in rodent. *Development* **126**, 23-36.
- Murdoch, J. N., Eddleston, J., Leblond-Bourget, N., Stanier, P., and Copp, A. J. (1999). Sequence and expression analysis of Nhlh1: a basic helix-loop-helix gene implicated in neurogenesis. *Dev Genet* **24**, 165-77.
- Murre, C., McCaw, P., and Baltimore, D. (1989a). A new DNA Binding and dimerization motif in immunoglobulin enhancer binding, daughterless, MyoD and myc proteins. *Cell* **56**, 777-783.
- Murre, C., McCaw, P., Vaessin, H., Caudy, M., Jan, L., Jan, Y., Cabrera, C., Buskin, J., Hauschka, S., and Lassar, A. (1989b). Interactions between heterologous helix-loop-helix proteins generate complexes that bind specifically to a common DNA sequence. *Cell* **58**, 537-783.
- Muscatelli F, Abrous DN, Massacrier A, Boccaccio I, Le Moal M, Cau P, Cremer H. (2000) Disruption of the mouse Necdin gene results in hypothalamic and behavioral alterations reminiscent of the human Prader-Willi syndrome. *Hum Mol Genet.* 2000 Dec 12;9(20):3101-10.
- Naya, F. J., Huang, H. P., Qiu, Y., Mutoh, H., DeMayo, F. J., Leiter, A. B., and Tsai, M. J. (1997). Diabetes, defective pancreatic morphogenesis, and abnormal enteroendocrine differentiation in BETA2/neuroD-deficient mice. *Genes Dev* **11**, 2323-34.
- Nepveu, A. (2001) Role of the multifunctional CDP/Cut/Cux homeodomain transcription factor in regulating differentiation, cell growth and development. *Gene* **270**, 1-15.
- Neuman, K., Nornes, H., and Neuman, T. (1995). Helix-loop-helix transcription factors regulate Id2 gene promoter activity. *FEBS Lett.* **374**, 279-283.
- Nishimura, A. (1990) A rapid highly efficient method for preparation of competent Escherichia coli cells. *Nucleic Acid res.* **18** 6169.
- Norton, J. (2000). ID helix-loop-helix proteins in cell growth and tumorigenesis. *J. Cell Sci.* **113**, 3897-3905.
- Ohsaka, S., Hyer, J., Panganiban, G., Oliver, I., and Caudy, M. (1994). Hairy function as a DNA-binding helix-loop-helix repressor of Drosophila sensory organ formation. *Genes Dev.* **8**, 2743-2755.

Olson, J. M., Asakura, A., Snider, L., Hawkes, R., Strand, A., Stoeck, J., Hallahan, A., Pritchard, J., and Tapscott, S. J. (2001). Neurod2 is necessary for development and survival of central nervous system neurons. *Dev Biol* **234**, 174-87.

Oltvai ZN., Milliman CL., Korsmeyer SJ. 1993 Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell* **74** (4) 609-19.

Palmitier, R., Erickson, J., Hollopeter, G., Baraban, S., and Schwartz, M. (1998). Life without neuropeptide Y. *Recent. Prog. Horm. Res.* **53**, 163-199.

Paroush, Z., Finley, R., Kidd, T., Wainwright, S., Ingham, P., Brent, R., and Horowicz, D. (1994). Groucho is required for Drosophila neurogenesis, segmentation, and sex determination and interacts directly with hairy-related bHLH proteins. *cell* **79**, 805-815.

Prabhu, S., Ignatova, A., Park, S., and Sun, X. (1997). Regulation of G1 progression of the cyclin dependent kinase inhibitor p21 by E2A and ID helix-loop-helix proteins. *Mol. Cell. Biol.* **17**, 5888-5896.

Rauber und Kobsch "Anatomie des Menschen." Band III Nervensystem und Sinnesorgane 1984 Thieme Verlag, Stuttgart.

Rezai, Z., and Yoon, C. (1972). Abnormal rate of granule cell migration in cerebellum of weaver mutant mice. *Dev. Biol.* **29**, 17-26.

Riechmann, V., Van Crüchten, I., and sablitzky, F. (1994). The expression pattern of Id4, a novel dominant negative helix-loop-helix protein, is distinct from Id1, Id2 and Id3. *Nucleic Acids research* **22**, 749-755.

Robinson, S., Dinulescu, D., and Cone, R. (2000). Genetic Models of obesity and energy balance in the mouse. *Annu. Rev. Genet.* **34**, 687-745.

Rudnicki, M., Schnegelsberg, P., Stead, R., Braun, T., Arnold, H., and Jaenisch, R. (1993). MyoD or Myf5 is required for the formation of skeletal muscle. *Cell* **75**, 1351-1359.

Rubenstein, J., and Puelles, L. (1994). Homeobox gene expression during development of the vertebrate brain. *Curr. Top. Dev. Biol.* **29**, 1-63.

Salton, R., Hahm, S., and Mizuno, T. (2000). Of mice and men: What transgenic models tell us about hypothalamic control of energy balance. *Neuron* **25**, 265-268.

Sambrook J., Fritsch EF. and Maniatis T. (1998) Molecular cloning: A laboratory manual. Cold Spring Harbor laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York

Saiki, R., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K.B., Horn, GT., Ehrlich, HA., and Arnheim, N. (1985) Enzymatic amplification of b-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* **230** 1350-1354.

Sauer, F. (1935). Mitosis in the neural tube. *J. comp. Neurol.* **62**, 377-405.

- Schaffhauser, A., Stricker-Krongrad, A., Brunner, L., Cumin, F., Gerald, C., Whitebread, L., Criscione, L., and Hofbauer, K. (1997). Inhibition of food intake by neuropeptide Y Y5 receptor antisense oligonucleotides. *Diabetes* **46**, 1792-1798.
- Schwab, M. H., Bartholomae, A., Heimrich, B., Feldmeyer, D., Druffel-Augustin, S., Goebbels, S., Naya, F. J., Zhao, S., Frotscher, M., Tsai, M. J., and Nave, K. A. (2000). Neuronal basic helix-loop-helix proteins (NEX and BETA2/Neuro D) regulate terminal granule cell differentiation in the hippocampus. *J Neurosci* **20**, 3714-24.
- Schwab, M. H., Druffel-Augustin, S., Gass, P., Jung, M., Klugmann, M., Bartholomae, A., Rossner, M. J., and Nave, K. A. (1998). Neuronal basic helix-loop-helix proteins (NEX, NeuroD, NDRF): spatiotemporal expression and targeted disruption of the NEX gene in transgenic mice. *J Neurosci* **18**, 1408-18.
- Schwanzel-Fukuda, M., Blick, D., and Pfaff, D. (1989). Luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH)-expressing cells do not migrate normally in an inherited hypogonadal (Kallmann) syndrome. *Mol. Brain. Res.* **6**, 311-326.
- Schwanzel-Fukuda, M., and Pfaff, D. (1989). Origin of luteinizing hormone-releasing hormone neurons. *Nature* **338**, 161-163.
- Schwartz, M., Woods, S., Porte, D., Seeley, R., and Baskin, D. (2000). Central nervous system control of food intake. *nature* **404**, 661-671.
- Simon, H., Saueressig, H., Wurst, W., Goulding, M., and O'Leary, D. (2001). Fate of midbrain dopaminergic neurons controlled by the engrailed genes. *Journal of Neuroscience* **21**, 3126-3134.
- Shawlot, W., and R., B. (1995). Requirement for Lim1 in head-organizer function. *Nature* **374**, 425-430.
- Skapek, S., Rhee, J., Spicer, D., and Lassar, A. (1995). Inhibition of myogenic differentiation in proliferating myoblasts by cyclin-D1-dependent kinase. *Science* **267**, 1022-1024.
- Sommer, L., Ma, Q., and Anderson, D. (1996). Neurogenins, a novel family of atonal-related bHLH transcription factors, are putative mammalian neuronal determination genes that reveal progenitor cell heterogeneity in the developing CNS and PNS. *Mol. Cell Neurosci.* **8**, 221-241.
- Spergel, D., Krüth, U., Hanley, D., Sprengel, R., and Seeburg, P. (1999). GABA and glutamate-activated channels in green fluorescent protein tagged gonadotropin-releasing hormone neurons in transgenic mice. *J. Neurosci.* **19**, 2037-2050.
- Stanly, B., and Leibowitz, S. (1984). Neuropeptide Y: stimulation of feeding and drinking by injection into the paraventricular nucleus. *Life Sci.* **35**, 2635-2642.
- Sun, X., NG., C., Jenkins, N., and Baltimore, D. (1991). Id proteins Id1 and Id2 selectively inhibit DNA binding by one class of helix-loop-helix proteins. *Mol. Cell Biol.* **11**, 5603-5611.
- Tanabe, Y., and Jessel, M. (1996). Diversity and pattern in the developing spinal cord. *Science* **274**, 1115-1118.

