

Institut für Entwicklungsgenetik  
GSF-Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit

Institut für Molekulare Neurogenetik  
Max-Planck-Institut für Psychiatrie

## **Die molekulare und funktionelle Analyse des Gens *mPet-1* während der Entwicklung serotonerger Neuronen**

**Harald Pfaar**

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan  
für Ernährung, Landnutzung und Umwelt der Technischen Universität München  
zur Erlangung des akademischen Grades eines

### **Doktors der Naturwissenschaften**

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. Erwin Grill

Prüfer der Dissertation: 1. Univ.-Prof. Dr. Wolfgang Wurst  
2. Univ.-Prof. Angelika Schnieke, Ph.D  
(Univ. of Edinburgh/UK)

Die Dissertation wurde am 25.10.2004 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt am 17.01.2005 angenommen.

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>1</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>1</b>
<hr/>		
<b>2</b>	<b>EINLEITUNG</b>	<b>3</b>
<hr/>		
2.1	SEROTONIN: ENTDECKUNG, VORKOMMEN UND FUNKTION	3
2.2	DIE SEROTONIN NEUROCHEMIE: SYNTHESE, FREISETZUNG, WIEDERAUFNAHME UND ABBAU	4
2.3	DIE NEUROANATOMIE DES SEROTONERGEN SYSTEMS	7
2.4	DIE SPEZIFIZIERUNG SEROTONERGER NEURONEN	9
2.4.1	NEURONALE MUSTERBILDUNG	9
2.4.2	DIE INDUKTION SEROTONERGER NEURONEN	14
2.4.3	DIE DIFFERENZIERUNG SEROTONERGER NEURONEN	17
2.5	ZIELSETZUNG DER ARBEIT	19
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>20</b>
<hr/>		
3.1	IDENTIFIZIERUNG UND CHARAKTERISIERUNG DES <i>MPET-1</i> GENS DER MAUS	20
3.2	ABLEITUNG DER PRIMÄREN PROTEINSTRUKTUR	24
3.3	DIE EXPRESSION VON <i>MPET-1</i>	27
3.4	HERSTELLUNG DER MAUSMUTANTEN	32
3.4.1	<i>TARGETING</i> -STRATEGIE	32
3.4.2	KLONIERUNG DES <i>TARGETING</i> -VEKTORS	35
3.4.3	HOMOLOGE REKOMBINATION IN ES-ZELLEN	38

3.4.4	<b>ETABLIERUNG DER TRANSGENEN MAUSLINIE</b>	<b>39</b>
3.5	<b>ANALYSE DER <i>EN-1</i><sup>MPET-1/+</sup> MAUS</b>	<b>41</b>
3.5.1	<b><i>MPET-1</i> IST EKTOPISCH UND VORZEITIG EXPRIMIERT</b>	<b>41</b>
3.5.2	<b>SEROTONERGE MARKER SIND IN DER <i>EN-1</i><sup>MPET-1/+</sup> MAUS NICHT INDUZIERT</b>	<b>42</b>
3.5.3	<b><i>SHH</i> UND <i>NKX2.2</i> WERDEN NICHT DURCH <i>MPET-1</i> REGULIERT</b>	<b>46</b>
3.5.4	<b>DIE EKTOPISCHE <i>MPET-1</i> EXPRESSION IN DER SUBSTANTIA NIGRA UND IM VENTRALEN TEGMENTUM</b>	<b>47</b>
3.5.5	<b>ÜBERPRÜFUNG DER FUNKTIONALITÄT DES <i>KNOCK-IN</i> ALLELS</b>	<b>49</b>
3.5.6	<b><i>EN-1</i><sup>MPET-1/+</sup> MÄUSE ZEIGEN EINEN MUSTERBILDUNGSDEFEKT IN DER MHR</b>	<b>51</b>
3.6	<b>ANALYSE DER <i>EN-1</i><sup>MPET-1/MPET-1</sup> MAUS</b>	<b>54</b>
3.6.1	<b>DIE EKTOPISCHE <i>MPET-1</i> EXPRESSION IN DER HOMOZYGOTEN MUTANTEN</b>	<b>55</b>
3.6.2	<b>DIE EKTOPISCHE INDUKTION VON <i>SERT</i></b>	<b>56</b>
3.6.3	<b>DIE <i>NKX2.2</i> UND <i>LMX1B</i> EXPRESSION ENTSPRICHT IN DER HOMOZYGOTEN MUTANTEN BEI E12,5 DER WILD-TYPISCHEN EXPRESSION</b>	<b>58</b>
3.6.4	<b>TPH UND 5-HT SIND IN DER EKTOPISCHEN <i>MPET-1</i> POSITIVEN REGION DER PONS NICHT INDUZIERT</b>	<b>59</b>
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>61</b>
<hr/>		
4.1	<b>DIE MOLEKULARE ANALYSE VON <i>MPET-1</i></b>	<b>62</b>
4.2	<b>DIE <i>MPET-1</i> EXPRESSION</b>	<b>63</b>
4.3	<b>DIE <i>EN-1</i><sup>MPET-1/+</sup> MUTANTE ZEIGT KEINEN SEROTONERGEN PHÄNOTYP</b>	<b>65</b>
4.4	<b>IN DER <i>EN-1</i><sup>MPET-1/+</sup> MAUS LIEGT EIN MUSTERBILDUNGSDEFEKT DER MITTEL-/HINTERHIRNREGION VOR</b>	<b>68</b>
4.5	<b><i>SERT</i> IST IN DER <i>EN-1</i><sup>MPET-1/MPET-1</sup> MUTANTEN SPEZIFISCH UND EKTOPISCH INDUZIERT, JEDOCH NICHT DER KOMPLETTE SEROTONERGEN PHÄNOTYP</b>	<b>70</b>

<b>5</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>74</b>
<b>5.1</b>	<b>GERÄTELISTE</b>	<b>74</b>
<b>5.2</b>	<b>BEZUGSQUELLEN VON ENZYMEN, CHEMIKALIEN, ANTIKÖRPERN UND ANDEREN VERBRAUCHSMATERIALIEN</b>	<b>76</b>
<b>5.3</b>	<b>ZUSAMMENSETZUNG DER REAGENZIEN, PUFFER, STAMMLÖSUNGEN</b>	<b>79</b>
<b>5.3.1</b>	<b>MOLEKULARBIOLOGIE</b>	<b>79</b>
<b>5.3.2</b>	<b>HISTOLOGIE / MORPHOLOGIE</b>	<b>81</b>
<b>5.3.2.1</b>	<b>HISTOCHEMISCHE FÄRBUNGEN</b>	<b>81</b>
5.3.2.1.1	FÄRBUNG NACH NISSL	81
5.3.2.1.2	X-GAL-FÄRBUNG	81
5.3.2.1.3	F-ACTIN-FÄRBUNG	82
<b>5.3.2.2</b>	<b>IMMUNHISTOCHEMISCHE FÄRBUNGEN</b>	<b>82</b>
<b>5.3.2.3</b>	<b><i>IN- SITU</i> HYBRIDISIERUNG AUF PARAFFINSCHNITTEN</b>	<b>83</b>
<b>5.3.3</b>	<b>ZELLKULTUR</b>	<b>83</b>
5.3.3.1	ES-ZELLKULTUR	83
5.3.3.2	NON ES-ZELLKULTUR	84
<b>5.4</b>	<b>OLIGONUKLEOTIDPRIMER</b>	<b>84</b>
<b>5.5</b>	<b>VERWENDETE TIERE / HALTUNG</b>	<b>85</b>
<b>5.6</b>	<b>BESTIMMUNG DER ENTWICKLUNGSSTADIEN VERWENDETER MÄUSE</b>	<b>85</b>
<b>5.7</b>	<b>MOLEKULARBIOLOGIE</b>	<b>86</b>
<b>5.7.1</b>	<b>ISOLIERUNG GENOMISCHER DNA</b>	<b>86</b>
5.7.1.1	ISOLIERUNG VON GENOMISCHER DNA AUS GEWEBE	86
5.7.1.2	ISOLIERUNG VON GENOMISCHER DNA AUS ES-ZELLEN	86
<b>5.7.2</b>	<b>ISOLIERUNG VON GESAMT - RNA AUS GEWEBE UND ZELLEN</b>	<b>87</b>
<b>5.7.3</b>	<b>ISOLIERUNG VON PROTEINEN AUS GEWEBE UND ZELLEN</b>	<b>87</b>

<b>5.7.4</b>	<b>GEL-ELEKTROPHORESE</b>	<b>88</b>
5.7.4.1	DNA-GEL-ELEKTROPHORESE	88
5.7.4.2	DENATURIERENDE RNA-GEL-ELEKTROPHORESE	88
5.7.4.3	SDS-POLYACRYLAMID-GEL-ELEKTROPHORESE (SDS - PAGE)	89
<b>5.7.5</b>	<b>TRANSFERTECHNIKEN</b>	<b>89</b>
5.7.5.1	SOUTHERN-BLOTTING	89
5.7.5.2	NORTHERN-BLOTTING	90
5.7.5.3	WESTERN-BLOTTING UND IMMUNODETEKTION	90
5.7.5.4	HERSTELLUNG DER MEMBRANEN FÜR DIE KOLONIEHYBRIDISIERUNG	91
<b>5.7.6</b>	<b>HYBRIDISIERUNG MIT <sup>32</sup>P-MARKIERTEN DNA-SONDEN</b>	<b>92</b>
<b>5.7.7</b>	<b>AUTORADIOGRAPHIE</b>	<b>92</b>
<b>5.7.8</b>	<b>ISOLIERUNG VON DNA-FRAGMENTEN AUS AGAROSEGELN</b>	<b>92</b>
<b>5.7.9</b>	<b>AUFREINIGUNG VON PCR-PRODUKTEN</b>	<b>93</b>
<b>5.7.10</b>	<b>MOLEKULARE KLONIERUNGEN</b>	<b>93</b>
5.7.10.1	LIGATIONSREAKTIONEN	93
5.7.10.2	DEPHOSPHORYLIERUNGEN	93
5.7.10.3	GENERIERUNG STUMPFER ENDEN	94
5.7.10.4	HERSTELLUNG TRANSFORMATIONS-KOMPETENTER <i>E. COLI</i> ZELLEN	94
5.7.10.5	TRANSFORMATION KOMPETENTER <i>E. COLI</i> ZELLEN	94
5.7.10.6	TA-KLONIERUNGEN	95
<b>5.7.11</b>	<b>PLASMIDISOLIERUNG AUS TRANSFORMIERTEN BAKTERIEN</b>	<b>95</b>
<b>5.7.12</b>	<b>ISOLIERUNG VON cDNA - KLONEN AUS EINER PHAGENBIBLIOTHEK</b>	<b>96</b>
<b>5.7.13</b>	<b>REVERSE TRANSKRIPTION DER mRNA UND AMPLIFIKATION DER <i>MPET-1</i> CDS</b>	<b>96</b>
<b>5.7.14</b>	<b>GENERIERUNG UND 5' TERMINALE MARKIERUNG VON OLIGO-NUCLEOTIDSONDEN MIT <sup>32</sup>P</b>	<b>98</b>
<b>5.7.15</b>	<b>GENERIERUNG UND MARKIERUNG VON DS-cDNA-SONDEN MIT <sup>32</sup>P</b>	<b>98</b>

<b>5.7.16</b>	<b>GENOTYPISIERUNG TRANSGENER MÄUSE</b>	<b>100</b>
5.7.16.1	GENOTYPISIERUNG MITTELS LACZ-PCR	100
5.7.16.2	GENOTYPISIERUNG DURCH SOUTHERN-BLOT ANALYSE	101
5.7.16.3	IDENTIFIZIERUNG VON HOMOZYGOTEN $EN-1^{MPET-1/MPET-1}$ EMBRYONEN	101
5.7.16.4	GENERIERUNG VON DS-DNA-SONDEN ZUR GENOTYPISIERUNG	101
<b>5.7.17</b>	<b>DNA-SEQUENZIERUNG</b>	<b>102</b>
<b>5.8</b>	<b>HISTOLOGIE / MORPHOLOGIE</b>	<b>102</b>
<b>5.8.1</b>	<b>HERSTELLUNG VON GEWEBESCHNITTEN</b>	<b>102</b>
5.8.1.1	HERSTELLUNG VON PARAFFINSCHNITTEN	102
5.8.1.2	HERSTELLUNG VON KRYOSCHNITTEN	103
5.8.1.3	HERSTELLUNG VON VIBRATOMSCHNITTEN	103
<b>5.8.2</b>	<b>INTRACARDIALE PERFUSION</b>	<b>104</b>
<b>5.8.3</b>	<b>IMMUNHISTOCHEMISCHE FÄRBUNGEN</b>	<b>104</b>
5.8.3.1	IMMUNFÄRBUNG MIT POLYKLONALEN ANTIKÖRPERN AUF SCHNITTEN	104
5.8.3.2	<i>WHOLE MOUNT</i> IMMUNFÄRBUNG MIT POLYKLONALEN ANTIKÖRPERN	105
5.8.3.3	IMMUNFÄRBUNG MIT MONOKLONALEN ANTIKÖRPERN	106
<b>5.8.4</b>	<b>HISTOCHEMISCHE FÄRBUNGEN</b>	<b>107</b>
5.8.4.1	FÄRBUNG NACH NISSL	107
5.8.4.2	X-GAL-FÄRBUNG	107
5.8.4.3	EXPRESSION VON <i>EGFP</i> IM ZELLKERN UND F-ACTINFÄRBUNG	107
<b>5.8.5</b>	<b><i>IN-SITU</i> HYBRIDISIERUNG AUF PARAFFINSCHNITTEN</b>	<b>108</b>
5.8.5.1	GENERIERUNG UND MARKIERUNG VON CRNA SONDEN MIT $^{35}\text{S}$	108
5.8.5.2	VORBEHANDLUNG DER SCHNITTE	110
5.8.5.3	HYBRIDISIERUNG DER SCHNITTE	111
5.8.5.4	NACHBEHANDLUNG DER SCHNITTE	112

5.8.5.5	BESCHICHTEN MIT FILMEMULSION UND ENTWICKELN DER OBJEKTTRÄGER	112
<b>5.8.6</b>	<b>DOKUMENTATION HISTOLOGISCHER ERGEBNISSE</b>	<b>113</b>
<b>5.9.</b>	<b>MANIPULATION DES MAUSEMBRYOS</b>	<b>113</b>
<b>5.9.1</b>	<b>KULTIVIERUNG UND MANIPULATION EMBRYONALER STAMMZELLEN (ES-ZELLEN) DER MAUS</b>	<b>113</b>
<b>5.9.2</b>	<b>PRÄPARATION UND KULTIVIERUNG VON FEEDERZELLEN</b>	<b>114</b>
<b>5.9.3</b>	<b>ELEKTROPORATION UND SELEKTION VON ES-ZELLEN</b>	<b>115</b>
5.9.3.1	VORBEREITUNG DER ES-ZELLEN ZUR ELEKTROPORATION	115
5.9.3.2	ELEKTROPORATION DES <i>MPET-1 TARGETING</i> -KONSTRUKTES	115
5.9.3.3	SELEKTION MUTIERTER ES-ZELLKLONE	116
<b>5.9.4</b>	<b>KULTUR UND EXPANSION RESISTENTER ES- ZELLKLONE</b>	<b>116</b>
<b>5.9.5</b>	<b>ÜBERPRÜFUNG DER ES-ZELL DNA AUF HOMOLOGE REKOMBINATION</b>	<b>116</b>
<b>5.9.6</b>	<b>EXPANSION HOMOLOG REKOMBINierter ES-ZELLKLONE</b>	<b>117</b>
<b>5.9.7</b>	<b>BLASTOCYSTEININJEKTION UND EMBRYOTRANSFER</b>	<b>117</b>
<b>5.9.8</b>	<b>AUFZUCHT DER <i>MPET-1</i> MUTANTEN</b>	<b>118</b>
<b>5.10</b>	<b>KULTIVIERUNG UND TRANSFEKTION VON HEK-293 UND 3T3-ZELLEN</b>	<b>119</b>
5.10.1	KULTIVIERUNG DER ZELLEN	119
5.10.2	CACL <sub>2</sub> VERMITTELTE TRANSFEKTION VON HEK-293 ZELLEN	119
5.10.3	TRANSFEKTION VON NIH/3T3-ZELLEN	120
<b>6</b>	<b>Anhang</b>	<b>121</b>
<hr/>		
<b>7</b>	<b>Danksagungen</b>	<b>124</b>
<hr/>		
<b>8</b>	<b>Literatur</b>	<b>125</b>
<hr/>		

# 1 ZUSAMMENFASSUNG

---

Serotonerge (5-hydroxytryptaminerge, 5-HT) Neurone des zentralen Nervensystems spielen eine wichtige Rolle bei zahlreichen physiologischen Funktionen des Gehirns und im Verhalten der adulten Maus. Beim Menschen äußert sich eine Dysfunktion des serotonergen Systems in verschiedenen psychiatrischen Erkrankungen wie der Depression, der Schizophrenie und den Angstneurosen. Während der Entwicklung des ZNS spielt das Monoamin Serotonin eine wichtige neuromodulatorische Rolle und ist sowohl in die Neurogenese als auch in die neuronale Differenzierung involviert. Das zentrale serotonerge System ist somit eines der wichtigsten Neurotransmittersysteme im ZNS. Trotz dieser medizinischen Relevanz war lange nur wenig über die Entwicklung dieser neuronalen Population bekannt. Erst in den letzten Jahren wurden große Fortschritte gemacht um die Spezifizierung der serotonergen Neuronen auf genetischer Ebene zu verstehen.

In der vorliegenden Arbeit konnte das Gen *mPet-1* in der Maus identifiziert und charakterisiert werden. Als ein Ets-Transkriptionsfaktor ist *mPet-1* der Familie der *winged-helix-turn-helix* Transkriptionsfaktoren zuzuordnen.

*mPet-1* ist der früheste Marker für die zentralen, serotonergen Neuronen des Hirnstamms und wird früher als der *Serotonintransporter (Sert)* exprimiert. Somit könnte *mPet-1* instrumentell an der Spezifizierung der serotonergen Population beteiligt sein.

Um diese Hypothese zu überprüfen wurde *mPet-1* ektopisch in der Mittel-/Hinterhirnregion (MHR) exprimiert. Hierzu wurde eine *Knock-In* Strategie in den *Engrailed-1 (En-1)* Locus verfolgt. In der heterozygoten *En-1<sup>mPet-1/+</sup>* Mutanten konnten postmitotische, serotonerge Marker (*Sert*, *TpH* und 5-HT) in der ektopischen *mPet-1* Expressionsdomäne jedoch nicht induziert werden. Somit zeigten diese Mutanten keinen serotonergen Phänotyp. Erstaunlich war jedoch ein Musterbildungsdefekt in der MHR adulter, heterozygoter Tiere welcher sich durch eine nahezu vollständige Deletion der inferioren Colliculi äußert. Außerdem konnte ein Verlust der cerebellären Windungen I und II sowie Veränderungen der Windung III gezeigt werden.