- Takayama S., Sato., Krajewski S., Kochel K., Irie S., Millan JA., Reed JC. (1995) Clonin and functional analysis of BAG-1: a novel BCL-2 binding protein with anti-cell death activity. **80** (2) 279-84.
- Uittenbogaard, M., Peavy, D. R., and Chiaramello, A. (1999). Expression of the bHLH gene NSCL-1 suggests a role in regulating cerebellar granule cell growth and differentiation. *J Neurosci Res* **57**, 770-81.
- Valarche, I., Tissier-Seta, j.-P., Hirsch, M.-R., Martinez, S., Goridis, C., and Brunet, J.-F. (1993) *Development* **119** 881-896.
- Van Doren, M., Bailey, A., Esnayra, J., Ede, K., and Posakony, J. (1994). Negative regulation of proneural gene activity: hairy is a direct transcriptional repressor of achaete. *Genes Dev.* **8**, 2729-2742.
- Webb, J., and Noden, D. (1993). Ectodermal placodes: Contribution to the development of the Head. *American Zoology* **33**, 434-447.
- Weinstein, D., and Hemmati-Brivanlou, A. (1999). Neural Induction. *Annu. rev. Dev. Biol.* **15**, 411-433.
- Weintraub, H. (1993). The MyoD family and myogenesis: redundancy networks, and thresholds. *Cell* **75**, 1241-1244.
- Widdowson, P., and Wilding, J. (2000). Hypothalamic neuropeptide Y and its neuroendocrine regulation by leptin. *Front. Horm. Res* **26**, 71-86.
- Wilkinson, DG. 1992. In situ hybridisation: a practical approach. IRL Press at Oxford University Press, Oxford; New York
- Wilding, J., Ajala, M., Lambert, P., and Bloom, S. (1997). Additive effects of lactation and food restriction to increase hypothalamic neuropeptide Y mRNA in rats. *J Endocrinol.* **152**, 365-369.
- Wurst, W., Auerbach, A., and Joyner, A. (1994). Multiple developmental defects in engrailed-1 mutant mice: an early mid-hindbrain deletion and patterning defects in forelimbs and sternum. *Development* **120**, 2065-2075.
- Xuan, S., Baptista, C., Balas, G., Tao, W., Soares, V., and Lai, E. (1995). Winged helix transcription factor BF-1 is essential for the development of the cerebral hemispheres. *Neuron* **14**, 1141-1152.
- Yaswen, L., Diehl, N., Brennan, M., and Hochgeschwender, U. (1999). Obesity in the mouse model of pro-opiomelanocortin deficiency responds to peripheral melanocortin. *Nat. Med.* **5**, 1066-70.
- Yen, T., Gill, A., Frigeri, L., Barsh, G., and Wolff, G. (1994). Obesity, diabetes and neoplasia in yellow A vy^{-/-} mice: ectopic expression of the agouti gene. *FASEB J.* **8**, 479-488.

Yu, W., Karanth, S., Walczewska, A., Sower, S., and McCann, M. (1997). A hypothalamic follicle-stimulating hormone-releasing decapeptide in the rat. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **94**, 9499-9503.

Zhang, J., Wie, Q., Zhao, X., and Patterson, B. (1999). Coupling of cell cycle and myogenesis through the cyclin D1-dependent interaction of MyoD with cdk4. *EMBO* **18**, 926-933.

Zheng L., Li S., Boyer TG., Lee WH. (2000) Lessons learned from BRCA1 and BRCA2. *Oncogene* **19** (53) 6159-75.

Zhou, A., and Moss, R. (1997). Effect of urine-derived compounds on cAMP accumulation in mouse vomeronasal organ. *Neuroreport* **8**, 2173-2177.

Zigmond, M., Bloom, F., Landis, S., Roberts, J., and Squire, L. (1999). "Fundamental Neuroscience." Academic Press,

6. Anhang**6.1 NSCL-2 Promotorsequenz**

CGAATTCTCCTGCATGGGGTGTGGTTGTACAGGGCAAGGGTACAGAGCCACAGGAGCAGGACATGGTGGGTG

GCTTAAGAGGACGTACCCCAAAACATGTCCCGTCCCATGTCTCGGTGCCTCGTCCTGTACCACCCAC

70

AAGGTCCAGTTTCCGTTCAGAATCTAGGTCACCTGAACCTGTCTTGTTCACTTCGTGTTGTACATGTGT

TTCCAGGTCAAAGGCAAGTCTTAGATCCAGTGGACTTGGACAGAACAAGTGAAGCACAAACATGTACACA

ACCTGCATACCCACGCATGCATGGGTGCATGCCACAGTGTGCATGGGAGGGCTAAAAGGCAATTAACCC

TGGACGTATGGGTGCGTACGTACCCACGTACGGTGTACACGTACCCTCCCGATTTTCCGTTAATTGGGG

CTCCTCTCTGTCTCTGTCTGTCTCTCTCTCTCCCTTTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCT

GAGGAGAGAGACAGAGACAGACAGAGAGAGAGAGAGAGGGAAAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAG

TCTCTGTCTCTCTCTCTCTGTATAACATATGCCTGTGTGCCATGGTGTGAGTGTGGAGTCAGA

AGAGACAGAGAGAGAGAGAGACATATGTATGTATACGGACACACGGTACCACACTCACACCTCAGTCT

AGACAACCTTCTGGAGCTGTCTTTTCCCTTCTAGAACAAGCATTGAAGGGATCCAACTCAGGTATTCAGAC

TCTGTTGAAAGACCTCGACAAAAAAGGAAGATCTTGTTGCTAACCTCCCTAGGTTGAGTCCATAAGTCTG

TTGGTGGCAAGTGCCTTTTCCATCCCCACCCTGATCCTAATCTTGTTGGCCCTGTGAGTCACTAGCTAT

AACCACCGTTCACGGAAAAGGTAGGGGGTGGGACTAGGATTAGAACAACCGGGACACTCAGTGATCGATA

GTGTTCTTGAAGAACCTACCATCTTTTCTCCCTGTCTTAGTTTCTCTATATATAAAACAGGGGCAGCAG

CACAAGAACCTTCTTGTAGTTAGAAAAGGGACAGAATCAAAGAGATATATATTTTGTCCCCGTCTGC

AGTGCATTTCTTAACTTTCTGGTTAAGAAGGGATGAGCTAATATATGCATAATCTTATGTTTATGGTTTA

TCACGTAAAGAATTGAAAAGACCAATCTTCCCTACTCGATTATATACGTATTAGAATACAAATACCAAT

630

ATGCTGAGGTAGTATTTACTATGGGTCAGCCGTTGAGCTGTGGACACACACACACACACACACACACA
+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
TACGACTCCATCATAAATGATACCCAGTCGGCAACTCGACACCTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGT

700

CACACAATCTGATGAGTGTACTTGGATATGTTAGTATTTCTATGCAATATAGTACTGAATGTGCTTATAT
+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
GTGTGTTAGACTACTCACATGAACCTATACAATCATAAAGATACGTTATATCATGACTTACACGAATATA

TTAATAACCCTATTAAGAGCATTCAATGATTTAAGTTGTTACATGTATTATTTTTTATGGCTTGTTTTG
+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
AATTATTGGGATAATTCTCGTAAGTTACTAAATTCAACAAGTGTACATAATAAAAAATACCGAACAAAAC

TTTTTAATTGTGTGTGTGCATGCATGTG
+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
AAAAATTAACACACACACGTACGTACAC

AATGCAGGTGCCCTATAGAGGTTAGAGGTGTCTCACCTCGACTGGAGTTATGGTCATTATAAGCTGCCC
+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
TTACGTCCACGGGATATCTCCAATCTCCACAGAGTGGAGCTGACCTCAATACCAGTAATATTCGACGGG

AACATGGATGCTGGGAAGGAACTCCAGTCATTTGCAAGAGAATATACTTACTCCTGACCACTGAGTCCT
+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
TTGTACCTACGACCCTTCCTTTGAGGTCAGTAAACGTTCTCTTATATGAATGAGGACTGGTGACTCAGGA

GTCTCCAGCACCTTATCTTGATCCTTTTTGGGAAAAAAGAAAGTAACATAGCAGCATGCATAGCATACT
+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
CAGAGGTCGTGGAATAGAACTAGGAAAAACCCTTTTTCTTTTCATTGTATCGTCGTACGTATCGTATGA

GCATAGCCTGTGTTCTTTATTCTCACTTTTCAGATTAGAAAGCTGGGGTCCAAAAGACTCGGTGACTCC
+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
CGTATCGGACACAAGAAATAAGAGTGAAAAGTCTAATCTTTCGACCCAGGTTTTTCTGAGCCACTGAGG

TACCAACAGAAGCTATACAGCTAGCCGGTGATGACAGAGAACCTGGCTTTTTAAAGTCACTACCTGCCACC
+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
ATGGTTGTCTTCGATATGTCGATCGGCCACTACTGTCTCTTGACCGAAAATTCAGTGATGGACGGTGG

1260

CCCTTCTTGCTTTAATGTTATTTAACAATATTCTTACACTTTAAGATATCCTAATCTGTGTGGTGATTAG
+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
GGGAAGAACGAAATTACAATAAATTGTTATAAGAATGTGAAATTCTATAGGATTAGACACACCACTAATC

1330

TGTTTTGTCAGAGATTTGTACAACCGTTGAGTGTCACAGCAAGCTTGATGACGGGAGAGAGGTGGTCACT
+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
ACAAAACAGTCTCTAAACATGTTGGCAACTCACAGTGTCGTTCGAACTACTGCCCTCTCTCCACCAGTGA

ACACACCTTCAAGAATAGAAGCCATCAAATGGAAGGCTGGGCATCTGTGAGTGGAAGTGGTTCATTACC
+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
TGTGTGGAAGTTCTTATCTTCGGTAGTTTTACCTTCCGACCCGTAGACTCACCTTCACCAAGTAATGG

AGGTTCTGGGAACCTCTGTGCACAGGAAGTTATCCTCTGTAACTTGGTGCATGTAGTGTGCAAGGTC
+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
TCCAAGGACCCTTGGAGACACGTGTCCTTCAATAGGAGACATTTGAACCACGTACATCACACAGTCCAG

AGACATGGAGGGGTTGAAGATGTAAGCTACAGACCTTTCTGAAAATACTCCAGCCTCGTGGGGAGACAG
+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
TCTGTACCTCCCCAATTCTACATTCGATGTCTGGAAAGGACTTTTATGAGGTGCGAGACCCCTCTGTC

ATATGGAACCAAGAACCATAGTGTACAATATATAGTCTCTAAGGGGGATAGGAGAAGAGGAGCCATCTG
+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
TATACCTTTGGTTCTTGGTATCACATGTTATATATCAGAGATTTCCCCTATCCTCTTCTCCTCGGTAGAC

TGCCTGGGATGTCTTAGAAATGGCAAATAGGGAGGGGGATGGGAGCTTTCCCACCAGAGAGAATGTACCT
+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
ACGGACCCTACAGAATCTTTACCGTTTATCCCTCCCCCTACCCTCGAAAGGTGGTCTCTCTTACATGGA

GTGTGGAACCCATGTTGTGTCTATAATGGCGTGTCTAAGCATAATGTGTGCGTATCTGGAATGTTTCTA
+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
CACACCTTTGGGTACAACACAGATATTACCGCACAGATTCGTATTACACACGCATAGACCTTACAAAGAT

CACAGCTTTAGTCGTGTATTAATTTATGAATATGCAGGTTGTCGATGGCCTGGCTATAAAAGCGAATTGG
+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
GTGTCGAAATCAGCACATAATTAATACTTATACGTCCAACAGCTACCGGACCGATATTTTCGCTTAACC

1890

TCTGGACTCACATGCACCATAGCAGAATCAGGCCAGCCATGGTTTGAGCATCCTCTTTCCCATCCA
+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
AGACCTGAGTGACGTGGTATCGTCTTAGTCCGGTCGGTACCAAACCTCGTAGGAGAAAGGGTAGGTTGAG

1960

CCAACACGAGGGTGACCAGGGACACGGGCCACTCCTATCCTAGCAGCTGTGCTTTCTAGAGCTCAGGTAA
+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
GGTTGTGCTCCCACTGGTCCCTGTGCCCGGTGAGGATAGGATCGTCGACACGAAAGATCTCGAGTCCATT

CAAAAGCCACCACAGTTTTTCAGTCCATCTGCCCAAGCATCTAATTGAGCCAGACAGCTTGTGTGAGCTCT
+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
GTTTTTCGGTGGTGTCAAAAGTCAGGTAGACGGTTCGTAGATTAACCTCGGTCTGTGGAACACACTCGAGA

AGATGGTGAGGAGACATGAGTATCTGAGGGTGCGCATCTGTGTGTACATCTCTGTTGTGTGTTAGTGCTT
+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
TCTACCACTCCTCTGTACTCATAGACTCCCACGCGTAGACACACATGTAGAGACAACACACAATCACGAA

AGTGTTGGCTGCTGCTAGCCAGGCTGGGAAACCTCCTCTCTCCCACATCGTCACTCCTGGCTCCCACCA
+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
TCACAACCGACGACGATCGGTCCGACCCTTTGGAAGGAGAGAGGGTGTAGCAGTGAGGACCGAGGGTGGT

GCCCTGCAGGGAAGGGGCTTCTCTGCTTGCCCATCTCTATGCTTGGGGATACCTGGGTTGAGCAGAGGTG
+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
CGGGACGTCCCTTCCCCGAAGAGACGAACGGGTAGAGATACGAACCCCTATGGACCCAACCTCGTCTCCAC

AGGCTGAGCAGCACTGGTACCATATCCCTTCTTTCCCTCTACCCTGCCTATTTTGGCCATTACCCTCC
+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
TCCGACTCGTCGTGACCATGGTATAAGGGAAGAAAGGGAGATGGGACGGATAAAACCGGGTAATGGGAGG

TGGAGCTGATGTGAACAAAGGCAAACAATATACATCACAGCCATGAGGAACCCAGAGGGCCACTCTCTAG
+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
ACCTCGACTACACTTGTTCGGTTTGTATATGTAGTGTCGGTACTCCTTGGGTCTCCCGGTGAGAGATC

GTGGGTAGCTCTACAGCCCTCCCCTGAGGACAATACCTCTTTATAGGACAAAGGTGATTATGAAGAGAAA
+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
CACCCATCGAGATGTCGGGAGGGGACTCCTGTTATGGAGAAATATCCTGTTTCCACTAATACTTCTCTTT

2520

GTGAAGTTCTCCTCTCCACAAAACTCACCTAGGAACAGGGAGACAGGAGGTTGGCTATTATTCTCTCT 2590
+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
CACTTCCAAGAGGAGAGGTGTTTTGAGTGGATCCTTGTCCCTCTGCCTCCAACCGATAATAAGAGAGA

CATTTCTCTAAGCTTAATCAATTTTAAAAAAAATAGTATTTAGGTGTGATGGTACATGCCTTTAATCC
+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
GTAAAGGAGATTCTGAATTAGTTAAAATTTTTTTTATCATAAATCCACACTACCATGTACGGAAATTAGG

CAACACATGAGAAGCAAAAACAAGCATATCTCTATGAGTTTGAGGTCAGCCTGGTCTCCATGGTGAGGGT
+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
GTTGTGACTCTTCGTTTTTGTTCGTATAGAGATACTCAAACCTCCAGTCGGACCAGAGGTACCACTCCCA

CAGGCCAGCCAGGGCTGCATAGTGAGACCTTGTCAAAAATACCAAAAAGAAAGAAAGACAGGAAGGAAGA
+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
GTCCGGTCGGTCCCACGTATCACTCTGGAACAGTTTTTATGGTTTTTCTTTCTTTCTGTCCCTCCTTCT

AAGGAGGAAGATAGACAGAAAGAAGACAGAATTACGTGGTATCACTGGCAATGTGTAAATAATAGCAAA
+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
TTCCTCCCTTCTATCTGTCTTTCTTCTGTCTTAATGCACCATAGTGACCGTTACACATTTATTATCGTTT

TAATATATAATTGATAGTGACTAACAGTAAATTTCCCTTAATTTTGTA AACACATAGATTTGGGACTGG
+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
ATTATATATTA ACTATCACTGATTGTCATTTAAAGGGAATTA AACATTTTGTGTATCTAAACCCTGACC

AGGTCATTCTTAGGCAAAGGCATTGCATGCTAGAATACTTAATATTTACATTTTAGCACAATTACATTGC
+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
TCCAGTAAGAATCCGTTTCCGTAACGTACGATCTTATGAATTATAAATGTAAATCGTGTTAATGTAACG

CACCCAGCTAAATATATCCACTCACGTGTTAGGATGGGCAAGAATAAAGTACTGTCTTTGCACATACTGT
+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
GTGGGTCGATTTATATAGGTGAGTGCACAATCCTACCCGTTCTTATTTTATGACAGAAACGTGTATGACA

GTGTCATATTTTACAGCGAATAATGAACATGAGTAAATGGGTAAAGAAAAAGAAAACCA AACATAACTCA 3150
+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
CACAGTATAAATGTCGCTTATTACTTGTACTCATTTACCCATTTCTTTTTCTTTTGGTTTTGTATTGAGT

AAAAGTAGAATTATCTAGTGGTCTCTAACTACTTGGATTCTGCTCCTAATTCCACCAATGATTTAAACTA
 +-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 TTTTCATCTTAATAGATCACCAGAGATTGATGAACCTAAGACGAGGATTAAGGTGGTTACTAAATTTGAT 3220

ATGTGTCAAACGTCCTTTAAATATCATCTATTAATAAGCTGGTCTCATAGTAGAACNCTTTCTCCAAAA
 +-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 TACACAGTTTGCAGGAAATTTATAGTAGATAATTATTCGACCAGAGTATCATCTTNGAAAGAGGTTTT