Im Gegensatz zu den heterozygoten Tiere sterben die homozygoten Tiere kurz nach der Geburt was auf den Verlust beider *En-1* Allele zurückzuführen ist. Jedoch konnte ein eventueller serotonerger Phänotyp der homozygoten *En-1<sup>mPet-1/mPet-1</sup>* Embryonen untersucht werden. Interessanterweise konnte gezeigt werden, dass *Sert* in der Pons mit der ektopischen *mPet-1* Expression co-lokalisiert ist. Dieses Resultat konnte jedoch an einem weiteren Tier nicht reproduziert werden. Die Tryptophanhydroxylase (TpH) und auch der Neurotransmitter selbst (5-HT) werden nicht ektopisch induziert.

Unsere Ergebnisse zeigen, dass *mPet-1* in Abhängigkeit der Gendosis, der Region und des genetischen Hintergrundes ausreicht um den Serotonintransporter zu induzieren. Jedoch ist *mPet-1* nicht ausreichend um den kompletten serotonergen Phänotyp, der neben *Sert* durch die Marker TpH und 5-HT gekennzeichnet ist, zu induzieren. Somit weisen unsere Experimente darauf hin, dass *mPet-1* nicht für die Induktion und Spezifizierung serotonerger Neurone verantwortlich ist, sondern eher, wie zwischenzeitlich im *LOF*-Experiment gezeigt (HENDRICKS ET AL., 2003), für deren terminale Differenzierung bzw. Aufrechterhaltung.

## 2 EINLEITUNG

---

### 2.1 SEROTONIN: ENTDECKUNG, VORKOMMEN UND FUNKTION

Die heute als Serotonin bekannte Substanz wurde 1948 zum ersten Mal beschrieben. Bei der Suche nach einem Faktor im Blutserum mit einer vasokonstriktiven Wirkung als Ursache für die cardiovaskuläre Hypertonie wurde eine Substanz isoliert, die aufgrund ihres Vorkommens im Serum und wegen ihrer Wirkung auf den vaskulären Muskeltonus als Serotonin bezeichnet wurde (RAPPORT, GREEN AND PAGE, 1948). Etwa zur gleichen Zeit wurde in der Mucosa des Magens eine Substanz gefunden, die einen kontraktilen Effekt auf die glatte Muskulatur hatte. Die von den enterochromaffinen Zellen des Gastrointestinaltraktes ausgeschüttete Substanz wurde Enteramin genannt (ERSPAMER, 1940). Später entdeckte man, dass Enteramin und Serotonin identische Substanzen sind (ERSPAMER UND ASERO, 1952) und man einigte sich auf den Namen Serotonin. Serotonin kommt in nahezu allen Vertebraten und in zahllosen Invertebraten wie Seeanemonen, Tintenfischen, Hummern und Skorpionen, um nur einige zu nennen, vor (ESSMANN, 1978). Weiterhin wurde Serotonin in vielen Pflanzen und in deren Früchten, vor allem in Ananas und Bananen, nachgewiesen. In Vertebraten kommt Serotonin in vielen Organsystemen wie z.B. im Gastrointestinaltrakt, dem respiratorischen System, und dem Nervensystem vor (TWAROG UND PAGE, 1953). Etwa 90% der gesamten Serotoninmenge des menschlichen Organismus findet sich in der Magen-, Darmschleimhaut und im Nervensystem des Darms. Dessen Neurone vermitteln im Wesentlichen die Peristaltik des Darms. Etwa 10% befinden sich in den Thrombozyten, die Serotonin bei der Blutgerinnung freisetzen, und nur etwa 1-2% im zentralen Nervensystem.

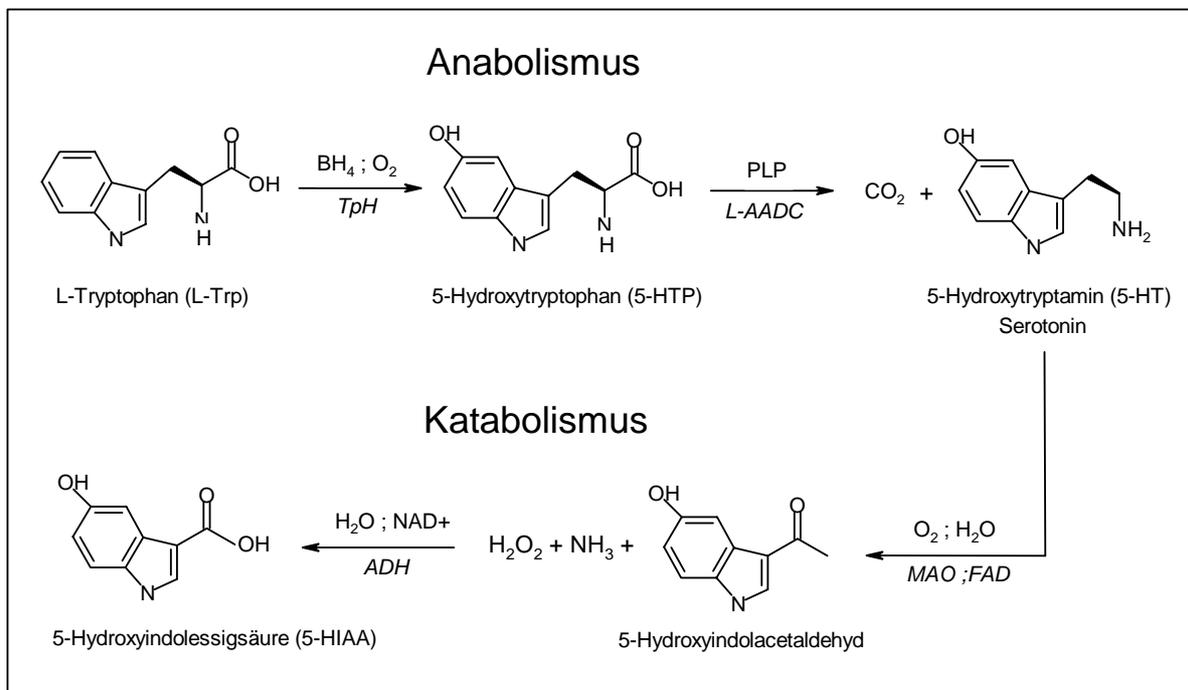
Die biologische Funktion von Serotonin im ZNS wurde durch die Forschung der letzten 30 Jahre aufgeklärt. So konnte gezeigt werden, dass Serotonin im Gehirn nur in einer spezifischen Population von Nervenzellen und deren Projektionen vorkommt. Serotonerge Synapsen wurden identifiziert und es konnte gezeigt werden, dass Serotonin unter physiologischen Bedingungen in den synaptischen Spalt ausgeschüttet wird. Weiterhin konnte der Metabolismus von Serotonin im Gehirn aufgeklärt werden (JACOBS UND AZMITITA, 1992). Heute ist Serotonin als Neurotransmitter, als ein chemischer Mediator eines elektrischen Impulses von Neuron zu Neuron, etabliert.

## **2.2 DIE SEROTONIN NEUROCHEMIE: SYNTHESE, FREISETZUNG, WIEDERAUFNAHME UND ABBAU**

Schon bald nach der Entdeckung wurde die chemische Struktur von Serotonin aufgeklärt, und es war möglich den Neurotransmitter chemisch zu synthetisieren. Serotonin gehört zu der Stoffklasse der Indolalkylamine und wird nach IUPAC als 3-(2-aminoethyl)indol-5-ol nomenkliziert. Zur besseren Verständlichkeit werden jedoch die Trivialnamen Serotonin und 5-Hydroxytryptamin (5-HT) synonym verwendet (ABB.: 1).

Der erste und zugleich limitierende Schritt in der Biosynthese von Serotonin ist die Hydroxylierung von L-Tryptophan in Position C-5 des Benzolringes. Diese Reaktion zu 5-Hydroxytryptophan (5-HTP) wird durch die Tryptophanhydroxylase (TpH) in Anwesenheit von molekularem Sauerstoff und dem reduzierten Co-Faktor Tetrahydrobiopterin (BH<sub>4</sub>) katalysiert (ABB.: 1). Man unterscheidet 2 Isoformen des Enzyms (TpH-1, TpH-2). Im ZNS kontrolliert TpH-2 die Serotoninsynthese und wird im folgenden Text mit TpH bezeichnet. Neben der Verfügbarkeit von Tryptophan spielt die Phosphorylierung (Aktivierung) von TpH durch die Ca<sup>2+</sup>/Calmodulin abhängige Proteinkinase II (Cam-K II) eine wichtige Rolle bei der Regulation der 5-HT Synthese (BOADLE-BIBER UND PHAN, 1987; KÜHN UND LOVENBERG 1982,1983). Nach der Hydroxylierung erfolgt die Decarboxylierung von 5-Hydroxytryptophan (5-HTP) zu 5-Hydroxytryptamin (5-HT), katalysiert durch die aromatische L-Aminosäure Decarboxylase (L-AADC) die als Co-Faktor Pyridoxalphosphat (PLP) benötigt (ABB.: 1). Die H<sup>+</sup>/ATPase - abhängige Akkumulation von cytosolischem Serotonin in synaptischen Vesikeln (sekretorische Organellen) erfolgt unter der Katalyse des vesikulären Monoamintransporters II (VMAT II), einem membranständigen Glycoprotein der synaptischen Vesikel (ABB.: 2). Dabei werden intravesikuläre H<sup>+</sup>-Ionen durch Serotonin ausgetauscht (ERICKSON, ET AL., 1992), welches im Vesikel mit hoher Affinität an ein Serotonin bindendes Protein (SBP) gebunden wird (TAMIR UND GERSHON, 1990). Die Freisetzung von vesikulär gespeicherten Serotonin in den synaptischen Spalt erfolgt bei einem ankommenden Aktionspotential durch Exocytose (NJUS, ET AL., 1986; HENRY, ET AL., 1987; KANNER, 1987; KANNER, ET AL., 1987; JOHNSON, 1988) und wird durch praesynaptische Autorezeptoren, den 5-HT<sub>1a</sub> Rezeptoren, (ABB.: 2), die auch in die Regulation der 5-HT Synthese involviert sind (ZIGMOND, BLOOM, LANDIS, ROBERTS, SQUIRE, 1999) moduliert. Indem Serotonin an seine zahlreichen postsynaptischen, G-Protein gekoppelten Rezeptorsubtypen

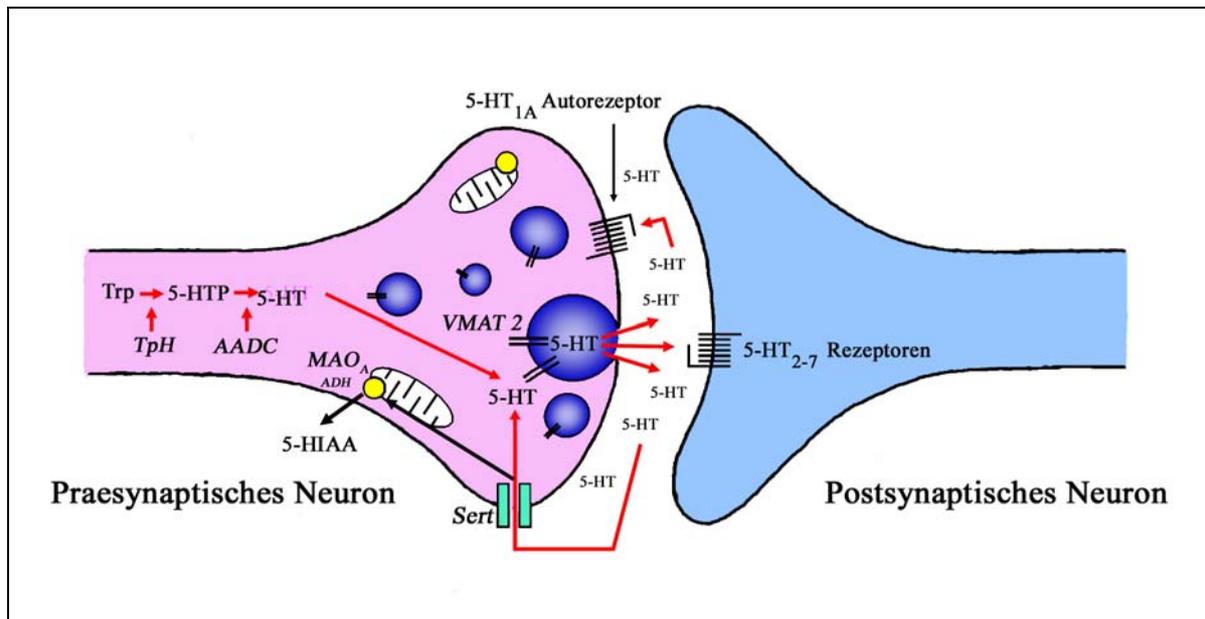
(5-HT<sub>2-7</sub>) bindet, wird der elektrische Impuls chemisch auf das postsynaptische exzitatorische oder inhibitorische Neuron übertragen. Die Reizweiterleitung wird durch die Wiederaufnahme des Neurotransmitters aus dem synaptischen Spalt in die Präsynapse terminiert. Dieser Rücktransport erfolgt durch den praesynaptischen Serotonintransporter (*Sert*), einem Protein, das 12 Transmembrandomainen aufweist und ist abhängig von dem elektrischen Na<sup>+</sup>-Gradienten der Plasmamembran, welcher von der Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup>-ATPase aufrecht erhalten wird (MARCUSSON UND ROSS, 1990). Wieder aufgenommenes Serotonin wird zum Teil wiederum in Vesikel gespeichert oder degradiert (ABB.: 2). Im katabolen Stoffwechselgang wird Serotonin unter Katalyse des mitochondrialen Enzyms Monoaminoxidase A (MAO<sub>A</sub>) und Flavin Adenosin Dinucleotid (FAD) oxidativ deaminiert. Das durch diese Reaktion entstehende 5-Hydroxyindolacetaldehyd wird durch die Aldehyddehydrogenase in Anwesenheit von NAD<sup>+</sup> und H<sub>2</sub>O zum Hauptmetaboliten, 5-Hydroxyindolessigsäure (5-HIAA), oxidiert (ABB.: 1). 5-HIAA diffundiert über den Extrazellulärraum in die Cerebrospinalflüssigkeit und wird über die Bluthirnschranke dem Blutkreislauf zur renalen Elimination zugeführt.



**ABB.: 1 DER SEROTONINMETABOLISMUS**

Serotonin stellt das Syntheseprodukt aus der Hydroxylierung und der Decarboxylierung der aromatischen Aminosäure L-Tryptophan dar. Der Abbau von Serotonin erfolgt durch oxidative Deaminierung. →

**ABB.: 1** Der Hauptkatabolit ist 5-HIAA. BH4, Tetrahydrobiopterin; FAD, Flavin-Adenin-Dinukleotid; L-AADC, L-Aromatische Aminosäure Decarboxylase; MAO, Monoaminoxidase; NAD, Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid; PLP, Pyridoxalphosphat; TpH, Tryptophanhydroxylase;



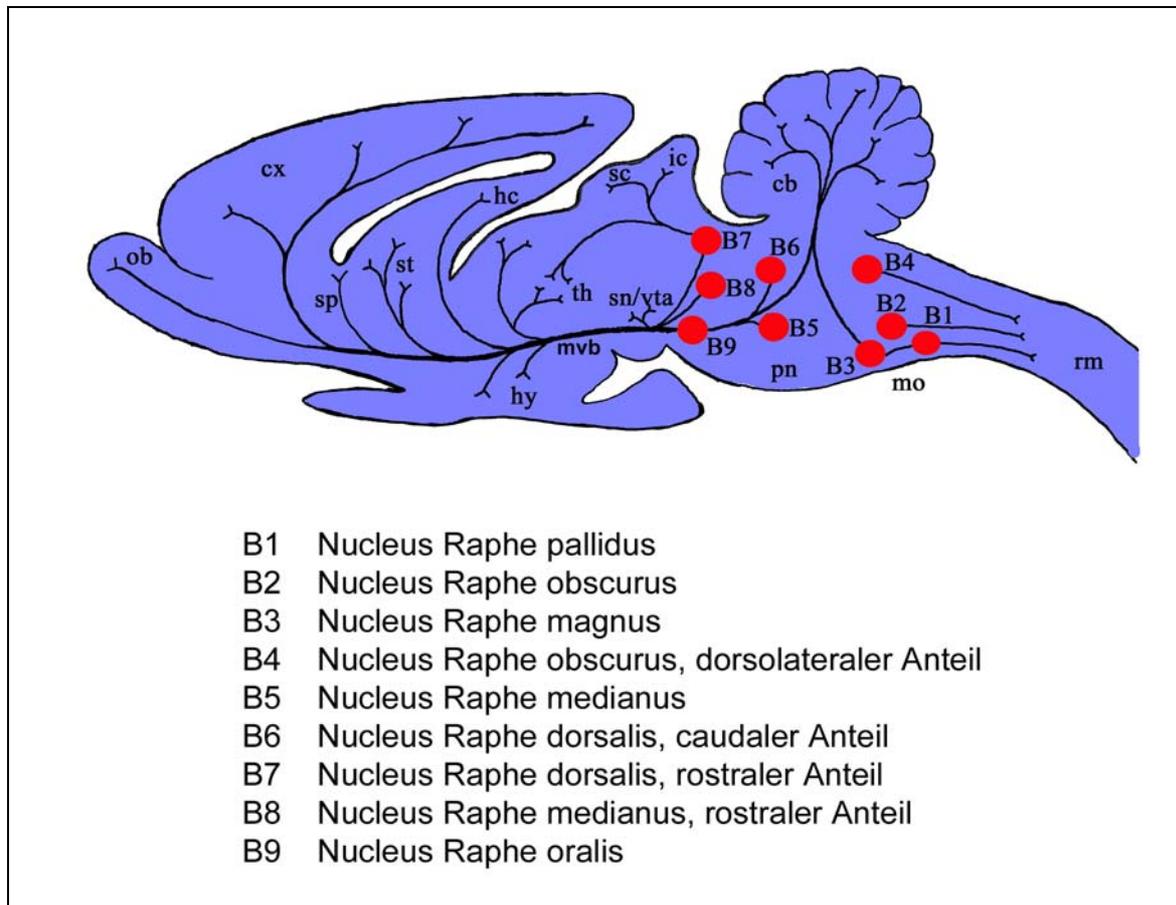
**ABB.: 2 DIE SEROTNERGE SYNAPSE**

In den Zellsomata synthetisiertes Serotonin (5-HT) wird anterograd im Axon transportiert und in den Synapsen durch die Aktivität des vesikulären Monoamintransporters (VMAT 2) in Vesikeln gelagert. Bei einem ankommenden Aktionspotential wird 5-HT durch Exozytose in den synaptischen Spalt freigesetzt und bindet an seine postsynaptischen Rezeptoren, um den Impuls auf das nachgeschaltete Neuron zu übertragen. Die Freisetzung von Serotonin wird durch praesynaptische Autorezeptoren moduliert. Die Wiederaufnahme von Serotonin in das praesynaptische Neuron wird durch den Serotonintransporter (Sert) vermittelt und terminiert die Signaltransduktion. So wieder aufgenommenes Serotonin wird entweder erneut gespeichert oder durch die mitochondriale Monoaminoxidase (MAO<sub>A</sub>) und die Aldehyddehydrogenase (ADH) zu 5-Hydroxyindolessigsäure (5-HIAA) abgebaut.