CATCCATATGCTTAAATAATCATGATTAAAGCATCCTCTAAAAGACACTTCACTTTACATAAATGTTAGC
 +-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 GTAGGTATACGAATTTATTAGTACTAATTTCTGAGGAGATTTTCTGTGAAGTGAAATGTATTTACAATCG

ATTGCCTGTCTGGATCGTTCACCTTAATTACAGTGCATAGACAGAATATGCTTTCATGTG CCCAGCACA
 +-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 TAACGGACAGACCTAGCAAGTGAATTAATGTCACAGTATCTGTCTTATACGAAAGTACACGGGTCGTGT

Oct-1
ACTAT TTTTCTAACTA ATTGATTTAAAAAATGCTGGCTCACAAAATGCCAGAGGAATTTCCATGTTT
 +-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 TGATAAAAAGATTGATAACTAAATTTTTTTACGACCGAGTGTTCACGGTCTCCTTAAAAGGTACAAGTA

ATAGTGTCTACTTGCACCTTAAATATTGCATCAATAATCTGAAAACA AGGAACCGCT GTGTGGCCAGACG
 +-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 TATCACAGATGAACGTGAATTTATAACGTAGTTATTAGACTTTTGTTCCTTGGCGGACACACCGGTCTGC

GATA-1 c-Fos Gata-1 NF-1
CTGTAGATGCTATGGCTTCTATCATGGGCTGC TTTCAACTG CTATATTTT ATGGCACAGAT TCAGTGGGA
 +-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 GACATCTACGATACCGAAGATAGTACCCGACGAAAGTTGACGATATAAAATACCGTGTCTAAGTCACCT

OCT-1 SP-1
ATCTGATCTGCTAAAATATT TGGGCTGTG AAAACCTCCAC ACTGTGACAGATGTCAAGTCCAATTAAGTG
 +-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 TAGACTAGACGATTTTATAAACCCGACACTTTTGGGGTGTGACACTGTCTACAGTTCAGGTTAATTCAC

STAT-3 STAT-3 SP-1
ACTCGTGTCCAGGT TTCTGTCCAA TAGGA TTTCCATTAA ATATCAATTTAGGGGAAAAAA ATTCCATCC
 +-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 TGAGCACAGGTCCAAAGACAGGTTATCCTAAAGGGTAATTTATAGTTAAATCCCCCTTTTTTAAGGTAGG 3780

GATA-1 SP-1 AP-2
 CCCTTCTTAAG CCTTTATCTCT TCCACCG GGATCACCT CCAGGC TAAATCAATTGGTACCAGAAGAGCC 3850
 GGAAGAATTCGGAATAGAGAAGGTGGCCCTAGGTGGAGGTCCGATTTAGTTAACCATGGTCTTCTCGG

 AAGAAGCCACACAGGCAGCTGCCTCTCCTCTCTGGCTCTCCAAGCTCCCCTTTCTCTGCTTCCCTTAC
 TTCTTCGGTGTGTCCGTCGACGGAGAGGAGAGACCGAGAGGGTTCGAGGGGAAAGAGACGAAGGGAAGTG

 TGTTACTCCAGAAGACGTCCACTTCTCTCCAATCTCTCTCCAGCATCTCCAAGCTACTGACTATATACAT
 ACAATGAGGTCTTCTGCAGGTGAAGAGAGGTTAGAGAGAGGTCTGATGAGGTTTCGATGACTGATATATGTA

 191
 ← Intron →
 TTCACCACAGGTAAAGAGGGGAGGGAGTGGGGTAGGGGTGTAACCAAACCTTGAANGACTTTGA
 AAGTGGTGTCCATTTCTCCCCTCCCTCACCCATCCCATCCCCACATTGGTTTGGAACTTCTGAACT

 ANCTGCAAAATTGGCGTCTGCTTATNCAACATAGAAGTAGATGAGGGACAAGACAGAGGCAACCTTAAGC
 TNGACGTTTTAAACGCAGACGAATANGTTGTATCTTCATCTACTCCCTGTTCTGTCTCCGTTGGAATTCG

 CCTAGTTACTGTATTGTTGTTCCCTGGGAACTGGGGAGACACCAGCTGAACAAAGCATTATCTTGAAGAAG
 GGATCAATGACATAACAACAAGGACCCTTGACCCCTCTGTGGTCGACTTGTTTCGTAATAGAACTTCTTC

 AAGAGAAAAATCACTTCTGAGCCCCTCCATCCCTGACCGCACTTCCCAGTTTCGCCCCAGCCGATTAA
 TTCTCTTTTTAGTGAAGACTCGGGGAAGGTAGGGACTGGCGTGAAGGGTCAAAGCGGGTCTGGGCTAATT

 GGAAGGGAAGGAGTCTCAAGGAATGGAATTTTATCTTAACCATCTTTCTTATTGATTATTCTGCTATT
 CCTTCCCTTCTCAGGAGTTCCTTACCTTAAAATAGAATTGGTAGAAAGAATAACTAATAAGACGATAA

 AGAAAGNGNAGGAATCCNCCCCTTGATGTGATTGTTTTTATCTCACCATCTCTTTTGTATTATTTATACAC 4410
 TCTTTCNCNTCCTTAGNGGGGAACTACACTAACAAAAATAGAGTGGTAGAGAAAACAATAAATATGTG

192
 Ex 1b
 AGCCCTTTGAGTGGGGAGGCGTGAGGTTTCAACACTTCGACTTATAAAGATCAACAACGAATTTTCCTGA 4480
 TCGGGAAACTCACCCCTCCGCACTCCAAAGTTGTGAAGCTGAATATTTCTAGTTGTTGCTTAAAAGGACT

AATGTTTAAGAACAGTTAAAAACAAACCAACAAACAACTTTCAATCCATCAACTAAGTGAACAACCATA
 TTACAAATTCTTGTCAATTTTTGTTTGGTTGTTTGTGAAAGTTAGGTAGTTGATTCACCTGTTGGTAT

CACCCGCTAAAACGGGCGTAGACACCGCCGCTCGTTGTGGTGGTCGGCGAGATGACAGCTGCTTTTTCAT
 GTGGGCGATTTTGCCTGCATCTGTGGCGGCGAGCAACACCACCAGCCGCTCTACTGTCGACGAAAAAGTA

CTGCGAATGTAATAAATATTGGCTGCTTTTAATATTTGCCAGGATCTCTCCTCCTTGTTCCTGGAATTT
 GACGCTTACATTATTTATAACCGACGAAAATTATAAACGGTCCTAGAGAGGAGGAACAAAGGACCTTAAA

516
 Intron
 TAACTAAAAGATTGACGAAAAGATTATCGACAGGGCTCTTGCAAGGTAAGACATCTTCACGTCTCTTT
 ATTGTGATTTTCTAACTGCTTTTCTAATAGCTGTCCCGAGAACGTTCCATTCTGTAGAAGTGCAGAGAAA

TTCTTTAGATTAAGTTGAGTCATATTGTATTTTATAGATGTATTCCTCACACATGGTCATAGACTTAAAT
 AAGAAATCTAATCAACTCAGTATAACATAAAAATATCTACATAAGGAGTGTGTACCAGTATCTGAATTTA

GCCCACGAAAAATACCATTTATGACTATTTAAATATCTGGAGATTTAAACGCGTGGGGGACAGCCCGG
 CGGGTGCTTTTATGGTAAATACTGATAAATTTATAGACCTCCTAAATTTGCGCACCCCCCTGTCGGGCC

GAACTTTTTGTCCGATCTGTAACATATGTCGTGGTTTGCTATGATTTTTCTCCTGTGTATTTCTACCTCT
 CTTGAAAAACAGGCTAGACATTGATACAGCACCAACGATACTAAAAAGAGGGACACATAAAGATGGAGA

TCACGCCAACTGCGTAGGTGTGAGTTGTTTCACTTATAAACGTAGAGAAAAGCCTGGGGGGCGGGGGGAG 5040
 AGTGCGGTTGACGCATCCCACTCAACAAAGTGAATATTTGCATCTTTTTCGGACCCCCCGCCCCCTC

CAGCATGCAGTTCGTTTGGTTCATTTATTGTTATTCTGAGGATCCGTTTTCTTGCACGGAAAGCTGTTT
+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
GTCGTACGTCAAGCAAACCAAGTAAATAACAATAAGACTCCTAGGCAAAGGAACGTGCCTTTTCGACAAA

5110

CTGAGCTCAGGTCTCTCTGGGCAAATTCGAGGCCAGGAGCCGAACCTACATCCCCTCCCTGGCTTTTGT
+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
GACTCGAGTCCAGAGAGGACCCGTTTAAGCTCCGGTCTCGGCTTGATGTAGGGGAGGGACCGAAAACA

TTCTCTGAAGCGAGGCTTTACTCAGGAGCCTTGCTGTGAGGGGCAAGGCGGGGTACAGNGGTCATAGC
+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
AAGAGACTTCGCTCCGAGAATGAGTCCTCGAACGGACACTCCCCGTTCCGCCCCATGTCNCCAGTATCG

CCGGTCGTCCCTCCTGGTGGCGGAGGCCAAAAGCTCAGCTCAGGCAGGTTTCTATCCCCATCTGCCAC
+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
GGCCAGCAGGGAGGACCACCGCCTCCGGGTTTTTCGAGTCGAGTCCGTCAAAGATAGGGGTAGACGGGTG

CCAGATACCCGCAAGCCCAGTGGTTCTCGAAGACGCGAAGGCCCTCGAGCTGCCGGCCCCGAGGTGGCTT
+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
GGTCTAGTGGGCGTTCGGGTACCAAGAGCTTCTGCGCTTCCGGGAGCTCGACGGCCGGGCTCCACCGAA

TTCCAGGAGGGCATCGTCTGGGAAAGCCCGGCGCAGACACGGGGCCGCGGCCAGGCCTCCCTGGGCCGC
+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
AAGTCTCCTCCGTAGCAGACCCCTTTCGGGCCGCTCTGTGCCCCGGCGCCGGTCCGGAGGGACCCGGCG

CGGTGGGCTGCGGGGCTCCGGTCCCCTAAGCTCACGAACTTACCCGCACAGATACAGCTTGCGCCCGG
+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
GCCACCCGACGCCCCGAGGCCAGGGGATTGAGTGCTTGAAGTGGGCGTGTCTATGTCGAACGCGGGCCC

GCGTCCCGCACTGGTGCCTCGGAGTCCATCCCTCTCTGGCCCTCCCAGCCCCTTCGCCCCGAGCGACCT
+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
CGCAGGGCGTGACCACGGAGCCTCAGGTAGGGAGAGACCGGGAGGGGTCGGGGAAGCGGGCGTCGCTGGA

5600

GCCGCTGCGTTTTCCCGGGAGGTAGTCGGCAGACTGCCGGCATTGTGTGATCCACGTNCCTAGGTCCCCA
+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
CGGCGACGCAAAGGGCCCTCCATCAGCCGTCTGACGGCCGTAACACACTAGGTGCANGGATCCAGGGGT

5670

ATGTGTGTGGCAGTCTGCGTGACAGATGGTGCTTCCGGGAGAAGTATGCAAANTTNCCGGGNCATTGTGT
+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
TACACACACCGTCAGACGCACTGTCTACCACGAAGGCCCTCTTCATACGTTTNAANGGCCNGTAACACA

TAATCCACGGTCCCTTAGGTCCCCAAATGTGTGGGGCAAGTNTGGGTGACAAATGGTGCTCCGGGAAAAG
+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
ATTAGGTGCCAGGAATCCAGGGGTTTACACACCCCGTTCCANACCCACTGTTTACCACGAGGCCCTTTTC

TATAAGGCCCAAGGAGTCAATTTTTTTTTGAAAGGACNGAACACATGTGTTCCGGTCATTTCTTTATTATT
+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
ATATTCCGGGTTCTCAGTTAAAAAAAACCTTCTGNCTTGTGTACACAAGCCAGTAAAGAAATAATAA

TCGNAGAAACGCGGGGAAGGGACGGGCAAGAAAGCCTTCCCGGGCCTAGGTTCCAGATGGGGTTCGCCCC
+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
AGCNTCTTTGCGCCCCTTCCCTGCCCGTTCTTTCCGAAGGGCCCCGGATCCAAGGTCTACCCCAAGCGGGC

CACCCAGCGTAGCCAGACCCTCAGGCGCTGGGAGTCTCCAGCTTGCCTTGCCCTAGGCCCTCGGGTGG
+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
GTGGGTGCGATCGGGTCTGGGAGTCCGCGACCCTCAGAGGTCGAACGGAACGGGATCCGGGAGCCACC

GAAGCACACTCTGCATCTCATTAAAACCCAGATGCATCCATCCTTCGGGCATCCATCCCTTCGGGATCT
+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
CTTCGTGTGAGACGTAGAGGTAATTTGGGTCTACGTAGGTAGGAAGCCCCTAGGTAGGAAGCCCTAGA

TTCCTGTGTCTGGGAAGGGAACGGAGCAAGGGAGGCGGGAGAGAGCAGCTGATGTCTGGCCAGAGGAGAC
+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
AAGGACACAGACCCTTCCCTTGCTCGTTCCCTCCGCCCTCTCTCGTCGACTACAGACCGGTCTCCTCTG

TCAAGATGTCAGCCGGCCCCAGAGGTCCACGGTTCTTCAGCCCCAGCGCCACTGGCCGCTCTGGCAGTCT
+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
AGTTCTACAGTCGGCCGGGTCTCCAGGTGCCAAGAAGTCGGGGTCGCGGTGACCGGCGAGACCGTCTCAGA

6230

TCTGTGTGGGTTTCAGAATGCGCTTTGATACCCGCTCCTTGCCTCCCCACTTGCCTGGGCCTGAAACGAGG 6300
 AGACACACCCAAGTCTTACGCGAAACTATGGGCGAGGAACGGAGGGGTGAACGCACCCGGACTTTGCTCC

AGAGGACCAGTGTCCCCAGGTCCCCTCCTAGAAGTCCAGTTTGTAGGCCCTCGCCACTACTCCTTGCA
 TCTCCTGGTCACAGGGGTCCAGGGGAGGATCTTCAGTCCAAACGATCCGGGAGCGGTGATGAGGAACGT

AATCAAGAACCAGATTCCTTTTATTAAGTCTGACTTTCTGACTCCCCA⁵¹⁷ATGCCTCAAAT^{Start}GATGCTGAGTCCG
 TTAGTTCTTGGTCTAAGGAAAATAATTGACTGAAAGACTGAGGGGTACGGAGTTTTACTACGACTCAGGC

GACCAAGCCGCCGACTCAGATCACCCAGCTCGACGCACTCGGACCCGGAGTCTCTGGGCGGCGCAGACA
 CTGGTTCGGCGGCTGAGTCTAGTGGGGTTCGAGCTGCGTGAGCCTGGGCCTCAGAGACCCGCCGCTGT

CCAAGTTCTGGGCGAGCGTGTCCGACCTAGAGCCAGTGGAGGAGGCGGACGGCGACGGCAAGGGCGGCAG
 GGTTCGAAGACCCGTCGCACAGCCTGGATCTCGTCCACTCCTCCGCCTGCCGCTGCCGTTCCCGCCGTC

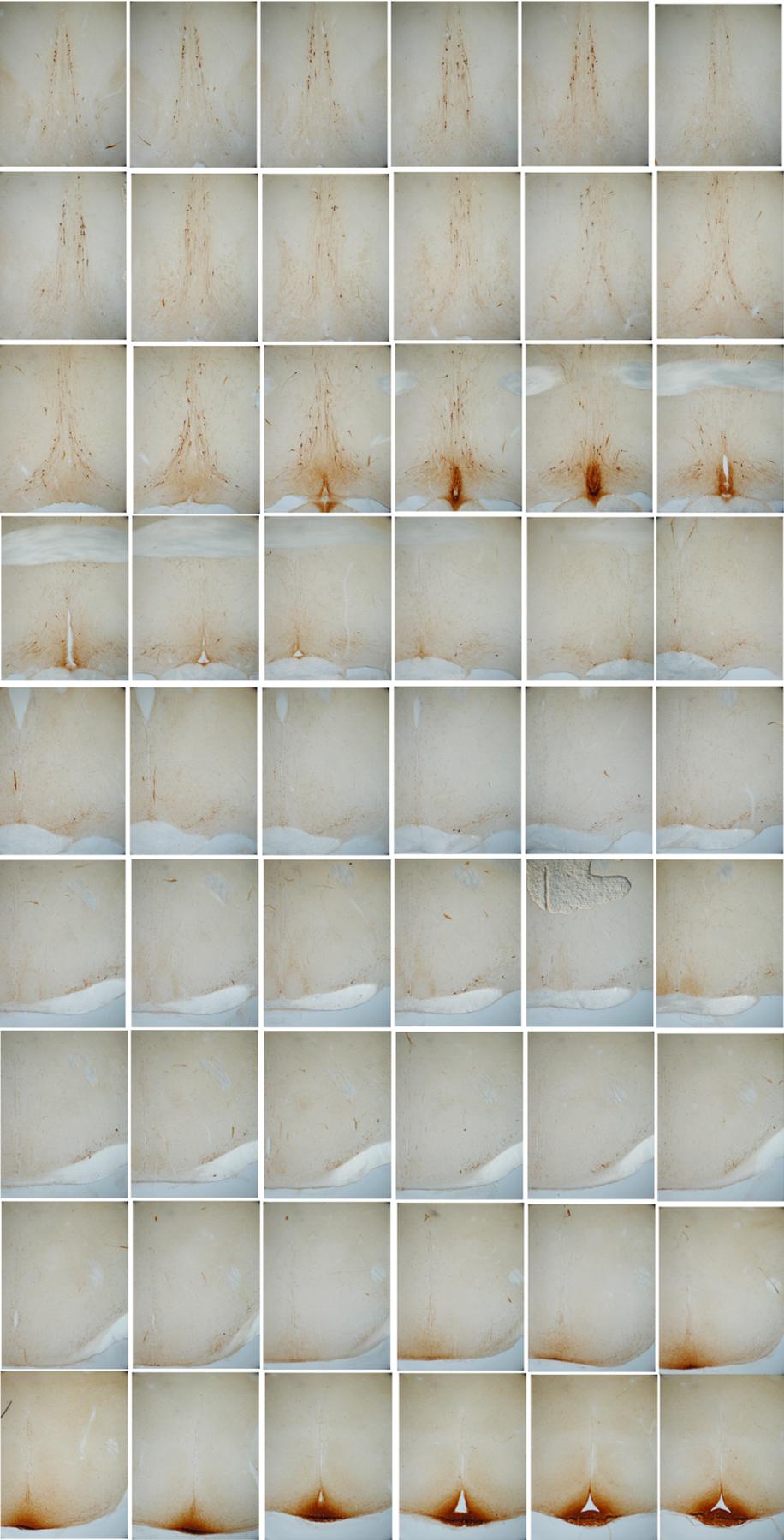
CCGGGCCGTGCTCTACCCGCACCCGCAGCAGCTGAGCCGCGAAGAAAAGCGCCGCCGCCGCGCGC 6644
 GGCCCGGCACGAGATGGGCGTGGGCGTCGTCGACTCGGCGCTTCTTTTCGCGGCGGCGGCCGCG