### 2.3 DIE NEUROANATOMIE DES SEROTONERGEN SYSTEMS

Die serotonergen Zentren des Gehirns sind mit den Raphe Kernen assoziiert. In Tieren und beim Menschen flankieren die Raphe Nuclei die ventrale Mittellinie des Hirnstamms entlang der A/P-Achse (MESSEN UND OLSZEWSKI, 1949; OLSZEWSKI UND BAXTER, 1954; TABER ET AL., 1969;). Diese Kerne umfassen eine heterogene Population von Neuronen verschiedener Morphologie, unterschiedlicher Projektionen und neurochemischer Charakteristika (HORNUNG, 2003). Serotonerge Neuronen sind charakterisiert durch die Präsenz des Neurotransmitters 5-HT und durch die Expression der Gene *TpH*, *Sert*, und *VMAT II*. Sie repräsentieren die größte und wichtigste neuronale Zellpopulation der Raphe Kerne und wurden erstmals 1964 von DAHLSTRÖM UND FUXE am adulten Gehirn der Ratte kartiert. Sie identifizierten neun serotonerge Zellgruppen und bezeichneten diese Kerne mit B1-B9 (ABB.: 3). Da die Topologie des serotonergen Systems in Säugetieren, einschließlich des Menschen, vergleichbar ist (HORNUNG, 2003), kann diese Nomenklatur analog auf die Maus übertragen werden. Die serotonergen Kerne werden unterteilt in ein caudales und rostrales System. Die caudalen Zellgruppen (B1-B4) sind in der medianen und paramedianen Region der Medulla oblongata sowie in der caudalen Pons lokalisiert. Neuronen der caudalen Gruppen descendieren in das Rückenmark. Die Neurone des Nucleus Raphe Magnus (B3) projizieren in die graue Substanz des dorsalen Horns und die Fasern des Nucleus raphe pallidus (B1), sowie die des Nucleus raphe obscurus (B2, B4) enden auf den Motorneuronen des ventralen Horns (TÖRK, 1990). Die Neuronen der caudalen Gruppen sind wesentlich an der Modulation sensorischer (z.B. Schmerz) und motorischer Impulse beteiligt (ZIGMOND, BLOOM, LANDIS, ROBERTS, SQUIRE, 1999). Das rostrale serotonerge System umfasst die Raphe Kerne B5-B9, die im rostralen Metencephalon und in der Pons des adulten Nagetiergehirns lokalisiert sind. B5-B9 Neurone innervieren nahezu das gesamte Gehirn. Axone der serotonergen Zellen des Nucleus Raphe dorsalis und medianus (B6-B8) ascendieren in einem ventralen sowie in einem dorsalen Faserbündel (NIEUWENHUYNS, 1985). Sie innervieren Kerngebiete des Mesencephalons, wie die Substantia nigra und folgen dem medialen Vorderhirnbündel von wo aus Fasern in verschiedenste Gehirnareale projizieren. Projektionen ins Diencephalon enden in thalamischen und hypothalamischen Kerngebieten. Andere Fasern innervieren das Striatum, den Hippocampus, corticale Regionen und auch die olfaktorischen Bulbi. Serotonerge Nerven-

endigungen im Cerebellum haben ihren Ursprung sowohl in den rostralen als auch in den caudalen Raphe-Kernen (ABB.: 3).



**ABB.: 3 DIE TOPOLOGIE DES SEROTONERGEN SYSTEMS IM ADULTEN MAUSGehirN**

Graphische Darstellung eines paramedianen Sagittalschnitts des adulten Gehirns der Maus. Die Raphe Kerne des Hirnstamms sind rot, und die serotonergen Fasern schwarz dargestellt. Die Bezeichnung und die Einteilung der Raphe Kerne in eine caudale und rostrale Gruppe basiert auf den Angaben von TÖRK (1990). Die caudale Gruppe serotonerger Neuronen umfasst die Kerne B1-B4 mit descendierenden Projektionen ins Rückenmark und die rostrale Gruppe repräsentiert die Kerne B5-B9 mit ascendierenden Fasern die nahezu das gesamte Gehirn innervieren. In anderen Literaturstellen werden die serotonergen Gruppen teilweise unterschiedlich definiert. Die Nuclei B4 und B5 werden häufig in der Bezeichnung Nucleus Raphe pontinus zusammengefasst und der rostralen Gruppe zugeordnet.

cb, Cerebellum; cx, Cortex; hc, Hippocampus; hy, Hypothalamus; ic, inferiorer Colliculus; mo, Medulla oblongata; mvb, mediales Vorderhirnbündel; ob, olfaktorische Bulbi; pn, Pons; rm, Rückenmark; sc, superiorer Colliculus; sn/vta, Substantia nigra / ventrales Tegmentum; sp, Septum; st, Striatum; th, Thalamus

Diese weit verzweigte Innervation verschiedenster Hirnareale ausgehend von nur wenigen serotonergen Zellen in den Raphe nuclei, verdeutlicht, dass das serotonerge System eines der wichtigsten Neurotransmittersysteme ist. Serotonerge Neurone modulieren viele physiologische Prozesse im Gehirn und auch das Verhalten von Vertebraten (STEINBUSCH, 1981; JACOBS UND AZMITIA, 1992; LUCKI, 1998). Eine Dysfunktion dieses komplexen Systems kann beim Menschen mit schweren psychiatrischen Erkrankungen wie Depression, Verhaltensstörungen, Zwangsneurosen und Schizophrenie assoziiert sein (LUCKI, 1998; DAVIDSON ET AL., 2000; NELSON UND CHIAVEGATTO, 2001). Das genetische Netzwerk, das der Entwicklung und der Spezifizierung der serotonergen Population zugrunde liegt, wird jedoch erst seit 1999 intensiv beforscht.

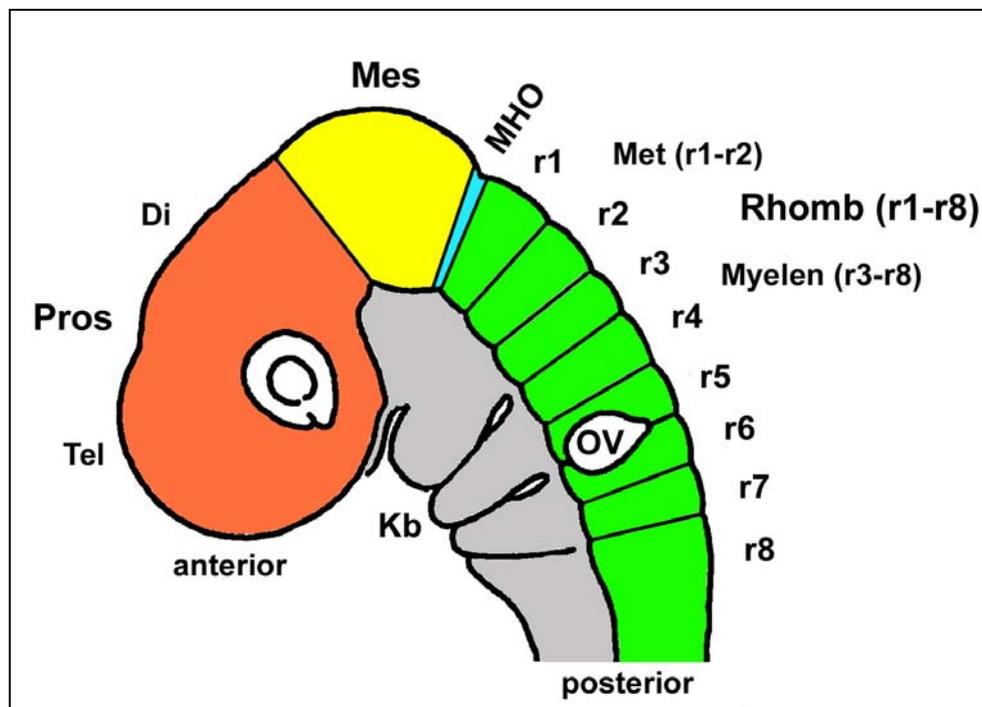
## **2.4 DIE SPEZIFIZIERUNG SEROTONERGER NEURONEN**

Die Entwicklung des Zentralen Nervensystems von Vertebraten ist ein komplexer Prozess und umfasst die Spezifizierung verschiedenster Zellpopulationen in örtlicher und zeitlicher Abhängigkeit. Die Spezifizierung der serotonergen Neuronen im ventralen Rhombencephalon, caudal vom Mittel-/Hinterhirnorganisateur (MHO), kann ebenso wie beispielsweise die Spezifizierung der mesencephalen dopaminergen Neuronen, rostral vom MHO, in zwei kritische Phasen unterteilt werden: Induktion und die sich anschließende Differenzierung.

### **2.4.1 NEURONALE MUSTERBILDUNG**

Die frühe Entwicklung des Embryos ist durch die Gastrulation gekennzeichnet. Ausgehend von einem primären Organisator (Xenopus: Spemann Organisator; Hühnchen: Hensenscher Knoten; Maus: Knoten) entsteht aus der zweiblättrigen Keimscheibe die dreiblättrige Keimscheibe, bestehend aus dem Ektoderm, dem Mesoderm und dem Entoderm. Organisatoren sind Zellverbände, die die Fähigkeit besitzen entwicklungsrelevante Informationen an benachbarte Zellen oder Gewebe weiterzugeben und somit deren Entwicklungsschicksal beeinflussen. Der Knoten und ein weiterer Organisator, das anteriore viscerale Entoderm, induzieren im entstehenden Ektoderm neurales Gewebe und somit die Neuralplatte. Während der sich anschließenden Neurulation wird das Neuroektoderm zum Neuralrohr aufgefaltet und mit der Festlegung der A/P und D/V Achsen erhalten die Zellen des Neuroepithels während der frühen Embryonalentwicklung ihre positionelle Identität

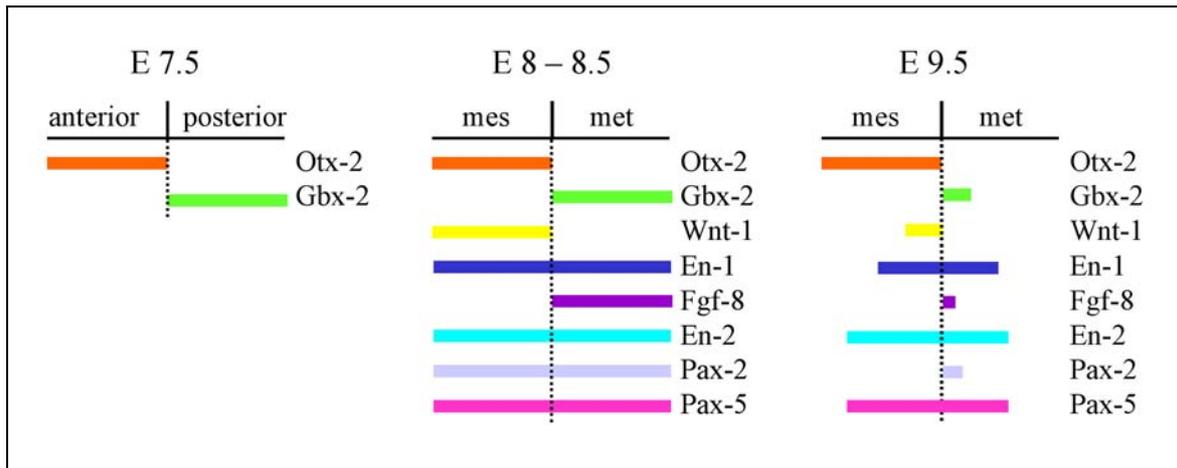
(LUMSDEN UND KRUMLAUF, 1996; TANABE UND JESSELL 1996). Das unsegmentierte Neuralrohr wird im ersten Schritt der Regionalisierung in drei Gehirnvesikel unterteilt. Aus diesen primordialen Regionen entstehen Prosencephalon, Mesencephalon und Rhombencephalon (RUBENSTEIN, 1998) (ABB.: 4). Im weiteren Verlauf der neuronalen Entwicklung entstehen aus dem Prosencephalon durch Kompartimentierung das Telencephalon und das Diencephalon. Durch transversale Einschnürungen entlang der A/P-Achse entstehen im Rhombencephalon Neuromere (VAAGE, 1969; LUMSDEN UND KRUMLAUF, 1996). Diese acht neuronalen Segmente werden als Rhombomere (r1 – r8) bezeichnet. Aus r1 – r2 geht das Metencephalon (Met) hervor, und aus r3 – r8 das Myelencephalon (Myelen). Das Mesencephalon ist nicht weiter unterteilt (ABB.: 4).



**Abb.: 4 Die A/P Segmentierung während der neuronalen Entwicklung**

Das unsegmentierte Neuralrohr, das durch die Auffaltung der aus der Neurulation hervorgegangenen Neuralplatte entsteht, wird im ersten Schritt der Regionalisierung in drei Gehirnvesikel unterteilt. Diese Vesikel werden als Prosencephalon (Pros), Mesencephalon (Mes) und Rhombencephalon (Rhomb) bezeichnet. Aus dem Prosencephalon entstehen Diencephalon (Di) und Telencephalon (Tel). Das Rhombencephalon zählt 8 Rhombomere (r1 - r8) und wird in das Metencephalon r1 - r2 (Met) und das Myelencephalon r3 - r8 (Myelen) unterteilt. Das Mesencephalon (Mes) wird nicht weiter segmentiert. Der Mittel-/Hinterhirnorganisateur (MHO) markiert die Grenze zwischen dem Mesencephalon und dem Metencephalon. OV, otischer Vesikel; Kb, Kiemenbögen

Korrespondierend zu der Ausbildung der Gehirnvesikel entstehen Bereiche differentiell exprimierter Gene entlang der A/P-Achse. Zu den frühesten, region-spezifisch exprimierten Proteinen zählen die Homeodomain-Transkriptionsfaktoren *Otx-2* und *Gbx-2* sowie die *Hox*-Gene. Die A/P-Segmentierung des Rhombencephalons, respektive die Formierung der 8 Rhombomere (ABB.: 4) wird durch einen Code der dort differentiell exprimierten *Hox*-Gene induziert (KRUMLAUF ET AL., 1993). *Otx-2* und *Gbx-2* werden am Ende der Gastrulation (bei E7,5) komplementär, *Otx-2* (ab E6.5) in der anterioren, und *Gbx-2* (ab E7.5) in der posterioren Neuralplatte, exprimiert (SIMEONE ET AL., 1993; BOUILLET ET AL., 1995; WASSARMAN ET AL., 1997; JOYNER ET AL., 2000). Bei E8 determinieren *Otx-2* und *Gbx-2* die Grenze zwischen Mes- und Metencephalon und an dieser Grenze wird der MHO (*mid-/hindbrain organizer*) positioniert (Abb.: 5) (BROCCOLI ET AL., 1999; MILLET ET AL., 1996,1999; SIMEONE, 2000; JOYNER ET AL., 2000; GARDA ET AL., 2001). Induktive Signale, ausgehend von diesem sekundären Organisationszentrum, spielen eine wichtige Rolle bei der neuralen Musterbildung im angrenzenden Gewebe und somit auch bei der Induktion serotonerger Neuronen (MARTINEZ UND ALVARADO-MALLART, 1990; MARTINEZ ET AL., 1991; MARIN UND PUELLES, 1994; WASSEF UND JOYNER, 1997; HYNES UND ROSENTHAL, 1999; RHINN UND BRAND, 2001; WURST UND BALLY-CUIF, 2001). Die induktive Aktivität des MHO wurde durch Transplantationsexperimente nachgewiesen. Die Transplantation von MHO-Gewebe in die caudale Vorderhirnregion, führte zur Induktion von Gewebe mit Mittelhirncharakter (NAKAMURA ET AL., 1988; MARTINEZ ET AL., 1999; MARTINEZ ET AL., 1991). Die Transplantation der Organisatorregion in das Rhombencephalon induzierte cerebelläres Gewebe (MARTINEZ ET AL., 1995). Der sezernierte Faktor Wnt-1 wird rostral vom MHO im Mesencephalon, und der ebenfalls sezernierte Fibroblasten-Wachstumsfaktor-8 (Fgf-8) wird kaudal vom MHO im Metencephalon, exprimiert (ABB.: 5). Bei E8 – 8,5 werden weitere Gene an der Mittel-/Hinterhirngrenze exprimiert (ABB.: 5). Hierzu zählen die Homeodomainfaktoren *Engrailed-1/2* (*En-1/2*), die Paired-Homeodomainfaktoren *Pax-2/5*, die über die Mittel-/Hinterhirngrenze hinweg exprimiert sind. Bei E9.5 verschmälert sich die initial breite Expression der Mittel-/Hinterhirngene in ihrer A/P-Ausdehnung (ABB.: 5).



**ABB.: 5 DIE DYNAMISCHE EXPRESSION DER MITTEL-/ HINTERHIRNGENE**

Bei E 7.5 sind die Transkriptionsfaktoren *Otx-2* und *Gbx-2* komplementär exprimiert: *Otx-2* im anterioren, und *Gbx-2* im posterioren Epiblasten. Bei E8 bestimmt die Grenze beider Expressionsdomänen die Position des MHO, und die Mittel-/Hinterhirngrenze wird etabliert. Der sezernierte Faktor *Wnt-1* wird rostral vom MHO im Mesencephalon exprimiert. Der sezernierte Fibroblastenwachstumsfaktor-8 (*Fgf-8*) wird caudal vom MHO im Metencephalon exprimiert. Weitere Transkriptionsfaktoren, wie *Engrailed-1/2* (*En-1/2*), *Paired-Homeoboxfaktor-2/-5* (*Pax-2/-5*) sind bei E8 induziert und in einem breiten Band über die Mittel-/Hinterhirngrenze (MHG) hinweg exprimiert. Nachdem das Neuralrohr bei E9.5 geschlossen ist, haben sich die initial breiten Expressionsdomänen der meisten Mittel-/Hinterhirngene verschmälert. Jedoch bleibt ihre Position relativ zum MHO unverändert. So wird z.B. *En-1* ringförmig, weiterhin über den MHO hinweg exprimiert und die *Fgf-8* Expression beschreibt einen schmalen Ring unmittelbar caudal vom MHO.