Die DNA-Bindungsstellen wurden mit Hilfe des TRANSFAC 5.0 Programm identifiziert. Das Programm ist unter der Internet Seite der Gesellschaft für Biotechnologische Forschung www.gbf.de zu finden.

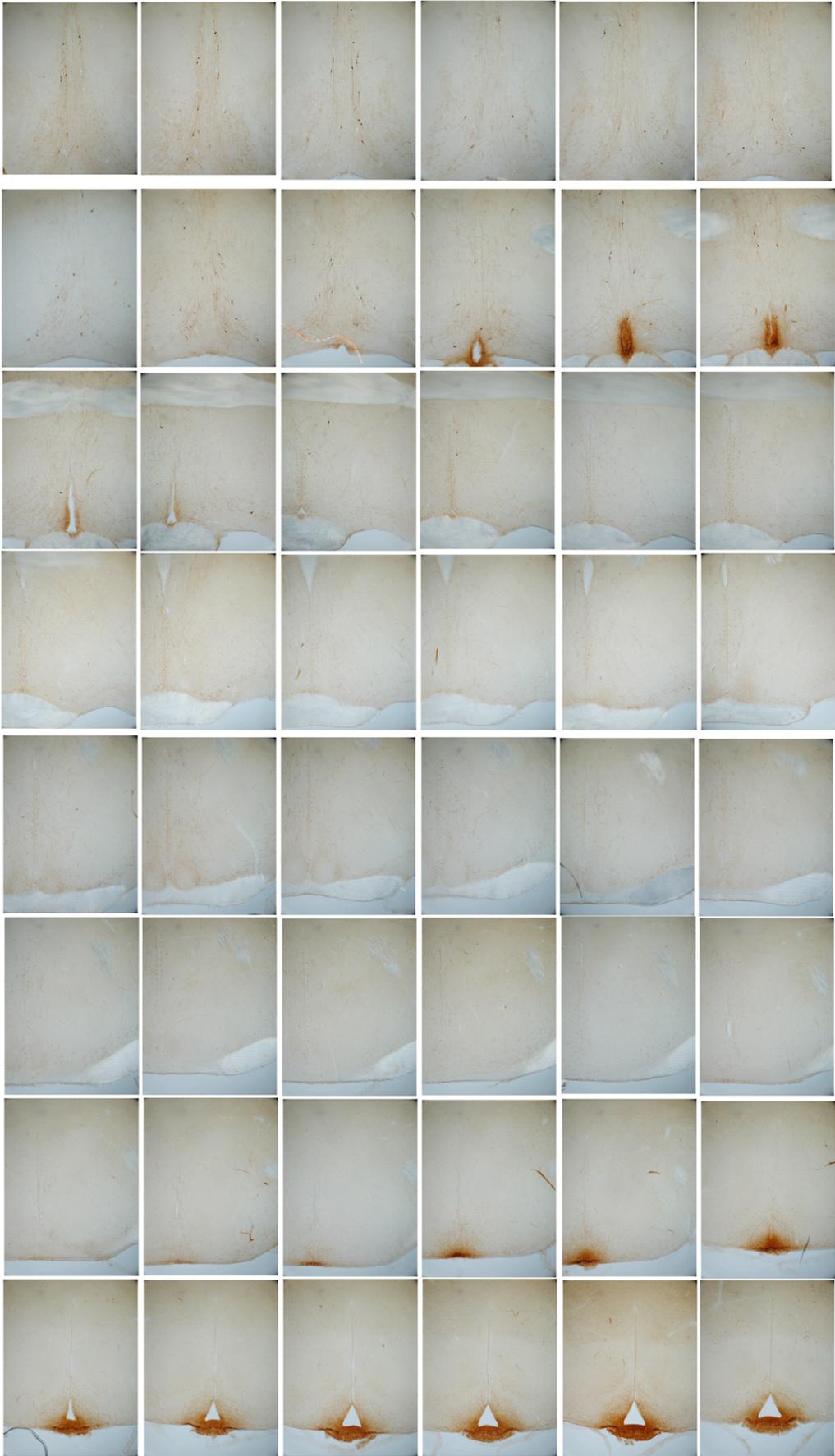
6.2 Tafeln verschiedener Antikörperanfärbungen.

- GnRH Antikörper Tafel (LR-1) Wildtyp (S. 169)
- GnRH Antikörper Tafel (LR-1) NSCL-2 -/- (S.170)
- NPY Y1 Rezeptor Antikörper (S.171)
- ACTH Antikörper (S.172)
- NPY Antikörper (S.173)

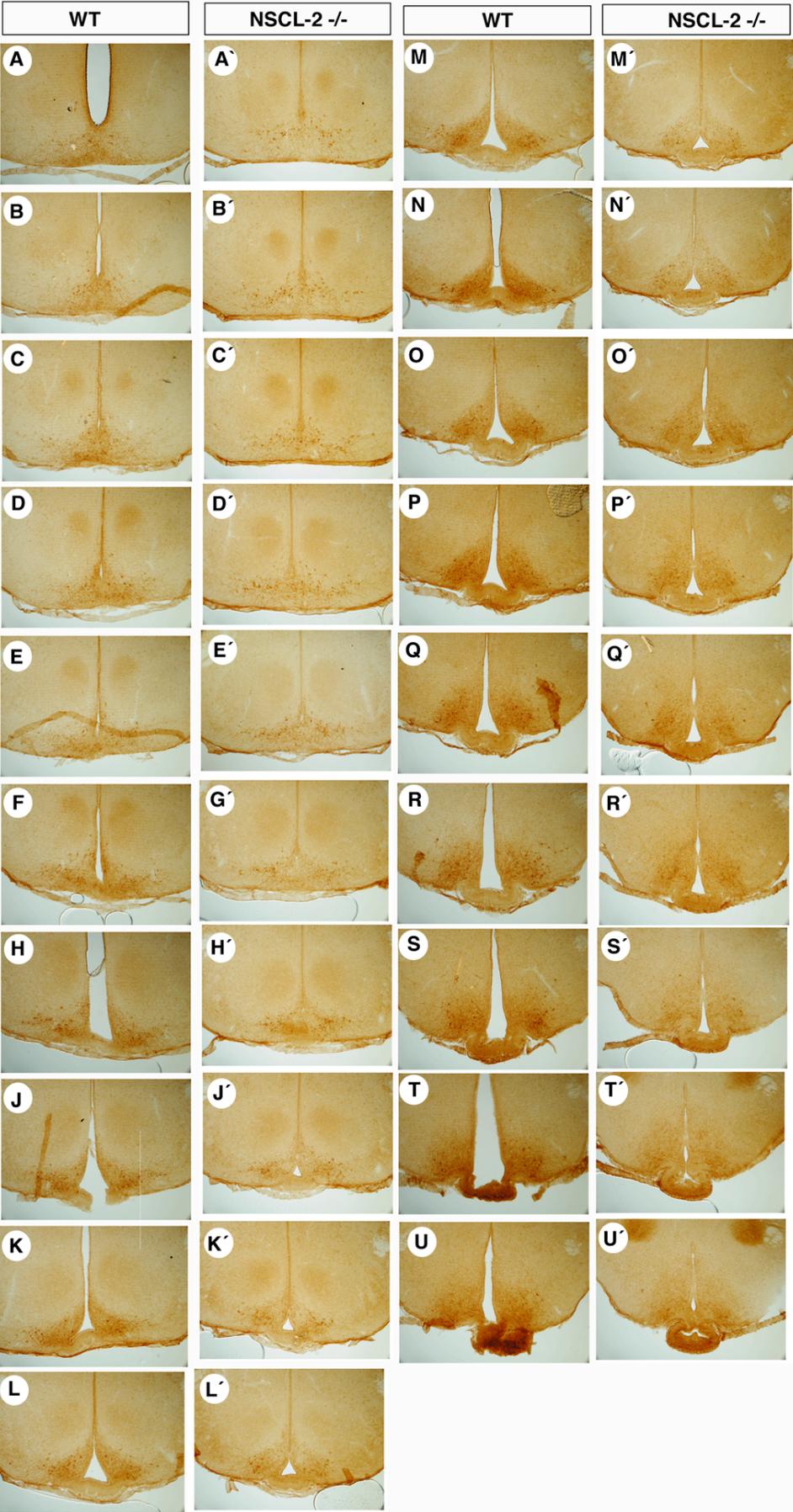
LR-1 Antikörperanfärbung mit adulten WT Gehirn , Schnittdicke 50µm

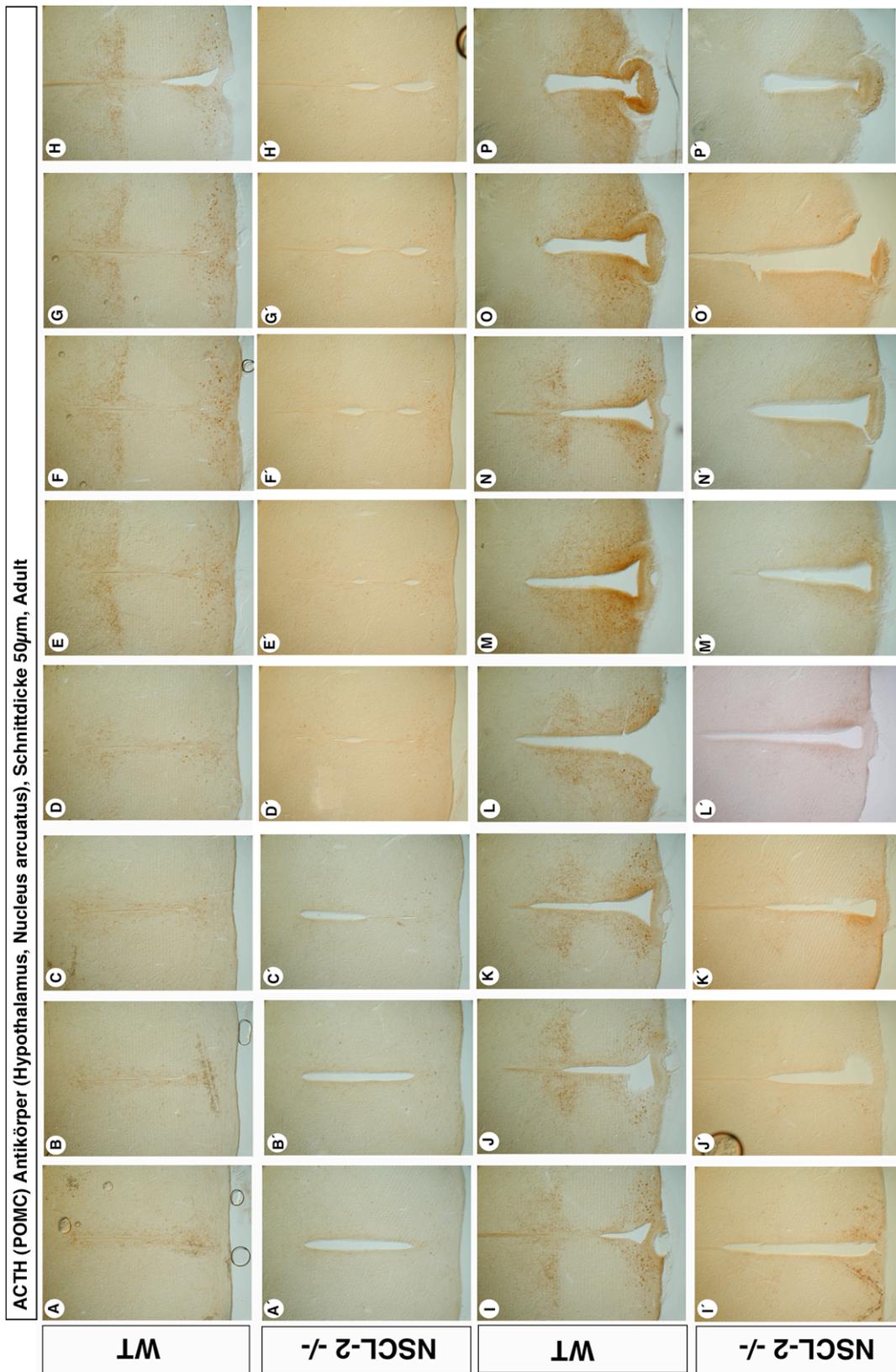


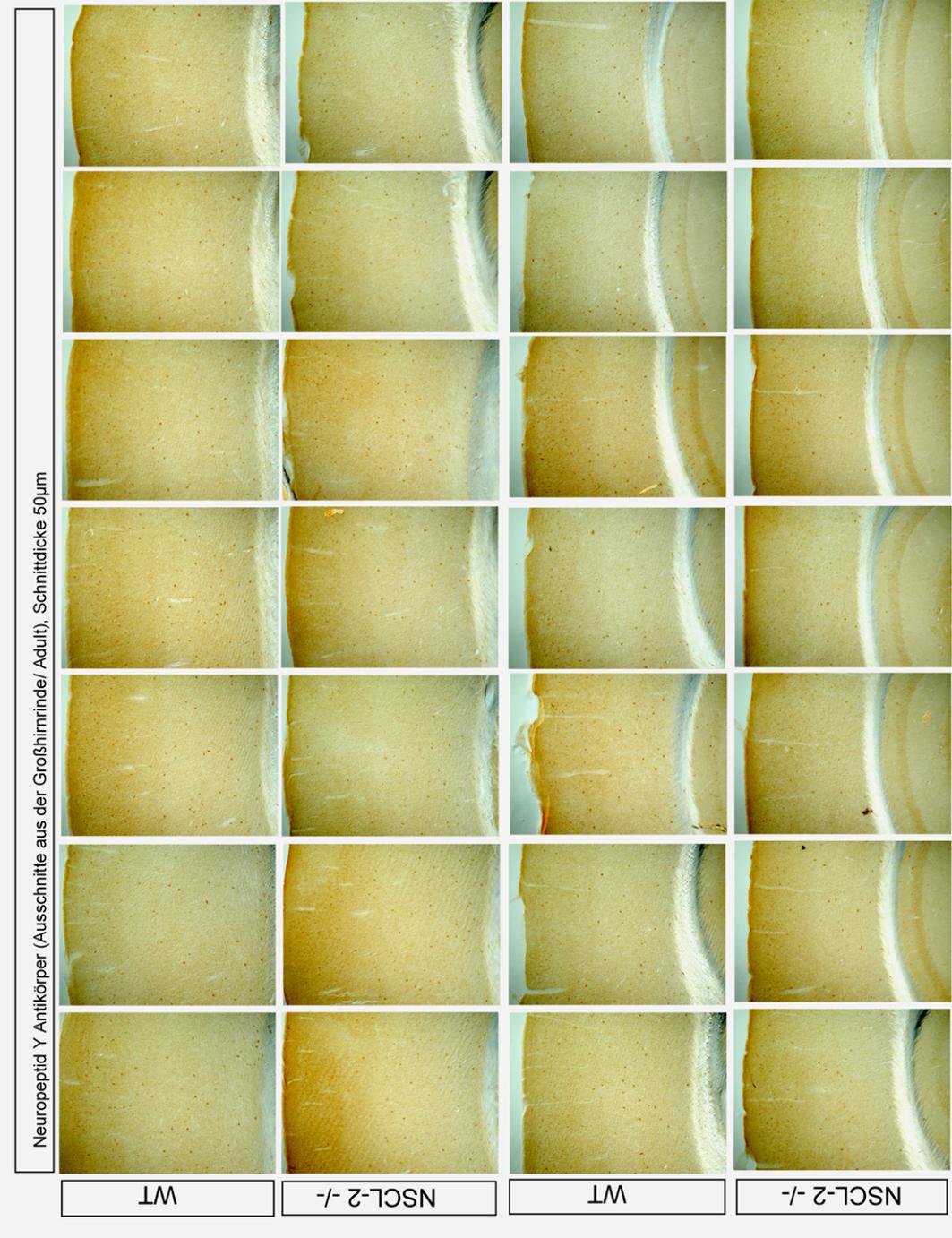
LR-1 Antikörperanfärbung mit adulten NSCL-2 -/- Gehirn, Schnittdicke 50µm