In *loss of function* (LOF) und *gain of function* (GOF) Experimenten konnte gezeigt werden, dass all diese Gene für die normale Entwicklung der MHR von großer Bedeutung sind (McMAHON ET AL., 1992; MILLEN ET AL., 1994; WURST ET AL., 1994; FAVOR ET AL., 1996; SCHWARZ ET AL., 1997; MEYERS ET AL., 1998; JOYNER ET AL., 2000). Eine *Otx-2* Null-Mutation führt in der Maus zu einem Verlust des gesamten Prosencephalon, des Mesencephalons sowie des Metencephalons bis hin zu Rhombomer 3 (ACAMPORA ET AL., 1995; ANG ET AL., 1996; RHINN ET AL., 1999). Eine Zerstörung beider *Gbx-2* Allele äußert sich phänotypisch in einem Verlust des anterioren Metencephalons, einer kaudalen Expansion des Mesencephalons sowie in der Verschiebung der Expressionsdomänen von *Otx-2*, *Wnt-1* und *Fgf-8* nach caudal (WASSARMAN ET AL., 1997; MILLET ET AL., 1999). Mäuse mit einer *En-1* Null-Mutation zeigen, abhängig vom genetischen Hintergrund, einen vollständigen

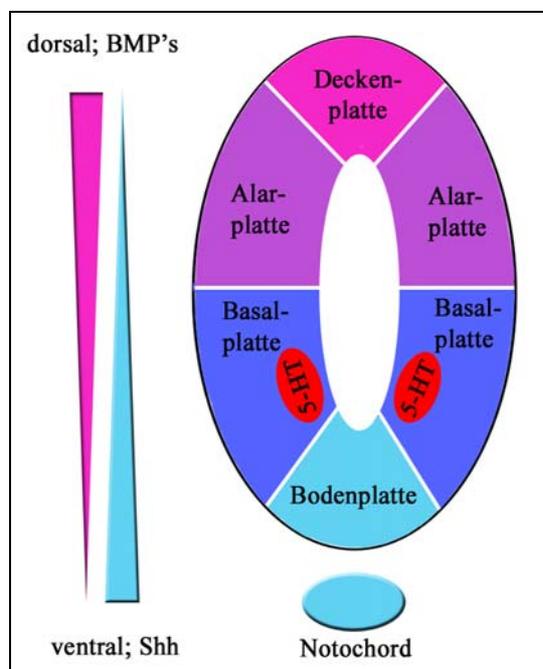
Verlust, oder eine drastische Reduktion der MHR, wohingegen die heterozygoten Tiere keinen Phänotyp aufweisen (WURST ET AL., 1994). Diese Ergebnisse deuten auch darauf hin, dass im MHO die soeben beschriebenen Gene ein hochkomplexes Netzwerk bestehend aus gegenseitiger Aktivierung und Repression bilden. (FÜR REVIEW SIEHE: WURST UND BALLY-CUIF, 2001; PRAKASH UND WURST, 2004). Die initiale Positionierung des MHO wird durch die gegenseitige Repression der Transkriptionsfaktoren *Otx-2* und *Gbx-2* bewirkt. Dies konnte auch in transgenen Mäusen gezeigt werden, bei denen eine *En-1* cDNA-Kopie durch eine cDNA-Kopie *Otx-2* ersetzt wurde, denn in dieser Maus ist der gesamte MHO und die *Otx-2* Expressionsdomäne nach caudal verschoben (BROCCOLI ET AL., 1999). Interessanterweise bewirkte diese Verlagerung in der ventralen MHR eine Reduzierung der serotonergen Zellpopulation und einen posterioren *shift* sowie die Erhöhung der Anzahl mesencephaler dopaminergere Neuronen, während andere neuronale Populationen nicht beeinträchtigt sind (BRODSKI ET AL., 2003). Die rostrale Repositionierung des MHO in *Otx-1<sup>-/-</sup>;Otx-2<sup>+/-</sup>* Mäusen, bei denen die Konzentration der *Otx*-Proteine unter einen kritischen Grenzwert fallen (ACAMPORA ET AL., 1997; SUDA ET AL., 1997), bewirkt die Repositionierung dopaminergere Neurone ins Diencephalon und eine rostrale Verlagerung sowie eine Vermehrung der serotonergen Zellen (BRODSKI ET AL., 2003). Somit repräsentiert der MHO und das zugrundeliegende genetische Netzwerk ein induktives Zentrum, welches maßgeblich an der A/P-Musterbildung in der MHR als auch an der Positionierung der mesencephalen dopaminergere und metencephalen serotonergen Population beteiligt ist.

Neben dem A/P- System spielt auch die D/V-Musterbildung eine wesentliche Rolle bei der Entwicklung des ZNS und der serotonergen Neuronen. Die D/V Musterbildung wird im wesentlichen durch die Expression von Sonic hedgehog (*Shh*) im Notochord (axiales Mesoderm) und dessen Sekretion in einem ventro/dorsalen Gradienten und von bone morphogenic protein (BMP) in einem dorso/ventralen Gradienten gewährleistet. Von ventral nach dorsal entstehen parallel zur A/P-Achse des Embryos und abhängig von diesen beiden Gradienten die Bodenplatte, die Basalplatte, die Alarplatte und die Dachplatte (ABB.: 6) (SCHIMAMURA ET AL., 1995; TANABE UND JESSEL, 1996; RUBENSTEIN, 1998; YE ET AL., 1998). Nach der Formierung der Bodenplatte wird *Shh* dort von der initialen *Shh*-Expression des Notochords induziert. In der benachbarten Basalplatte entstehen im Rhombencephalon

abhängig von der Shh Konzentration 5 verschiedene Klassen von Neuronen (V0 – V3 Interneurone; viscerale Motorneurone): die am weitesten ventral positionierten Neuronen benötigen hohe Shh Konzentrationen, die weiter dorsal gelegenen entsprechend geringere Konzentrationen (ERICSON ET AL., 1997; BRISCOE ET AL., 1999).

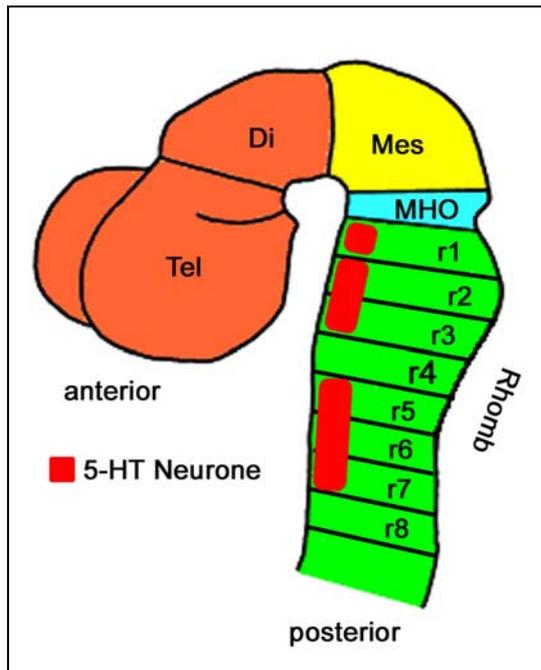
#### 2.4.2 DIE INDUKTION SEROTONERGER NEURONEN

Neben den oben genannten Neuronen werden auch die serotonergen Neurone in der Basalplatte des Rhombencephalons in stereotypen Positionen entlang der A/P-Achse und entlang der D/V-Achse induziert (ABB.: 6; 7). Ursprünglich wurden die serotonergen Zellen aufgrund der Morphologie in eine rostrale Gruppe (Nuclei B5-B9) die sich in r1 – r3 befinden und in eine caudale Gruppe (Nuclei B1-B4) in r5 – r7, unterteilt (TÖRK, 1990). Unter dem Aspekt der Induktion unterscheidet man heute, basierend auf unterschiedlichen Signaltransduktionswegen, die in r1 induzierten serotonergen Neuronen von jenen, die sich in r2, r3 sowie in r5 - r7 entwickeln (Abb.: 7; 8).



**ABB.: 6 DIE D/V - ORGANISATION DES NEURALROHRES, UND DIE INDUKTION SEROTONERGER NEURONEN**

Graphische Darstellung eines coronalen Schnittes in der Ebene des Metencephalons bei E11.5. Die graduelle Expression von Shh und BMP ist maßgeblich an der D/V Musterbildung und somit an der Entwicklung der Boden-, Basal-, Alar-, und der Deckenplatte beteiligt. Serotonerge (5-HT) Neurone werden stereotypisch in den proliferativen Zonen der Basalplatte im Rhombencephalon induziert.



**ABB.: 7 DIE INDUKTION SEROTONERGER NEURONEN ENTLANG DER A/P ACHSE**

Serotonerge Neurone werden relativ zur A/P-Achse in 2 Gruppen induziert. Man unterscheidet die serotonergen Neurone in r1 von denen in r2, r3, und r5-r7 aufgrund unterschiedlicher Signaltransduktionswege (s. ABB.: 8). In r4 werden keine serotonergen Neurone generiert.

Für die Induktion der serotonergen Subpopulation, speziell derer in Rhombomer 1, (späterer Nucleus raphe dorsalis) ist die frühe *Fgf-4*, *Fgf-8* und *Shh* Expression ausreichend (ABB.: 8), (YE ET AL., 1998, HEYNES UND ROSENTHAL, 1999; GORIDIS UND ROHRER, 2002). Durch die Expression dieser Faktoren entsteht ein Kompetenzfeld für zukünftige serotonergen Neuronen, d.h. eine bestimmte Geweberegion im ventrorostralen Metencephalon wird kompetent um später die serotonergen des Nucleus raphe dorsalis Neuronen zu generieren.

Die serotonergen Neurone in r2 – r3 und r5 – r7 benötigen für ihre Induktion den Shh-aktivierten Klasse II Homeobox-Transkriptionsfaktor *Nkx2.2*, der in ventralen Vorläuferzellen exprimiert ist. *Nkx2.2* ist zunächst mit der Induktion des proneuralen Paired Homeoboxgens *Phox2b* in die Generierung von visceralen Motorneuronen involviert (ABB.: 8) bevor *Nkx2.2* in einer zweiten Phase der Neurogenese eine bedeutende Rolle bei der Spezifizierung von serotonergen Neuronen spielt (BRISCOE ET AL., 1999; PATTYN ET AL., 2003). In der Maus begünstigt *Nkx2.2* in Kooperation mit einem noch unbekanntem Faktor die Induktion von 5-HT Neuronen durch die Suppression *Phox2b* (PATTYN ET AL., 2003; 2004) (ABB.: 8). So werden in *Nkx2.2* Null-Mutanten zukünftige 5-HT Neurone in r2,3 und r5-7 nicht spezifiziert. Jedoch sind jene in r1, von dieser Mutation nicht betroffen (BRISCOE ET AL., 1999; PATTYN ET AL., 2003, 2004). Im Gegensatz zur Maus wird im r1 des Hühnchens *Nkx2.2* und zusätzlich *Nkx6.1* benötigt, um das induktive Shh-Signal zu übersetzen und somit die Entwicklung dieser 5-HT Population zu begünstigen (CRAVEN ET AL., 2003).

Nkx6.1 ist in der Maus nicht essentiell, für die Entwicklung der 5-HT Neurone (PATTYN ET AL., 2003). Mehrnoch, Nkx6.1 / 6.2 und Hox2b halten in der Maus die Expression von *Hox1b* in r4 aufrecht. Hox1b erhält wiederum die *Phox2b* Expression aufrecht. Somit entstehen in r4 keine serotonergen Neurone. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass **(1)** in der Maus die r1 serotonergen Neurone anders spezifiziert werden als jene in r2,3 und r5-7 und **(2)** es erhebliche Speziesunterschiede bezüglich der Spezifikation von serotonergen Neuronen gibt.

Die Transkriptionsfaktoren Gata-2 und Gata-3 haben ein Zinkfingermotiv (PATIENT ET AL., 2002) und werden in r1 von Nkx2.2 und Nkx6.1 induziert (ABB.: 8) (CRAVEN ET AL., 2003). Gata Proteine sind in entwicklungsrelevante Prozesse wie, Neurogenese, neuronale Migration, axonale Projektion und Zellspezifizierung involviert (PANDOLFI ET AL., 1995; NARDELLI ET AL., 1999; PATA ET AL., 1999; KARIS ET AL 2001; CRAVEN ET AL., 2003). Beide Gene sind sowohl in neuronalen Vorläuferzellen als auch in postmitotischen Neuronen exprimiert (NARDELLI ET AL., 1999) was auf eine potentielle Rolle bei der neuronalen Spezifikation hindeutet (CRAVEN ET AL., 2003). Mittels der *in ovo* Elektroporation konnte im Hühnchen gezeigt werden, dass eine ektopische Gata-2 Expression neuronale Vorläuferzellen in r1 stromabwärts von *Nkx2.2* respezifizieren kann und serotonerge Neuronen induziert wurden (CRAVEN ET AL., 2003). Auch in der Maus ist *Gata-2* für die Spezifizierung der serotonergen Population notwendig, denn *Gata-2* ist ausreichend und notwendig zur Aktivierung seiner Zielgene *Lmx1b* und *mPet-1* (CRAVEN ET AL., 2003). *Gata-3* ist zwar an der Entwicklung caudaler 5-HT Neuronen beteiligt, spielt aber bei der Spezifizierung der rostralen 5-HT Neuronen eine unbedeutende Rolle, denn *Gata-3* kann den Phänotyp der *Gata-2* Nullmutation in r1 nicht kompensieren (ABB.: 8) (CRAVEN ET AL., 2003).

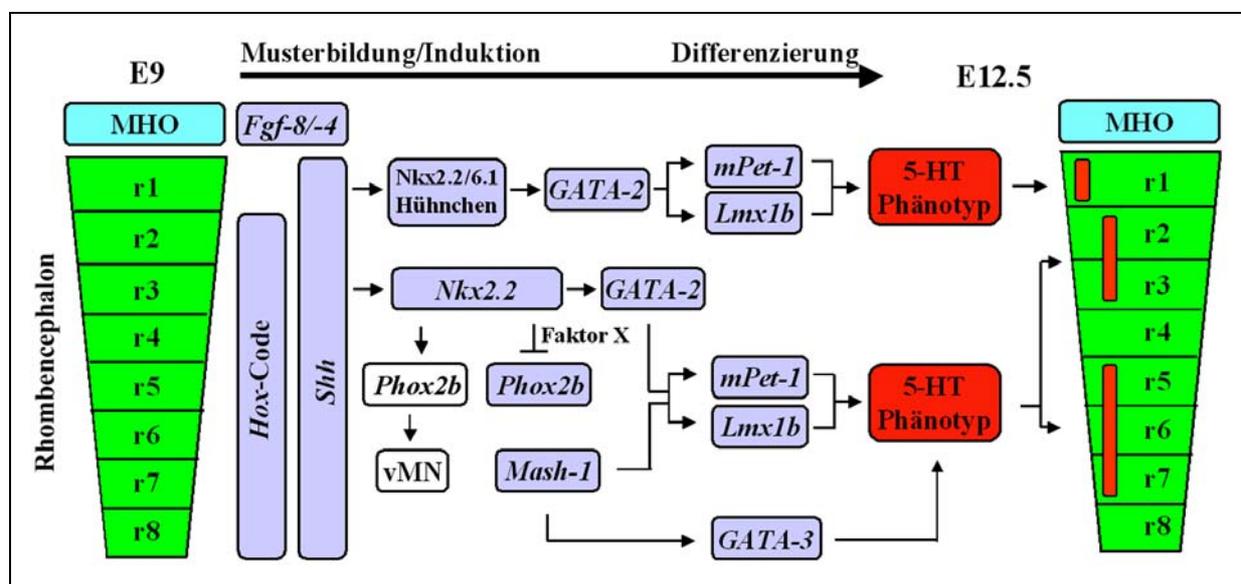
Erst kürzlich wurde *Mash-1* als ein weiteres Gen identifiziert, dass in die Spezifizierung serotonerger Neuronen involviert ist. In einer frühen Phase der Neurogenese (E9 – E10.5) sind *Mash-1* und auch *Phox2b* als proneurale Gene für die Produktion neuronaler Vorläuferzellen notwendig. In einer zweiten Phase der neuronalen Entwicklung agiert *Mash-1* aber auch als Spezifizierungsfaktor. Es wurde gezeigt, dass *Mash-1* über die Aktivierung von *Gata-3*, parallel zu *Lmx1b* und *mPet-1*, für die Determinierung des serotonergen Phänotyps und somit für die Spezifizierung serotonerger Neuronen notwendig ist (ABB.: 8) (PATTYN ET AL., 2004).

### 2.4.3 DIE DIFFERENZIERUNG SEROTONERGER NEURONEN

In der Phase der Differenzierung werden die Zellen postmitotisch, erwerben ihren distinkten neuronalen Phänotyp und etablieren somit ihre adulten Charakteristika. Die ersten, rostralen, serotonergen Neuronen können im Embryonalstadium E11 in der rostralen Zellgruppe detektiert werden (PFAAR ET AL., 2002). Danach entstehen die caudalen serotonergen Zellgruppen (AITKEN UND TÖRK, 1988; HEYNES UND ROSENTHAL, 1999; PFAAR ET AL., 2002; CRAVEN ET AL., 2003).

Einer der ersten Marker, der in serotonergen Neuronen exprimiert ist, ist der LIM Homeobox Faktor 1b (*Lmx1b*), der wie schon oben erwähnt in der serotonergen Signaltransduktionskaskade stromabwärts von *Gata-2*, und wie in der *Nkx2.2* Nullmutanten gezeigt auch stromabwärts von *Nkx2.2* agiert (CHENG ET AL., 2003) (ABB.: 8). LIM-homeodomain Proteine sind neben der Homeobox durch die Anwesenheit eines Tandems Zink bindender LIM-domainen gekennzeichnet (IANOTTI ET AL., 1997). Ursprünglich wurde *Lmx1b* als Schlüsselmolekül bei der dorso-ventralen Musterbildung in den sich entwickelnden Gliedmaßen charakterisiert (JOHNSON UND TABIN, 1997; CHENG ET AL., 2003) und hat darüber hinaus multiple Funktionen bei der Entwicklung anderer Gewebe wie der Niere und des ZNS (CHEN ET AL., 1998; SMIDT ET AL., 2000; DING ET AL., 2003). *Lmx1b* ist auch in den mesencephalen dopaminergen Neuronen exprimiert und an der Aufrechterhaltung aber nicht an der initialen Spezifikation dieser ventralen Neurotransmitterpopulation beteiligt (SMIDT ET AL., 1997, 2000). Im ventralen Metencephalon ist *Lmx1b* bei E10,75 exprimiert (CHENG ET AL., 2003; DING ET AL., 2003). In der ventrikulären Zone proliferierender Zellen kann eine Expression nicht detektiert werden wohl aber in der angrenzten Mantelzone. Somit ist *Lmx1b* ein früher Marker für postmitotische Neuronen (DING ET AL., 2003) und wird bei der Neurogenese nicht benötigt. Wenige Zellen die sich gerade differenzieren und von der ventrikulären Zone in die Mantelzone migrieren sind sowohl *Nkx 2.2* als auch *Lmx1b* positiv. Das deutet darauf hin, dass *Lmx1b* positive, zukünftige serotonerge Neuronen von *Nkx2.2* positiven Vorläufern abstammen (DING ET AL., 2003). In der *Lmx1b* Nullmutanten konnte gezeigt werden, dass *Lmx1b* in die Etablierung des 5-HT Neurotransmitterphänotyps involviert ist, denn die Indikatorgene für ausdifferenzierte serotonerge Neurone wie *TpH*, *Sert*, *VMAT 2* und auch der Neurotransmitter (5-HT) selbst, sind in *Lmx1b*<sup>-/-</sup> Mäusen nicht detektierbar (CHENG ET AL., 2003).

Ein weiterer Faktor der in postmitotischen serotonergen Neuronen exprimiert wird ist der von HENDRICKS ET AL., (1999) erstmals in der Ratte beschriebene ETS-Transkriptionsfaktor *Pet-1*. Der Phänotyp der *Pet-1* KO-Maus ist durch den Verlust von etwa 80% der serotonergen Neuronen gekennzeichnet (HENDRICKS ET AL., 2003). *mPet-1* konnte in der *Lmx1b* Null-Mutanten nicht detektiert werden (DING ET AL., 2003). Diese Resultate deuten darauf hin, dass *mPet-1* in der serotonergen Signaltransduktionskaskade stromabwärts von *Lmx1b* agiert. Die Daten von CHENG ET AL., (2003) kontrastieren jedoch die Ergebnisse von DING ET AL., (2003), denn in frühen Entwicklungsstadien konnte *mPet-1* eindeutig in der *Lmx1b*<sup>-/-</sup> Maus detektiert werden. Somit und aufgrund ihrer Resultate aus *in ovo* Elektroporationen agiert *mPet-1* nicht stromabwärts von *Lmx1b* sondern kann auf der gleichen transkriptionellen Ebene in der Signaltransduktionskaskade stromabwärts von *Nkx2.2*, positioniert werden (ABB.:8) Mittels der *in-ovo* Elektroporation konnte gezeigt werden, dass eine Kombination der Faktoren *Nkx2.2*, *Lmx1b* und *Pet-1* im Rückenmark des Hühnchens 5-HT positive Zellen ektopisch induziert (CHENG ET AL., 2003). Dies lässt vermuten, dass *mPet-1* eine wichtige Rolle bei der Induktion terminaler serotonerger Marker (*Sert*, *TpH*, 5-HT) spielt.



**ABB.: 8 DIE SPEZIFIZIERUNG SEROTONERGER NEURONEN**

Die Graphik verdeutlicht auf genetischer Ebene die Signaltransduktionskaskade zur Spezifizierung der serotonerger Neuronen im Rhombencephalon. Diese anatomische Struktur ist grün dargestellt. Die

**ABB.: 8** serotonergen Neuronen sind rot markiert. Das genetische Netzwerk zur Spezifizierung serotonerger Neuronen ist hellblau dargestellt. Faktoren die links oder über einem Pfeil stehen induzieren / reprimieren Faktoren die rechts oder unter einem Pfeil stehen. vMn, viscerale Motorneurone, MHO, Mittel-/Hinterhirnorganisator

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die Spezifizierung von serotonergen Neuronen auf genetischer Ebene mittlerweile gut verstanden wird. Dennoch ist dieses genetische Netzwerk nicht völlig aufgeklärt. So ist beispielsweise nicht bekannt in welchem Ausmaß die serotonergen, postmitotischen Marker (Sert, Tph und 5-HT) die bisher bekannten *Upstream*-Faktoren (Nkx2.2, Gata-2/-3) für Ihre Aktivierung und Funktion benötigen oder ob noch bisher unbekannte Faktoren notwendig sind. Weiterhin ist unbekannt ob oder wie *Lmx1b*, *Gata-2/-3* und *mPet-1* in parallelen Induktionswegen bei der Aktivierung von postmitotischen serotonergen Marker wie Sert, Tph und 5-HT interagieren.

## 2.5 ZIELSETZUNG DER ARBEIT

Ziel meiner Arbeit, war zunächst das homologe *mPet-1* Gen der Maus zu identifizieren, zu charakterisieren, und eine detaillierte Expressionsanalyse zu erstellen. Wir konnten zeigen, dass der Ets-Transkriptionsfaktor mPet-1 der früheste Marker für serotonerge Neuronen ist (PFAAR ET AL., 2002). Aufgrund dieser Daten wurde die Hypothese erstellt, dass *mPet-1* instrumentell an der Spezifizierung serotonerger Neuronen beteiligt sein könnte und deshalb ein transgenes Mausmodell generiert. Indem die *mPet-1* cDNA unter die Kontrolle des *En-1* Promotors gebracht wurde entstand eine transgene Maus die *mPet-1* ektopisch in der Mittel-/Hinterhirnregion während der gesamten Embryonalentwicklung und in der adulten Maus exprimiert. So war es möglich, unsere Hypothese, ob *mPet-1* instrumentell an der Etablierung des serotonergen Neurotransmitterphänotyps beteiligt ist, experimentell in der Maus zu überprüfen. Dieses in vivo Modell stellt keine Rekapitulation der zwischenzeitlich publizierten Elektroporationsversuche im Hühnchen dar, sondern ist durch die sich häufenden Hinweise auf Speziesunterschiede zwischen Hühnchen und Maus bezüglich der Induktion serotonerger Neuronen, notwendig geworden. Weiterhin sollten durch dieses in vivo Modell, in welchem *mPet-1* vor allem auch in r1 überexprimiert wurde, neue bzw. erste Erkenntnisse bezüglich der Spezifizierung von serotonergen Neuronen in r1 erhalten werden, die sich wie beschrieben von jenen in r2,3 und r5-7 unterscheiden.

### 3 ERGEBNISSE

---

#### 3.1 IDENTIFIZIERUNG UND CHARAKTERISIERUNG DES *MPET-1* GENS DER MAUS

Ursprünglich wurde die *Pet-1* (PC12 ets-factor 1) cDNA von FYODOROV ET AL., 1998 (GenBank acc. no. U91679) aus PC12-Zellen, einer Tumorzelle, die von chromaffinen Zellen der Rattennebenniere abstammt, isoliert. Die cDNA des homologen, humanen Gens *FEV* wurde von PETER ET AL., 1997 (GenBank acc. no. NM\_144753) kloniert. Die somit zur Verfügung stehenden Sequenzen zweier Spezies ermöglichte es, das bisher unbekannte *mPet-1* ETS-Transkriptionsfaktorgen der Hausmaus (*Mus musculus*) zu identifizieren. Degenerierte Oligonukleotide wurden von der Rattensequenz abgeleitet und mittels RT-PCR konnte ein 550 bp großes Fragment amplifiziert werden (ABB.: 9). In der vergleichenden Sequenzanalyse erwies sich, dass dieses Fragment zu 86% der Basenabfolge der 3'UTR des *Pet-1* Gens der Ratte entspricht und gegenüber dem humanen Ortholog *FEV* zu 56% identisch ist (DATEN NICHT GEZEIGT). Dieses Fragment wurde als eine *in-situ* Probe eingesetzt, um Expressionsstudien an der Maus durchzuführen und um eine genomische  $\lambda$ -Phagenbibliothek abzusuchen. Ein positiver Phagenklon mit einer Größe von 7.128 bp wurde isoliert und sequenziert. Ausgehend von dieser genomischen Sequenz wurden mehrere Sets genspezifischer *Primer* synthetisiert, die gesamte *mPet-1* cDNA (ABB.: 9) amplifiziert und TA-kloniert. Als *Template* für die RT-PCR Reaktionen wurde Gesamt-RNA eingesetzt, die aus Mittel-/Hinterhirngewebe von Embryonen des Alters E15,5 präpariert wurde. Die genomische Organisation von *mPet-1* (ABB.: 10) leitete sich aus dem Vergleich der cDNA-Sequenz (ABB.: 9) mit der genomischen Sequenz (ABB.: 10) ab. Das im Mausgenom auf Chromosom 1, Bande C3, in einer einzelnen Kopie vorliegende *mPet-1* Gen (ENSEMBL MOUSE GENOME SERVER) besteht aus insgesamt 3 Exons und erstreckt sich über einen Abschnitt von 3.895 kb (ABB.: 10). Die Transkriptionsinitiationstelle wurde durch den Nachweis einer TATA-Box in der Promoter/Enhancer Region 49 bp stromaufwärts, vom ersten Exon, kartiert (ABB.: 9, 10). Das *polyA*-Signal zur Terminierung der Transkription befindet sich auf Exon 3 (ABB.: 9, 10). Interessanterweise, konnte kein RT-PCR Produkt amplifiziert werden, das der 5'-Sequenz des Rattengens entspricht, wenn *Primer* stromaufwärts von unserer designierten 5'UTR und *Primer* aus Exon 2 oder

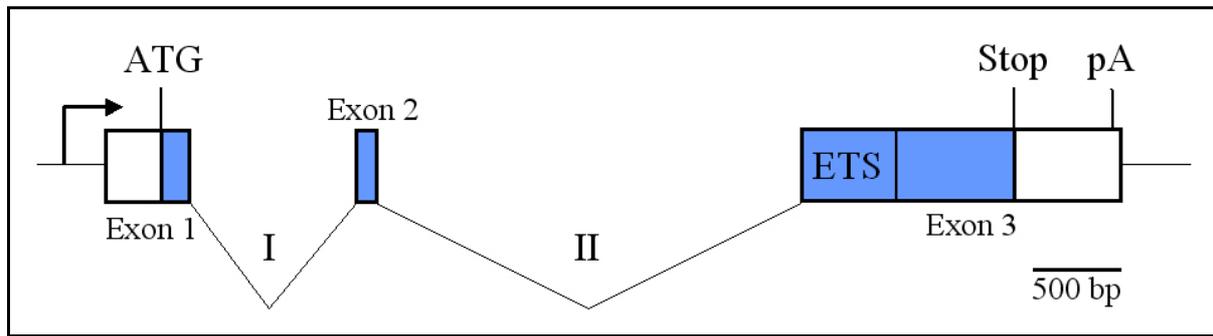
Exon 3 verwendet wurden. Das zeigt, dass obwohl beide Spezies der Familie der Rodentia angehören, erhebliche Unterschiede in der 5'-Sequenz und somit im Protein aufweisen.

TTGTAGCTGG	GAGCATCGCT	CCAGGACCCC	CTCCCTCCCC	GCCACACCCT	GGCTGCCCCG	60
TCCTGCCAGG	CCTTGCCGGA	CCCGGCGGCG	TCTACTCTTC	CCTGTCACCC	ACAGTCGCCA	120
CGGGCGGGGA	TCGGCACCCC	AAGCGCAAAG	<b>CTGAC</b> GTGCC	CCCCCGTGC	CATCCCCCCC	180
ATCTCCCACC	GCCCAGTCCC	CGGCAGCG	<u>AT</u> <u>GAGACAGAGC</u>	GGCACCTCCC	AGCCCCTGCT	240
<u>GATCAACATG</u>	<u>TACCTGCCAG</u>	<u>ATCCCCGTCG</u>	<u>AGATGGTCTT</u>	<u>TTTAAGGAAG</u>	<u>GGAAGAGCCC</u>	300
GAGCTGGGGG	CCGCTGAGCC	CCGCGGTACA	GAAAGGCAGC	<b>GGGCAGATCC</b>	<b>AGTTGTGGCA</b>	360
<b>GTTTCTCCTG</b>	<b>GAGCTGCTGG</b>	<b>CAGATCGCGC</b>	<b>GAACGCCGGT</b>	<b>TGCATCGCGT</b>	<b>GGGAGGGCGG</b>	420
<b>CCACGGCGAG</b>	<b>TTCAAGCTCA</b>	<b>CCGACCCGGA</b>	<b>CGAGGTGGCG</b>	<b>CGGCGCTGGG</b>	<b>GCGAGCGCAA</b>	480
<b>GAGCAAGCCT</b>	<b>AACATGAACT</b>	<b>ACGACAAGCT</b>	<b>AAGTCGCGCG</b>	<b>CTGCGCTACT</b>	<b>ACTACGACAA</b>	540
<b>AAACATCATG</b>	<b>AGCAAGGTGC</b>	<b>ACGGCAAGCG</b>	<b>CTACGCCTAC</b>	<b>CGCTTTGACT</b>	<b>TCCAGGGCCT</b>	600
GGCGCAGGCT	TGCCAGCCAC	CACCCGCGCA	CGCCCACGCC	GCTGCGGCCG	CCGCCGCCGC	660
CGCTGCGGCC	GCCCAGGACG	GCGCCCTCTA	CAAGCTCCCG	GCCGGCCTGG	CCCCGCTGCC	720
CTTCCC GGCC	CTATCCAAAC	TCAACTTGAT	GGCAGCTTCG	GCGGGCGTTG	CGCCC GCTGG	780
TTTCTCCTAC	TGGCCTGGCC	CGAACGCCAC	CGCCGCTGCC	GCCGCCACCG	CCGCGCTCTA	840
CCCCACCCCG	GGCTTG CAGC	CCCCTCCCGG	GCCCTTCGGC	GCAGTGGCGG	CAGCTTCGCA	900
<u>CTTGGGGGGT</u>	<u>CATTATCACT</u>	<u>AGACGGGGAC</u>	<u>GGCCGGGTAC</u>	<u>AGCGGGGCCT</u>	<u>CTCTCACATG</u>	960
<u>GCCCAGTGAC</u>	<u>CAATCCCATC</u>	<u>CTCATCTCG</u>	<u>GAGGAGCCCC</u>	<u>GAAGCTTTCC</u>	<u>CCGACGTTCC</u>	1020
<u>TTTAACACAG</u>	<u>ATTTCAATTG</u>	<u>AGCAGCCGCG</u>	<u>CCCAGCCCAG</u>	<u>GGAAGAAAGG</u>	<u>ATGGGAAACC</u>	1080
<u>CCCGAGGTCT</u>	<u>TCCTTGAACA</u>	<u>TCAGGCTTCC</u>	<u>AGGCCCCGTT</u>	<u>ATCTTCGCCC</u>	<u>CAGGAAGGGT</u>	1140
<u>GCATGGGCTC</u>	<u>CCACTTTAAT</u>	<u>TTTTCTCTTC</u>	<u>CAAGTCTCCA</u>	<u>GATTCTGGAA</u>	<u>CTCCCGTGTC</u>	1200
<u>TTTTTCTTTT</u>	<u>CTCACTTGCA</u>	<u>CCCCTGCACC</u>	<u>TCGTTATGAC</u>	<u>CCCTATTTTT</u>	<u>CTGGGATTTT</u>	1260
<u>CTTGGTCCTC</u>	<u>ATTTTCTGAC</u>	<u>TCTCTCCAC</u>	<u>AACCCACTCC</u>	<u>AAAAGGTAGT</u>	<u>ACCTCAAGGC</u>	1320
<u>TTCTCGCACT</u>	<u>CCCCTATTTC</u>	<u>CTCGGGATAT</u>	<u>GAGAAGCCTC</u>	<u>GATAAACATC</u>	<u>TCTGCCGTTC</u>	1380
<u>CCCATCCCTA</u>	<u>TATCAACACT</u>	<u>CTGGCTTCCC</u>	<u>TTTCTCCCAT</u>	<u>ATCACACTCT</u>	<u>GGCCAAGGA</u>	1440
<u>CCCCAGCCTG</u>	<u>TATATATCCC</u>	<u>TTTCAGCCCC</u>	<u>ATTAAAGCTC</u>	<u>CCAAGCGCC</u>		1489

#### ABB.: 9 DIE *MPET-1* cDNA

Die codierende Sequenz ist blau, die 5'UTR sowie die 3'UTR schwarz dargestellt. Start- und Stopcodon sind doppelt unterstrichen und wie die Ets-Domäne fettgedruckt. Das poly-A Signal ist rot markiert. Die als *in-situ* Probe verwendete 3'UTR Sequenz ist wie die Exongrenzen unterstrichen. Ein Stopcodon (fettgedruckt) befindet sich 54 bp stromaufwärts und im gleichen Leserahmen wie das funktionelle ATG.

**ABB.: 10 GENOMISCHE ORGANISATION UND SEQUENZ DES *MPET-1* GENS**



gcccattccc	cgcggtgtctc	ctgggctgcg	gggcgcgggg	ggctgctggg	tgcgcttggc	60
tgaggcgcag	cgcgcttggag	actttattgc	gatgggaaga	taagaggggc	ggggcgggg	120
tctggggggc	cgaggcggcc	gcactttaat	taaaacggaa	attgcggccc	ctgcccgcgc	180
ggggccggag	ggttgcaage	ggcTTGTAG	CTGGGAGCAT	CGCTCCAGGA	CCCCCTCCCT	240
CCGCCACACC	CTGGCTGCCC	GCTCCTGCCA	GGCCTTGCCG	GACCCGGCGG	CGTCTACTCT	300
TCCCTGTCAC	CCACAGTCGC	CACGGGCGGG	GATCGGCACC	CCAAGCGCAA	AGCTGACGTG	360
CCCCCCCCGT	GCCATCCCCC	CCATCTCCCA	CCGCCAGTC	CCCGGCAGCG	<u>ATGAGACAGA</u>	420
<u>GCGGCACCTC</u>	<u>CCAGCCCCTG</u>	<u>CTGATCAACA</u>	<u>TGTACCTGCC</u>	<u>AG</u> gtaccagg	gaccagccgg	480
gggctggagg	caccaagacc	ctgggcggga	agtctaggtc	agggcgctgg	gcaagtctcg	540
tggaccaaaag	gaaggggacg	cttcagtgga	gttgctttgt	gagtggtgga	gagggactgc	600
tggttgcagt	ttggggcatt	cggggaacct	gcaaggtaga	cagccagctt	cggggtttcg	660
atgtgggtct	agaagacacg	cagattcagg	atcgtaggag	gttgaaagca	ggggtctctg	720
gcgcggtgga	ctcccggctc	cagccttgcc	cgaaggttgt	gatccgctgg	gcgtcgcccc	780
tgagccctca	agggctctca	ccttggctct	ccaagcctc	tcaccggccg	agacttccaa	840
gcaccctttt	tcctctttac	aaggaagggg	ctccgctcgc	tcagactcgg	ctagcgcgat	900
ccctctggg	ttttataagg	cttcagcggg	cccccttgga	aagcggattt	ctttttctct	960
ggacgcggtt	cctgacttgg	gcgctacgga	ggggctctgc	gccggctcgc	gtcgcagcct	1020
agcttgggga	ggaggagctg	gtgtcccgga	ccccccagaa	cactgcagcc	ccggggccctt	1080
tcggtcaaac	cctcaacttc	cgcatagggt	ctgcttgact	gttttcttct	gcgcccag <u>A</u>	1140
<u>TCCCGTCGGA</u>	<u>GATGGTCTTT</u>	<u>TTAAGGAAGG</u>	<u>GAAGAGCCCG</u>	<u>AGCTGGGGGC</u>	<u>CGCTGAGCCC</u>	1200
<u>CGCGGTACAG</u>	<u>AAAG</u> gtgagc	cggctggtgc	aacgggttga	tgcagacgac	tgtagtagat	1260
ggggcaaggg	tttgaaccac	agccactaga	cagagggaca	gagcggcgtg	caccccgcgt	1320
tatggataat	ataaggctgt	gggtcaaattg	tacagagggc	ttaacgtgtc	cattttctga	1380
gccccggtct	ggtgctaggt	tttcgggaca	ggtcaggctc	tgtcctccag	tcctttttct	1440
gtcaagtatg	gtttttccaa	gctttcgtgc	cctggccttt	ggaatccttt	tttttttttt	1500
tttttttttt	tggggggggg	taggttggtt	ggaataaact	ctagtacttc	ctggcaaggg	1560
ggaccagta	attactctcc	agccacccta	ggcctaaacc	ctagcctgtg	cttcccggta	1620
ccctgccga	acttgctgac	tgtaagccac	gccagcccta	gccattgtgt	ttgataccta	1680
ggtttgctgc	agtagatggc	cagcctggtt	gggtggtggc	atltcaattc	tttcccatag	1740
ctcctgcccc	agccagtacc	cttaatctca	taagaaggca	gaaaagatga	gacaggcaac	1800
tgctcttctc	tcccagaaag	agggaaaccgt	atcacttaac	agggacgggg	accaagtctc	1860
tattgttgct	ccggcttggg	ctcagatgca	ccttttaggc	caaagcttcc	caggatctga	1920
tctaaaccga	aatcctgggt	ccagaaattg	gggtgaaaac	tatgggggaa	aggaagcttt	1980
agggttctga	gtcagtgata	ctgaataggg	aggaggtgag	tctgttttat	tctagagagg	2040
aatgcggggg	ggggggggcag	tttgtctgct	taaggcttca	aaacaggaaa	gtgtgagttc	2100
tgggtcactc	acccccctac	acacacacac	cccttgctg	catatgacac	ttggccacta	2160
tcagttacc	tgagatctgt	aggaaaacca	gccaggaatc	cagcacaatc	cttttgcaat	2220
cctacctctt	tcttcgggat	tgcccaccac	caccctcccc	ggcagagttc	tggcatcttc	2280
cactgcagca	cagagatcag	cgcacctgga	gggtggggag	atgggagcct	ctgagagttg	2340
gtctcttttc	tcagtacacg	gagcttctct	ctgttcttct	tgtctggcat	atagtgcctc	2400
ttcaagctgg	cccagtttta	ctgtatgctt	ttgggtggta	gggactggtt	acttgctcgt	2460
ataggtgggg	ccaaggacct	tcactctacgt	gcataactga	ccattctgtc	tggatctctg	2520
gacaggacct	cagctgggtg	ggcagttcaa	cctcctgcac	ccggctggct	tgtaccgcac	2580