Neuropeptid Y Y1 Rezeptor (Hypothalamus (Nucleus arcuatus) Schnittdicke 50µm, Adult







6.3 Abkürzungen

A	Adenin
Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
bp	Basenpaare
bHLH	basic Helix-Loop-Helix
BSA	bovine serum albumine
C	Cytosin
°C	Grad Celsius
cDNA	zur RNA komplementäre DNA
Dig	Digoxenin
E	Embryonaltag
ETOH	Ethanol
G	Guanin
h	Stunde
ires	internal ribosomal entry site
kbp	Kilobasenpaare
LacZ	β-Galaktosidase
Lsg.	Lösung
neo	Neomycin
min.	Minute
mRNA	Messenger Ribonukleinsäure
P	Signifikanzniveau (Sicherheitsschwelle) des Student-t Test
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PFA	Paraformaldehyd
PGK	Phosphoglucokinase
RT	Raumtemperatur
RT	Reverse Transkriptase
T	Thymin
ü.N.	über Nacht
WT	Wildtyp
μm	1*10 ⁻⁶ M
X-gal	5-Brom-4-chlor-3-indolyl-β-D-galactosid

Abkürzungen verschiedener Kerngebiete im Gehirn. Die Abkürzungen in den jeweiligen Abbildungen wurden aus dem englischen Sprachgebrauch übernommen.

Abk.	deutsch	englisch
ac	Commissura anterior	anterior commissur
ARC	Nucleus arcuatus	arcuatus Nucleus
AHN	Nucleus anterior hypothalami	anterior hypothalamic nucleus
DM	Nucleus dorsomedialis hypothalami	dorsomedial nucleus
HDB	horizontaler „Nucleus of the diagonal Band of Broca“	horizontal „Nucleus of the diagonal Band of Broca“
LA	Nucleus latero-anterior hypothalami	lateroanterior hypothalamic nucleus
LHA	laterales hypothalamisches Gebiet	lateral hypothalamic area
MPO	Nucleus medialis präopticus	medial preoptic nucleus
ME	Eminencia medialis	median eminence
LS	Nucleus lateralis septalis	lateral septal nucleus
MS	Nucleus medialis präopticus	medial septal nucleus
oc	chiasma opticus	optic chiasma
on	Nervus opticus	optic nerv
VDB	vertikaler „Nucleus of the diagonal Band of Broca“	vertical „Nucleus of the diagonal Band of Broca“
PVN	Nucleus paraventricularis	paraventricular nucleus
PP	Nucleus periventricularis	periventricular nucleus
SCh	Nucleus suprachiasmaticus	supraoptic chiasma nucleus

6.4 Curriculum vitae

Name : Marcus Krüger

Geburtsdatum : 27.09.70

Geburtsort : Braunschweig

Eltern : Klaus und Rosemarie Krüger

Familienstand : ledig

1977-1981 : Grundschule Ilmenastr.

1981-1990 : Wilhelm Bracke Gesamtschule

1990 : Abitur

1990-1991 : Grundwehrdienst

1991-1998 : Studium der Chemie (Diplom)

1997-1998 : Diplomarbeit bei Dr. Thomas Braun, Institut für Biochemie und Biotechnologie an der Technischen Universität Carolo-Wilhemina zu Braunschweig zum Thema: *Molekulare Klonierung, funktionelle Analyse und Charakterisierung des embryonalen Expressionsmusters neuronaler bHLH Gene.*

ab 1998 : Anfertigung der vorliegenden Doktorarbeit bei Prof.Dr. Braun an der TU Braunschweig.

seit 1999 : Wechsel an die Medizinische Fakultät der Martin-Luther Universität Halle-Wittenberg nach der Berufung von Prof. Dr. Thomas Braun an das Institut für Physiologische Chemie.

6.5 Tagungsbeiträge und Publikationen

- 22.03.1999 – 25.03.1999 Poster „ Two neuronal bHLH transcription factors NSCL-1 and NSCL-2 are widely expressed during early neurogenesis and control the differentiation of a subset of neurons involved in the formation of hypothalamic-pituitary axis.
13.Tagung für Entwicklungsbiologie GfE in Freiburg
- 19.06.1999 – 25.03.1999 Poster „ Two neuronal bHLH transcription factors NSCL-1 and NSCL-2 are widely expressed during early neurogenesis and control the differentiation of a subset of neurons involved in the formation of hypothalamic-pituitary axis.
The 1999 European Developmental Biology Conference, Oslo Norwegen.
- 30.08.2000 – 03.09.2000 Poster: Two neuronal bHLH transcription factors NSCL-1 and NSCL-2 are widely expressed during neurogenesis and are involved in the differentiation of specific subsets of neurons.
Cold Spring Harbor meeting on Mouse Molecular Genetics, New York
- Publikationen:
- 2001 Krüger M., Mennerich D., Fees S., Schäfer R., Mundlos S., and Braun T. (2001) Sonic hedgehog is a survival factor for hypaxial muscles during mouse development. *Development* **128**, 743-752
- 2001 Adamska M., Herbrand H., Adamski M., Krüger M., Braun T., and Bober E. (2001) FGFs control the patterning of inner ear but are not able to induce the inner ear program. *Mech Dev.* **109** (2) 303-313.
- 2002 Krüger M. and Braun T. (2002) The neuronal basic Helix-Loop-Helix transcription factor is dispensable for normal neuronal development. *Mol Cell Biol.* **22** (3) 792-800
- 2002 (eingereicht) Krüger M., Schäfer K., and Braun T. (2002) The homeobox containing gene Lbx-1 is required for correct dorso-ventral patterning of the neural tube *J. Neurochem.*

6.5 Zusammenfassung

Transkriptionsfaktoren aus der Familie der basischen Helix-Loop-Helix (bHLH) Proteine sind in einer Reihe von Geweben an der Regulation zellulärer Determinierungs- und Differenzierungsprozesse beteiligt. Ein Großteil der bisher isolierten neuronalen bHLH Gene weist eine Verwandtschaft zu den proneuralen *Drosophila* Genen *atonal* und *achaete-scute* auf. Die neuronalen bHLH Transkriptionsfaktoren NSCL-1 und NSCL-2 (neural stem cell leukemia) wurden dagegen mit Hilfe des in hämatopoetischen Stammzellen exprimierten bHLH Gens SCL-1 isoliert. Zusammen mit weiteren bHLH Genen wie NeuroD und Nex-1 bilden NSCL-1 und NSCL-2 eine Gruppe potentieller neuronaler Differenzierungsfaktoren. Die Analyse des Expressionsmusters von NSCL-1 und NSCL-2 ergab eine breite Expression in verschiedenen Bereichen des ZNS und PNS während embryonaler und früher postnataler Entwicklungsstadien.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Mauslinien mit einer Nullmutation des NSCL-1 und NSCL-2 Gens hergestellt. NSCL-2 defiziente Mausmutanten zeigten einen hypogonadalen Hypogonadismus und eine deutliche Zunahme des Körpergewichts nach der Pubertät. Ein wichtiger Faktor für die Steuerung der Reproduktivität bei Säugetieren ist das Gonadotropin-Releasing Hormon (GnRH). Die Analyse GnRH positiver Neurone ergab eine deutliche Reduktion der Anzahl dieser Neurone während peri- und postnataler Stadien in NSCL-2 defizienten Mutanten. Weiterhin konnte gezeigt werden, daß gewichtsregulierende Faktoren wie der NPY Y1 Rezeptor und POMC (ACTH) in NSCL-2 mutanten Mäusen reduziert sind. Die Lokalisierung von NSCL-2/LacZ Signalen in GnRH positiven Neuronen ergab Hinweise auf eine mögliche zellautonome Beteiligung von NSCL-2 bei der Differenzierung von GnRH positiven Neuronen.

NSCL-1 Nullmutanten waren phänotypisch unauffällig. Die Analyse verschiedener Bereiche des ZNS und PNS zeigte keine signifikanten Differenzierungsstörungen in NSCL-1 defizienten Mutanten. Es ist anzunehmen, daß andere regulatorische Gene, wie das nahe verwandte NSCL-2 Gen oder weitere neuronale bHLH-Gene für den Funktionsausfall von NSCL-1 kompensieren.

Um derartige kompensatorische Prozesse zu untersuchen, wurden NSCL-1xNSCL-2 doppelt mutante Mäuse generiert. Doppelt homozygote Mutanten sterben kurz nach der Geburt und zeigten keine wesentlichen Malformationen von ZNS-Strukturen. Die Analyse des olfaktorischen Neuroepithels deckte dagegen eine Störung terminaler Differenzierungsvorgänge auf. Weiterhin konnte eine Reduktion mitotisch aktiver Zellen im Kortex doppelt homozygoter Mutanten beobachtet werden. Die Analyse von DNA Arrays deutete auf eine mögliche Dysregulation verschiedener Zellzyklus und Apoptose Gene in NSCL-1xNSCL-2 Doppelmutanten hin.