cgctgtgcag	tctttgcctt	aaataaagga	gactgggtcag	gggggtagga	gggtctggtg	2640
tctggtcctt	acctaggaaa	agcccagctc	cgccaccgct	tctccacaga	agagacaagg	2700
tttctccaca	tgcaaacac	cacaaaacaa	tgtgccccag	gtccttcaaa	atgaaagcct	2760
tttccgttgt	actctgctgg	tctacactgg	ttgactagct	gctttctgct	acacaacaag	2820
gacgcagcca	racgttcccc	ttaccctct	cccgaagtgg	gttgccwctg	gtttggattg	2940
ttttcttggt	tcccctccac	ccccaccct	ccctagttcc	aacctgcccc	agtccgtggc	3000
taactgctcc	cgttccccac	<u>ag</u> <b>GCAGCGGG</b>	<b>CAGATCCAGT</b>	<b>TGTGGCAGTT</b>	<b>TCTCCTGGAG</b>	3060
<b>CTGCTGGCAG</b>	<b>ATCGCGCGAA</b>	<b>CGCCGGTTGC</b>	<b>ATCGCGTGGG</b>	<b>AGGGCGGCCA</b>	<b>CGGCGAGTTC</b>	3120
<b>AAGCTCACCG</b>	<b>ACCCGGACGA</b>	<b>GGTGGCGCGG</b>	<b>CGCTGGGGCG</b>	<b>AGCGCAAGAG</b>	<b>CAAGCCTAAC</b>	3180
<b>ATGAACTACG</b>	<b>ACAAGCTAAG</b>	<b>TCGCGCGCTG</b>	<b>CGCTACTACT</b>	<b>ACGACAAAAA</b>	<b>CATCATGAGC</b>	3240
<b>AAGGTGCACG</b>	<b>GCAAGCGCTA</b>	<b>CGCCTACCGC</b>	<b>TTTGACTTCC</b>	<b>AGGGCCTGGC</b>	<b>GCAGGCTTGC</b>	3300
CAGCCACCAC	CCGCGCACGC	CCACGCCGCT	GCGGCCGCCG	CCGCCGCCGC	TGCGGCCGCC	3360
CAGGACGGCG	CCCTCTACAA	GCTCCCGGCC	GGCCTGGCCC	CGCTGCCCTT	CCCGGGCCTA	3420
TCCAAACTCA	ACTTGATGGC	AGCTTCGGCG	GGCGTTGCGC	CCGCTGGTTT	CTCCTACTGG	3480
CCTGGCCCCG	ACGCCACCGC	CGCTGCCGCC	GCCACCGCCG	CGCTCTACCC	CACCCGGGGC	3540
TTGCAGCCCC	CTCCCGGGCC	CTTCGGCGCA	GTGGCGGCAG	CTTCGCACTT	GGGGGGTCAT	3600
<b>TATCACTAG</b> A	CGGGGACGGC	CGGGTACAGC	GGGGCCTCTC	TCACATGGCC	CAGTGACCAA	3660
TCCCATCCTC	ATCCTCGGAG	GAGCCCCGAA	GCTTTCCCCG	ACGTTCCCTT	AACACAGATT	3720
TCATTGCAGC	AGCCGCGCCC	AGCCCAGGGA	AGAAAGGATG	GGAAACCCCC	GAGGTCTTCC	3780
TTGAACATCA	GGCTTCCAGG	CCCCGTTATC	TTCGCCCCAG	GAAGGGTGCA	TGGGCTCCCA	3840
CTTTAATTTT	TCTCTTCCAA	GTCTCCAGAT	TCTGGAACTC	CCGTGTCTTT	TTCTTTTCTC	3900
ACTTGCACCC	CTGCACCTCG	TTATGACCCC	TATTTTCTTG	GGATTTTCTT	GGTCCTCATT	3960
TTCTGACTCT	CTCCCACAAC	CCACTCCAAA	AGGTAGTACC	TCAAGGCTTC	TCGCACTCCC	4020
CTATTTCTCT	GGGATATGAG	AAGCCTCGAT	AAACATCTCT	GCCGTTCCCC	ATCCCTATAT	4080
CAAACTCTG	GCTTCCCTTT	CTCCCATATC	AACTCTGGC	CCAAGGACCC	CAGCCTGTAT	4140
ATATCCCTTT	CAGCCCCATT	AAAGCTCCCA	AGCGCC			4176

## ABB.: 10 GENOMISCHE ORGANISATION UND SEQUENZ DES *MPET-1* GENS

Die Genomische Organisation von *mPet-1* ist zur besseren Übersicht schematisch dargestellt. Die beiden Introns sind mit römischen Ziffern bezeichnet und der Promotor ist als Pfeil dargestellt. Detailinformationen können aus der genomischen Sequenz entnommen werden. Exonsequenzen sind groß- und Intronsequenzen kleingeschrieben. Exon 1 umfasst 262 bp, das kleine Exon 2 nur 75 bp und Exon 3 1154 bp. Mit 677 bp ist Intron I kleiner als Intron II mit 2348 bp. Die Exon/Intron Grenzen sind unterstrichen. Codierende Bereiche (711 bp) sind in blauer Schrift dargestellt, und die Ets-Domäne ist zusätzlich kursiv und fettgedruckt. Start- und Stopcodon sind ebenfalls fettgedruckt und doppelt unterstrichen. Ein Stopcodon, 54 bp stromaufwärts und im gleichen Leserahmen wie das funktionelle ATG ist fettgedruckt. Die 5'UTR zählt 208 bp, die 3'UTR 570 bp. Das polyA-Signal in der 3'UTR ist rot geschrieben. In der Promotor/Enhancer Region (unterstrichen) konnte eine TATA-Box (grüne Schrift) in Position 150 - 161 identifiziert werden.

### 3.2 ABLEITUNG DER PROTEINSTRUKTUR

Ein offener Leserahmen erstreckt sich, beginnend mit dem Translationsstartcodon (ATG) auf Exon 1, über 711 nt bis hin zum Stopcodon auf Exon 3. Im gleichen Leserahmen wie das funktionelle ATG befindet sich 54 bp stromaufwärts ein Stopcodon (ABB.: 9; 10). Interessanterweise unterscheidet sich die Initiation der Translation des Mausgens *mPet-1* von der des homologen Rattengens *Pet-1* (FYODOROV ET AL., 1998), ist aber identisch mit der äquivalenten Position im humanen Ortholog *FEV* (PETER ET AL., 1997) (ABB.: 11). Die abgeleitete, murine Aminosäuresequenz umfasst 237 Aminosäuren und ist zu 96% identisch mit der Primärstruktur von FEV (ABB.: 11).

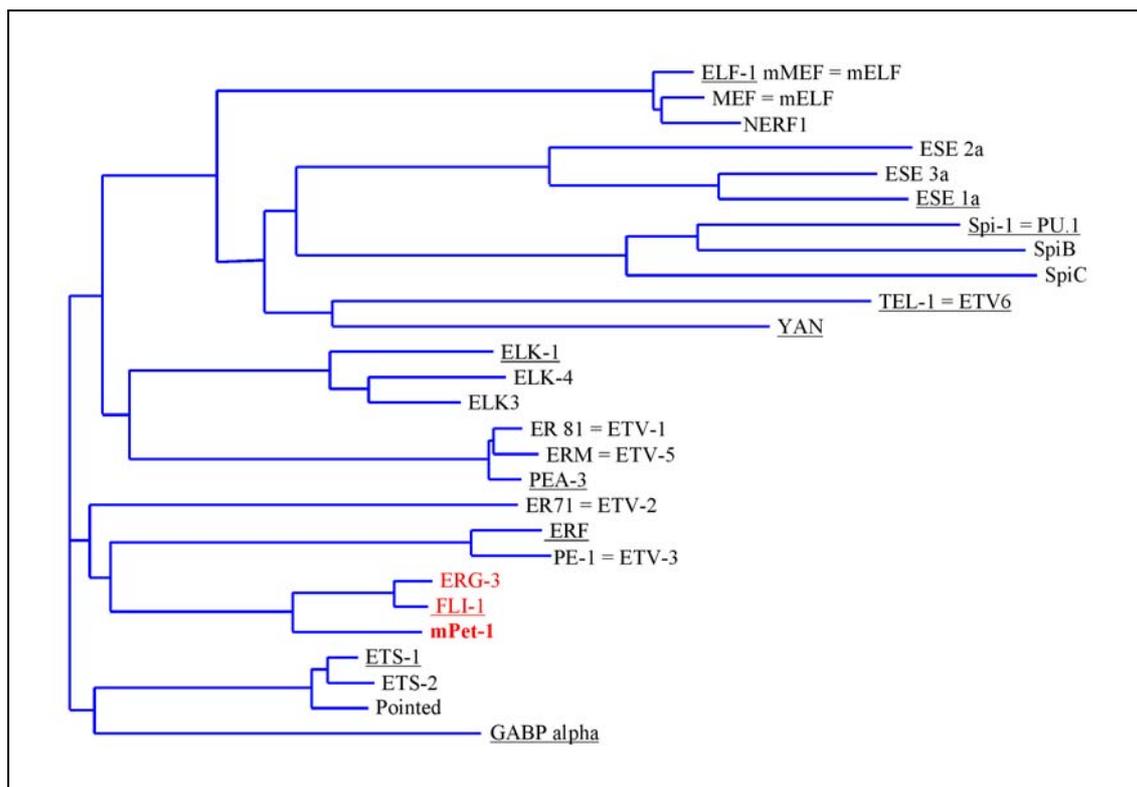
mPet-1 mouse	-----
FEV human	-----
Pet-1 rat	(1) MEDPGGAPLGERVFPAPHFPQPHPLTAHSSSTPAPGWAGMQLQDPLPPHHT
mPet-1 mouse	-----
FEV human	-----
Pet-1 rat	(51) LAARSRQALPDPAASTLPCHPQSPRAGIGTPSAKLTCPPVRSPPSPTAQS
mPet-1 mouse	(1) ---MRQSGT SQPLLINMYLPDPVGDGLFKEGKS PSWGPLS PAVQKSGQI
FEV human	(1) ---MRQSGASQPLLINMYLPDPVGDGLFKDGNPSWGPLS PAVQKSGQI
Pet-1 rat	(101) PAAMRQSGT SQPLLINMYLPDPVGDGLFKEGKS PSWGPLS PAVQKSGQI
mPet-1 mouse	(48) QLWQF LLELLADRANAGCIAWEGGHGEFKLTD PDEVARRWGERKSKPNMN
FEV human	(48) QLWQF LLELLADRANAGCIAWEGGHGEFKLTD PDEVARRWGERKSKPNMN
Pet-1 rat	(151) QLWQF LLELLADRANAGCIAWEGGHGEFKLTD PDEVARRWGERKSKPNMN
mPet-1 mouse	(98) YDKLSRALRYYYDKNIMSKVHGKRYAYRFD FQGLAQACQPPPAHAHAHAHA
FEV human	(98) YDKLSRALRYYYDKNIMSKVHGKRYAYRFD FQGLAQACQPPPAHAHAHAHA
Pet-1 rat	(201) YDKLSRALRYYYDKNIMSKVHGKRYAYRFD FQGLAQACQPPPAHAHAHAHA
mPet-1 mouse	(148) AAAAAAAAAQDGALYKLPAGLAPLPF PGLSKLNLMAASAGVAPAGFSYWPG
FEV human	(148) AAAAAAAAAQDGALYKLPAGLAPLPF PGLSKLNLMAASAGVAPAGFSYWPG
Pet-1 rat	(251) AAAAAAAAAQDGALYKLPAGLAPLPF PGLSKLNLMAASAGVAPAGFSYWPG
mPet-1 mouse	(198) EN-ATAAAAATAALYPTPGLQPPPGPF GAVAAASHLGGHYH (237)
FEV human	(198) EGPAATAAAAATAALYPSPSLQPPPGPF GAVAAASHLGGHYH (238)
Pet-1 rat	(301) EN-ATAAAAATAALYPTPGLQPPPGPF GAVAAASHLGGHYH (340)

**ABB.: 11 VERGLEICH DES MURINEN PROTEINS MPET-1 MIT DEM RATTENPROTEIN PET-1 UND DEM HUMANEN FEV**

Identische Aminosäuren in allen drei Proteinen sind blau unterlegt und die zu 100% konservierte Ets-Domäne ist unterstrichen. Das FEV-Protein unterscheidet sich nur in 8 Aminosäuren von mPet-1 (weiße Boxen). Das zusätzliche Prolin in Pos. 200 fehlt im Mausprotein und im Rattenprotein. Im Vergleich zu mPet-1 und FEV weist die Pet-1 Sequenz der Ratte 103 zusätzliche N-terminale Aminosäuren auf.

Das Molekulargewicht des mPet-1 Proteins beträgt 25,1 kD (VECTORNTI). Im Gegensatz hierzu, steht Gewicht und Größe des Rattenproteins, welches mit zusätzlichen 103 N-terminalen Aminosäuren eine Gesamtgröße von 340 Aminosäuren und ein Molekulargewicht von 35,4 kD aufweist (ABB.: 11). Mit einer computergestützten Strukturanalyse (SwissProt, Prosite) konnte eine evolutionär konservierte Ets-Domäne im N-terminalen Bereich des mPet-1 Proteins identifiziert werden (ABB.: 9-11). Somit ist mPet-1 als Ets-Transkriptionsfaktor klassifiziert. In NMR-Strukturanalysen wurde gezeigt, dass Ets-Domänen eine *winged helix-turn-helix* (*wHTH*) Topologie aufweisen (DONALSON ET AL., 1994,1996; LIANG ET AL., 1994; KODANTAPANI ET AL., 1996). Es ist deshalb davon auszugehen, dass die Ets-Domäne im mPet-1 Protein ebenfalls zu einer solchen Tertiärstruktur gefaltet ist.

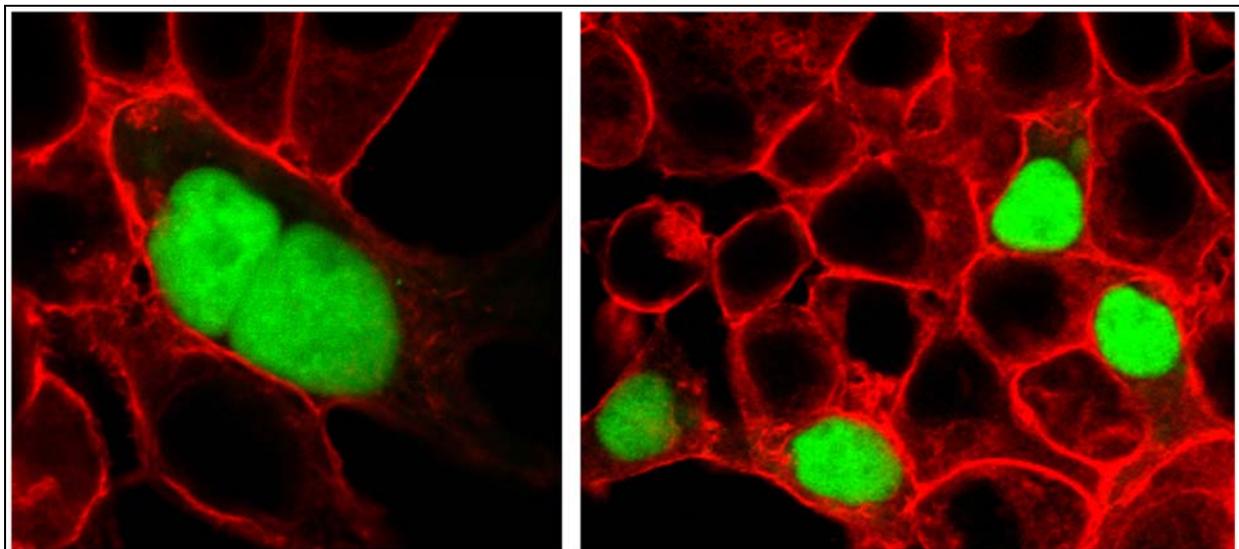
Um mPet-1 einer der zahlreichen Ets-Subfamilien zuordnen zu können, wurde ein phylogenetischer Stammbaum erstellt.



**ABB.: 12 PHYLOGENETISCHER STAMMBAUM AUSGEWÄHLTER ETS-FAKTOREN**

Proteine, die eine Ets-Subfamilie namentlich bezeichnen sind unterstrichen. mPet-1 kann im Distanzbaum der Fli-1 Familie zugeordnet werden. Der Berechnung des Distanzbaumes liegt ein multiples *Alignment* der Ets-Domänen dargestellter Proteine zugrunde. Die Distanz (blaue Linien) ist ein Maß dafür, wie viele Aminosäuren während der Evolution substituiert wurden und stellt somit die verwandtschaftlichen Beziehungen zwischen den Proteinen dar.

Hierbei konnte gezeigt werden, dass das mPet-1 Protein im Bereich der Ets-DNA-Bindungsdomäne eng mit den Fli-1 und ERG Proteinen verwandt ist, und dieser Subfamilie zuzuordnen ist (ABB.: 12). Für Fli-1 Proteine sind N- und C-terminale Domänen zur Transkriptionsaktivierung (RAO ET AL., 1993) und eine konservierte Pointed-Domäne (PNT), die eine helix-loop-helix (HLH) 3D-Struktur aufweist und Protein-Protein Interaktionen vermittelt charakteristisch (SETH UND PAPAS, 1990; KLAMBT, 1993; KIM ET AL., 2001). Diese Domänen konnten im mPet-1-Protein nicht identifiziert werden. Vielmehr wird der C-Terminus von mPet-1, wie auch bei FEV (PETER ET AL., 1997), von den Aminosäuren Alanin, Prolin, Leucin und Glycin dominiert und beinhaltet darüber hinaus eine kontinuierliche Folge von 12 Alaninen (ABB.: 12). Dieser prozentual hohe Anteil an Alanin im C-Terminus von mPet-1 ist ein Strukturmerkmal das für verschiedene Transkriptionsrepressoren, wie beispielsweise für das DR-1 Protein (Downregulator of transcription 1), typisch ist (YEUNG ET AL., 1994). Daher liegt die Vermutung nahe, dass mPet-1 möglicherweise als Transkriptionsrepressor agiert. Weitere Domänen konnten nicht identifiziert werden. Die nukleäre Lokalisation des mPet-1 Proteins konnte in subzellulären Lokalisationsstudien gezeigt werden, indem ein mPet-1/Egfp Fusionsprotein in HEK 293-Zellen transient überexprimiert wurde (ABB.: 13).



**ABB.: 13** NUKLEÄRE LOKALISATION DES MPET-1 PROTEINS

HEK-293 (*human epithelial kidney*) Zellen transfiziert mit einem *mPet-1/Egfp* Fusionstranskript. Konfokale Aufnahmen von dem im Nucleus lokalisierten Fusionsprotein (grüne Fluoreszenz). F-Actin des Cytoskeletts ist mit Phalloidin (rote Fluoreszenz) gegengefärbt.

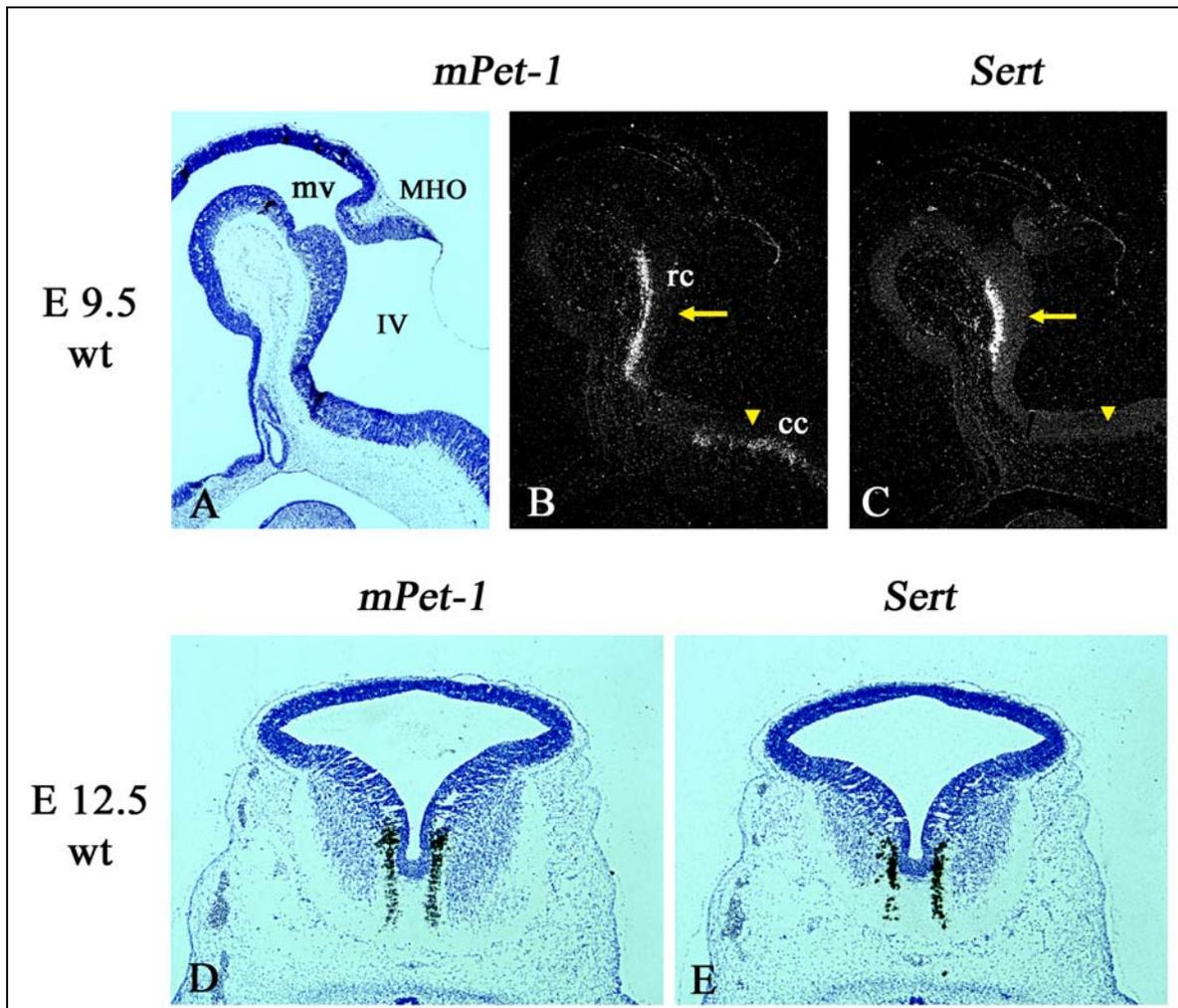
### 3.3 DIE EXPRESSION VON *MPET-1*

Trotz der erheblichen Unterschiede in der N-terminalen Sequenz, beider für Rodentia beschriebenen Gene (s.o.), stimmt das Expressionsprofil von *mPet-1* während der Embryonalentwicklung mit dem Expressionsmuster des Rattenhomologs *Pet-1* (HENDRICKS ET AL., 1999) weitgehend überein. Im Gehirn, ist *mPet-1* während der Embryonalentwicklung und in der adulten Maus spezifisch in den serotonergen (5-hydroxytryptaminergen, 5-HT) Neuronen exprimiert (ABB.: 14 – 16).

Die früheste Expression wurde im Stadium E11 (ABB.: 14 A, B) im rostralen *Cluster* (ABB.: 14 B, PFEIL) und zu diesem Zeitpunkt deutlich schwächer im caudalen *Cluster* (ABB.: 14 B, PFEILSPITZE) der serotonergen Neuronen des Hinterhirns detektiert. Der Serotonintransporter (*Sert*), ein präsynaptischer Rezeptor zur Wiederaufnahme von 5-HT nach erfolgter Transmitterfreisetzung, ist ebenfalls ein spezifischer Marker für serotonerge Neuronen. Ebenso wie *mPet-1* wird *Sert* zuerst im rostralen Cluster (ABB.: 14 C, PFEIL) detektiert. Jedoch ist bei E11 noch keine Expression in caudalen *Cluster* (ABB.: 14 C, PFEILSPITZE) sichtbar. Diese Expressionsdaten reflektieren das temporale Entwicklungsprofil serotonerger Neuronen (LEVITT AND MOORE, 1978; AITKEN UND TÖRK 1988) und indizieren, daß *mPet-1* eher als *Sert* exprimiert wird. Die Analyse konsekutiver Schnitte zeigte, dass im Entwicklungsstadium E12,5 die Expression von *mPet-1* und *Sert* in den Raphe Kernen präzise colokalisiert ist (ABB.: 14 D, E). Bei E16,5 beschreibt die mRNA-Expression von *mPet-1* und *Sert* eindeutig Kerngebiete der ventralen Hinterhirnregion, die im adulten Gehirn als Raphe Nuclei bezeichnet werden (DAHLSTRÖM UND FUXE, 1964; TÖRK, 1990). Die Co-Expression beider Marker ist auf konsekutiven Schnitten deutlich zu erkennen (ABB.: 15 A-F). Auch postnatal, im Stadium PO, ist die Expression von *mPet-1* und *Sert* in den serotonergen Kernen coexistent (ABB.: 16 A-C). Weiterhin konnte in diesem Stadium gezeigt werden, dass Neurone des ventrobasalen Thalamus und des Genuculatums, zwar *Sert* transient exprimieren (ABB.: 16 E ) (HANSSON ET AL., 1998) um zu ihrer Entwicklung benötigtes 5-HT aufzunehmen, aber nicht *mPet-1* (ABB.: 16 D). TpH (Tryptophanhydroxylase) das limitierende Enzym der 5-HT Biosynthese ist in diesen Neuronen auch nicht exprimiert (DATEN NICHT GEZEIGT).

Neben den embryonalen Studien wurde auch das Expressionsprofil adulter Tiere untersucht. Die *mPet-1* Expression wird während der gesamten postnatalen Entwicklung bis hin zu adulten Stadien in den serotonergen Zellen der Raphe Kerne aufrecht erhalten und ist weiterhin mit *Sert* colokalisiert (ABB.: 16 F, G, H). Auf

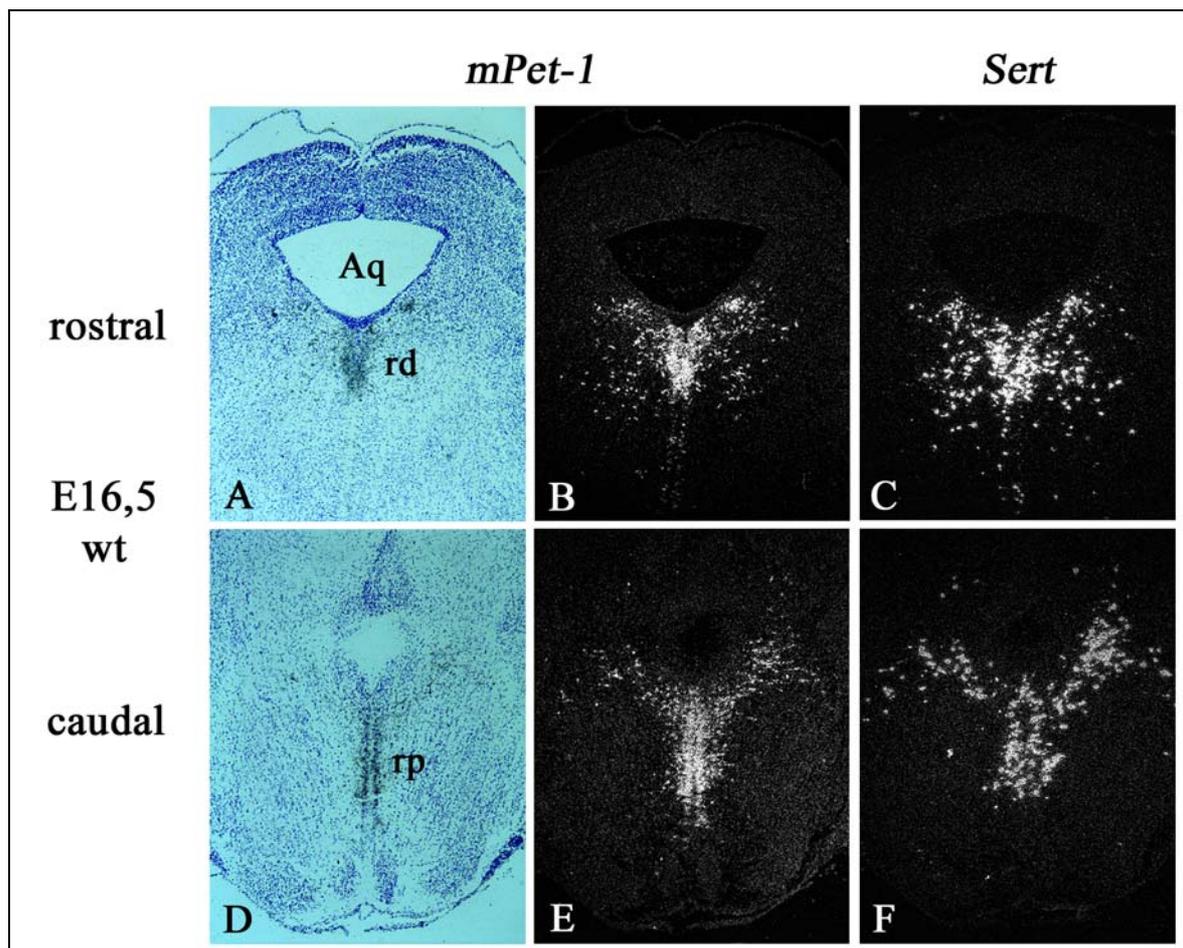
zellulärer Ebene konnte im adulten Tier gezeigt werden, dass alle *mPet-1* exprimierenden Zellen (ABB.: 16, SCHWARZE FÄRBUNG) auch *Sert* exprimieren (ABB.: 16, ROTE FÄRBUNG). Jedoch nicht alle *Sert* positiven Zellen sind auch positiv für *mPet-1*. Zusammenfassend repräsentiert *mPet-1*, im sich entwickelnden und im adulten Gehirn der Maus, einen spezifischen und darüber hinaus den frühesten Marker für die gesamte serotonerge Population des ZNS.



**ABB.: 14** *MPET-1* WIRD FRÜHER ALS *SERT* EXPRIMIERT UND IST BEI E12.5 MIT *SERT* PRÄZISE COLOKALISIERT

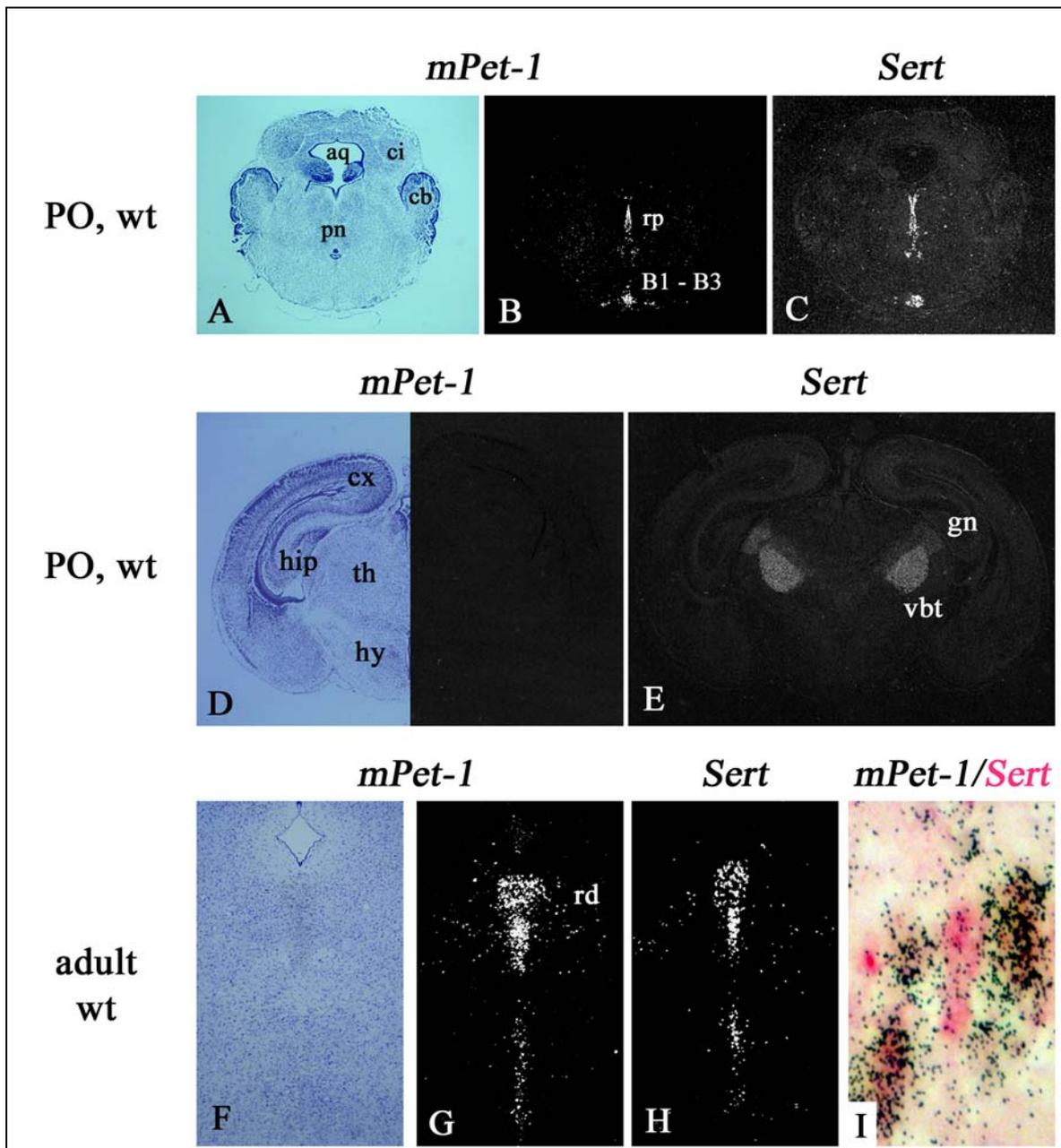
(A,B,C) *In-situ* Hybridisierungen mit der *mPet-1* und *Sert* Probe auf sagittalen Paraffinschnitten ( $8\mu\text{m}$ ) von wildtypischen Mausembryonen bei E11. (A,B) Korrespondierende Hell- und Dunkelfeldaufnahme; *mPet-1* ist im rostralen Cluster serotonerger Neuronen (rc, Pfeil) stark exprimiert und schwach im caudalen Cluster (cc, Peilspitze). (C) Konsekutive Dunkelfeldaufnahme;

**ABB.: 14** *Sert* ist ebenfalls in der rostralen Gruppe exprimiert (Pfeil), wohingegen in der caudalen Gruppe keine *Sert* Expression detektiert werden konnte (Pfeilspitze). **(D,E)** *In-situ* Hybridisierungen mit der *mPet-1* und *Sert* Probe auf konsekutiven, coronalen Paraffinschnitten (8 $\mu$ m) bei E 12.5. *mPet-1* und *Sert* sind im Nucleus raphe dorsalis (rd) präzise colokalisiert (Pfeile). **(A,D,E)** Nissl-Färbung. aq, Aquedukt; MHO, Mittel-/Hinterhirnorganisator; mv, mesencephaler Vesikel; sc, superiorer Colliculus; IV, vierter Ventrikel; wt, Wildtyp



**ABB.: 15** *MPET-1* UND *SERT* BESCHREIBEN BEI E16.5 DIE SEROTONERGEN KERNE

**(A-F)** Co-Expression von *mPet-1* und *Sert* auf coronalen Schnitten bei E16.5. **(A,D)** Färbung nach Nissl, Hellfeldaufnahmen; **(B,E)** die korrespondierenden und **(C,F)** die konsekutiven Dunkelfeldaufnahmen. Beide Gene sind im zukünftigen Nucleus raphe dorsalis (rd) sowie im Nucleus raphe pontis (rp) exprimiert. Aq, Aquedukt; wt, Wildtyp

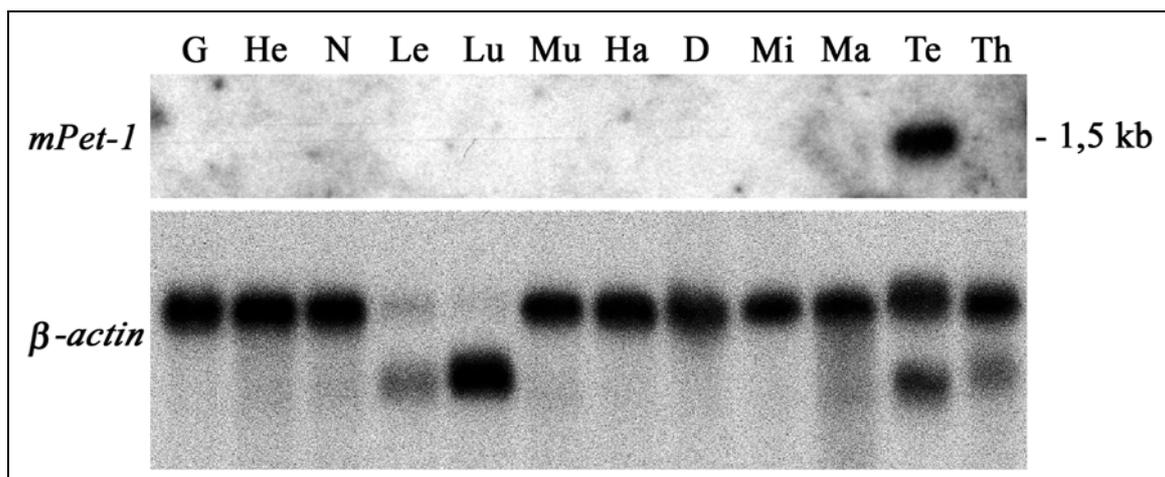


**ABB.: 16** *MPET-1* UND *SERT* IN DER VERGLEICHENDEN EXPRESSIONSANALYSE AN GEHIRNEN VON NEUGEBORENEN UND ADULTEN MÄUSEN

(A-C) Co-Expression von *mPet-1* und *Sert* auf coronalen Schnitten bei P0 und (F-H) im adulten Gehirn. (A,D,F) Färbung nach Nissl, Hellfeldaufnahmen; (B,G) die korrespondierenden und (C,E,H) die konsekutiven Dunkelfeldaufnahmen. (A-C) *mPet-1* und *Sert* sind bei P0 sowohl in den caudalen Gruppen (B1-B3) als auch im Nucleus raphe pontinus (rp) co-exprimiert. (D,E) Transient *Sert* exprimierende Neurone des ventrobasalen Thalamus (vbt) und des Geniculatums (gn) exprimieren *mPet-1* nicht. (F-H) Im adulten Gehirn besteht die Co-Expression beider Gene weiterhin. (I) Radioaktive *in-situ* Hybridisierung (*mPet-1*, schwarze Färbung) kombiniert mit einer nicht radioaktiven Methode (*Sert*, rote Färbung). Auf zellulärer Ebene wird deutlich, dass zwar alle *mPet-1* exprimierende Zellen auch *Sert* →

**ABB.: 16** exprimieren aber nicht alle *Sert* positiven Zellen auch positiv für *mPet-1* sind. aq, Aqueduct; cb, Cerebellum; ci, Colliculus inferior; cx Cortex; hip, Hippocampus; hy; Hypothalamus; pn, Pons; rd, Nucleus raphe dorsalis; th, Thalamus

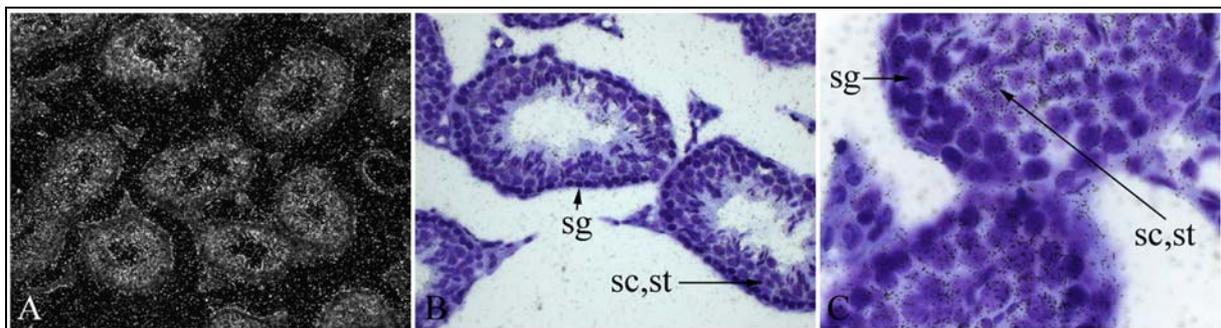
Weiterhin konnte gezeigt werden, dass *mPet-1* in ES-Zellen der Maus exprimiert ist, denn die codierende Sequenz der *mPet-1* cDNA, für die Konstruktion des *Targeting*-Vektors benötigt wurde, konnte mittels RT-PCR aus Gesamt-RNA von 129-SvJ ES-Zellen amplifiziert werden (s. 5.7.13). In der *Northern-Blot* Analyse (ABB.: 17) verschiedener adulter Gewebe konnte die cerebrale *mPet-1* Expression, im Gegensatz zu der *in-situ* Hybridisierung (ABB.: 16 G, I), nicht nachgewiesen werden. Weiterhin ist aus ABB.: 17 zu entnehmen, dass *mPet-1* in Testes exprimiert wird. Mit einer Größe von 1,5 kb entspricht diese Bande der Größe der kompletten cDNA (ABB.: 9) die durch RT-PCR isoliert wurde.



**ABB.: 17** **NORTHERN-BLOT ANALYSE**

Diese Abbildung zeigt die *Northern-Blot* Analyse an ausgewählten, adulten Geweben mit der 3'UTR *in-situ* Probe. Nur in Testes konnte ein 1,5 kB großes *mPet-1* Transkript detektiert werden. Mit dieser Methode konnte eine Expression im adulten Gehirn nicht nachgewiesen werden. Die Membrane wurde mit einer  $\beta$ -Actin Probe hybridisiert um die Qualität und Quantität der aufgetragenen polyA<sup>+</sup> RNA sicherzustellen. G, Gehirn; He, Herz; N, Niere; Le, Leber; Lu, Lunge; Mu, Muskel; Ha, Haut; D, Darm; Mi, Milz; Ma, Magen; Te, Testes; Th, Thymus.

Um die Expression in den männlichen Reproduktionsorganen genauer zu untersuchen wurde eine *in-situ* Hybridisierung durchgeführt. *mPet-1* ist im epithelialen Gewebe der Tubuli seminiferi exprimiert. In den Spermatogonien ist *mPet-1* im Vergleich zu der starken Expression in den Spermatozyten und den Spermatiden nur schwach exprimiert. (ABB.: 18).



**ABB.: 18** *MPET-1* EXPRESSION IN TESTES

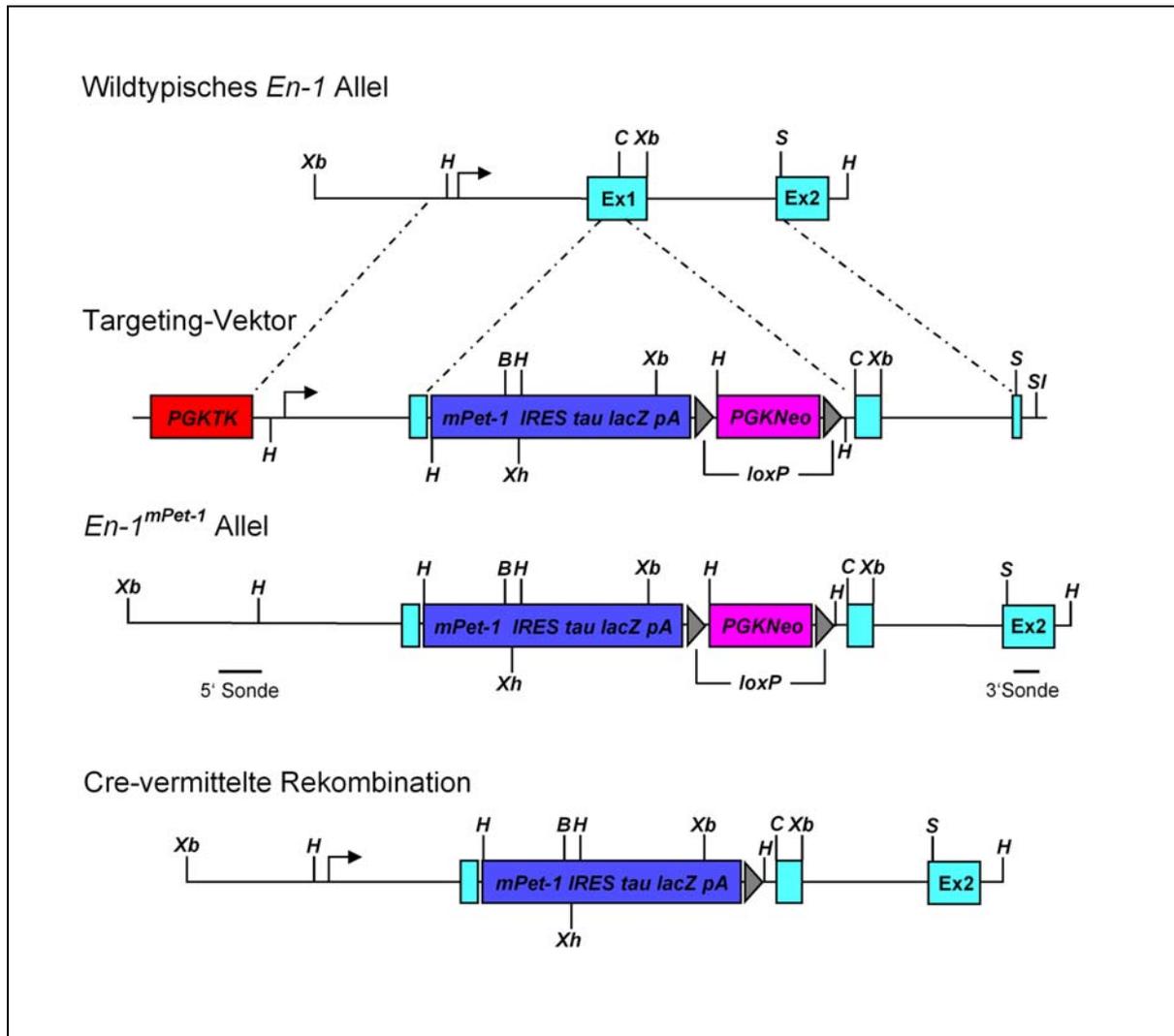
(A) Dunkelfeldaufnahme, (B,C) Hellfeldaufnahmen, Nissl-Färbung. Die Spermatogonien (sg) grenzen das Epithel der Tubuli seminiferi von deren Basalmembran ab, und zeigen nur eine schwache *mPet-1* Expression im Gegensatz zu der starken Expression in den Spermatozyten (sc) und den Spermatiden (st).

### 3.4 HERSTELLUNG DER MAUSMUTANTEN

Zu Beginn dieses Projektes war nur sehr wenig über den molekularen Mechanismus, der die Entwicklung serotonerger Neuronen kontrolliert, bekannt. Wie bereits beschrieben (ABB.: 9), ist *mPet-1* der früheste, spezifische Marker für die zentralen, serotonerger Neuronen die sich im ventralen Hinterhirn unmittelbar caudal vom MHO entwickeln. Aufgrund dessen, wurde angenommen, dass der Ets-Transkriptionsfaktor *mPet-1* eine wichtige Rolle bei der Spezifizierung dieser Neurone spielen könnte.

#### 3.4.1 TARGETING-STRATEGIE

Um diese Hypothese zu überprüfen, wurde in der vorliegenden Arbeit eine *Knock-In* Strategie verfolgt (ABB. 19). Indem die codierende Sequenz der *mPet-1* cDNA unter die Kontrolle des *Engrailed-1* (*En-1*) Promoters gebracht wurde, entstand eine transgene Maus die *mPet-1* in allen Zellen exprimiert in denen das *En-1* Gen aktiv ist.



**Abb.: 19 Targeting-Strategie**

Schematische Darstellung der homologen Rekombination des *Targeting*-Vektors mit dem genomischen *Engrailed-1* (*En-1*) Locus. 5'-Arm und 3'-Arm sind durch gestrichelte Linien gekennzeichnet. Nach erfolgter homologer Rekombination wird die *mPet-1 IRES tau lacZ* Expression durch den *En-1* Promotor (abgewinkelter Pfeil) reguliert. Die von zwei *loxP* Seiten (graue Dreiecke) flankierte *PGKNeo*-Selektionskassette kann durch das Einkreuzen einer Mauslinie, die Cre ubiquitär exprimiert, entfernt werden. Die zur *Southern-Blot* Analyse verwendeten 5'- und 3'-Sonden sind durch schwarze Striche dargestellt. *PGKNeo*, Neomycinresistenzgen mit Phosphoglycerat-kinase Promotor; *PGKTK*, Thymidinkinasegen mit PGK-Promotor; Restriktionsschnittstellen: *Xb*, *XbaI*; *H*, *HindIII*, *B*, *BamHI*; *Xh*, *XhoI*; *C*, *ClaI*; *S*, *SacI*; *Sl*, *Sall*

Das hat einerseits zur Folge, dass *mPet-1* während der kritischen Phase der Entwicklung serotonerger Neuronen ektopisch über die Mittel-/Hinterhirngrenze hinweg in ventralen und dorsalen Strukturen des caudalen Mesencephalons sowie in

Bereichen des Metencephalons aus denen sich Pons und Cerebellum entwickeln, exprimiert wird. Andererseits wird von dem mutierten Allel keine *En-1* mRNA mehr erzeugt: d.h. die *En-1<sup>mPet-1/+</sup>* Mutante ist gleichzeitig ein heterozygoter *En-1 Knock-out*. Neben *mPet-1* wurde auch die interne Ribosomen-Eintrittsstelle des Encephalomyocarditis-Virus (EMCV-*IRES*) (KIM ET AL., 1992) sowie eine rekombinante *tau-lacZ*-Kassette (CALLAHAN UND THOMAS, 1994) unter die Kontrolle des *En-1* Promotors gebracht. Die *IRES*-Sequenz enthält eine Vielzahl von Startcodons in allen Leserahmen und ermöglicht es den Ribosomen an die mRNA zu binden und die Translation des *tau-lacZ* Reportergens ausgehend von dieser Stelle zu initiieren. Somit konnte die Expression des Transgens durch die Aktivität der bakteriellen  $\beta$ -Galaktosidase überprüft werden ohne die biologische Funktion des ektopisch generierten mPet-1 Proteins zu beeinträchtigen. Die Fusion von tau, einem Microtubuli assoziierten Protein (MAP), mit lacZ erlaubt weiterhin die Darstellung neuronaler Projektionen, weil das Fusionsprotein in die axonalen Fortsätze transportiert wird und tau an dort vorhandene Microtubuli bindet. Der *Targeting*-Vektor enthielt weiterhin Sequenzabschnitte des *En-1* Gens die zur Homologen Rekombination am Genort dienen. Der 5' Homologie-Arm umfasst ein 4,2 kb großes *En-1* Promotorfragment. Als 3' Homologie-Arm wurde ein 4 kb großes *Clal/SacI* Fragment verwendet (HANKS ET AL., 1995).

Außerdem enthielt der Vektor zwei Selektionskassetten. Zur Negativselektion diente die im linearisierten *Targeting*-Vektor endständig vorliegende *PGKTK*-Kassette. Sie sollte nach homologer Rekombination abbrechen. Somit ist *PGKTK* nicht ins Genom integriert und das Nukleotid-Analogon Gangcyclovir kann nicht zu einem für ES-Zellen toxischen Produkt umgesetzt werden (MANSOUR ET AL., 1988; ÜBERSICHT BEI ZIMMER, 1992; BRADLEY ET AL., 1992; JOYNER (ED.), 1993). Zur Positivselektion von ES-Zell-Klonen in denen ein homologes Rekombinationsereignis stattfand, diente ein *PGKNeo*-Hybridgen bestehend aus dem ubiquitären Phosphoglycerat-Kinase-1 Promotor und der codierenden Sequenz des Neomycin-Phosphotransferase-Gens. In diversen Knock-out Experimenten wurde beobachtet, dass die bei der gezielten Mutagenese eines Genlocus eingeführte Neomycinresistenz die Expression benachbarter Gene und somit den Phänotyp des transgenen Tieres beeinflussen kann (OLSON ET AL., 1996; PHAM ET AL., 1996; FLOSS ET AL., 1996; BROCCOLI ET AL., 1999). Aus diesem Grund sollte die *Neo*-Kassette, nachdem die mutante Mauslinie etabliert ist, wieder entfernt werden. Dies war möglich indem die *Neo*-Kassette

zunächst mit sogenannten *loxP*-Rekombinationsschnittstellen flankiert wurde. Die *loxP*-Seiten bestehen aus zwei invers repetitiven Sequenzen mit je 13 bp, sowie einem 8 bp langen asymmetrischen *Spacer* und dienen der Cre-Rekombinase als Bindestelle. Dieses Protein des Bakteriophagen P1 katalysiert eine sequenz-spezifische, intramolekulare oder intermolekulare Rekombination von *loxP*-Schnittstellen (SAUER, 1993). Wird nun eine Mauslinie eingekreuzt, die das *Cre*-Rekombinasegen in Gameten exprimiert, erhält man Nachkommen bei denen die *Neomycinresistenz* aus dem jeweils mutierten Locus herausgeschnitten wurde (SCHWENK ET AL.,1995). Zur Negativselektion enthielt der *Targeting*-Vektor eine *PGKTK*-Kassette bestehend aus dem *Phosphoglycerat-Kinase-1* Promotor und der codierenden Sequenz des *Thymidinkinase*-Gens.

### 3.4.2 KLONIERUNG DES *TARGETING*-VEKTORS

Die Klonierungsschritte zur Konstruktion des *Targeting*-Vektors sind in ABB. 20 dargestellt.

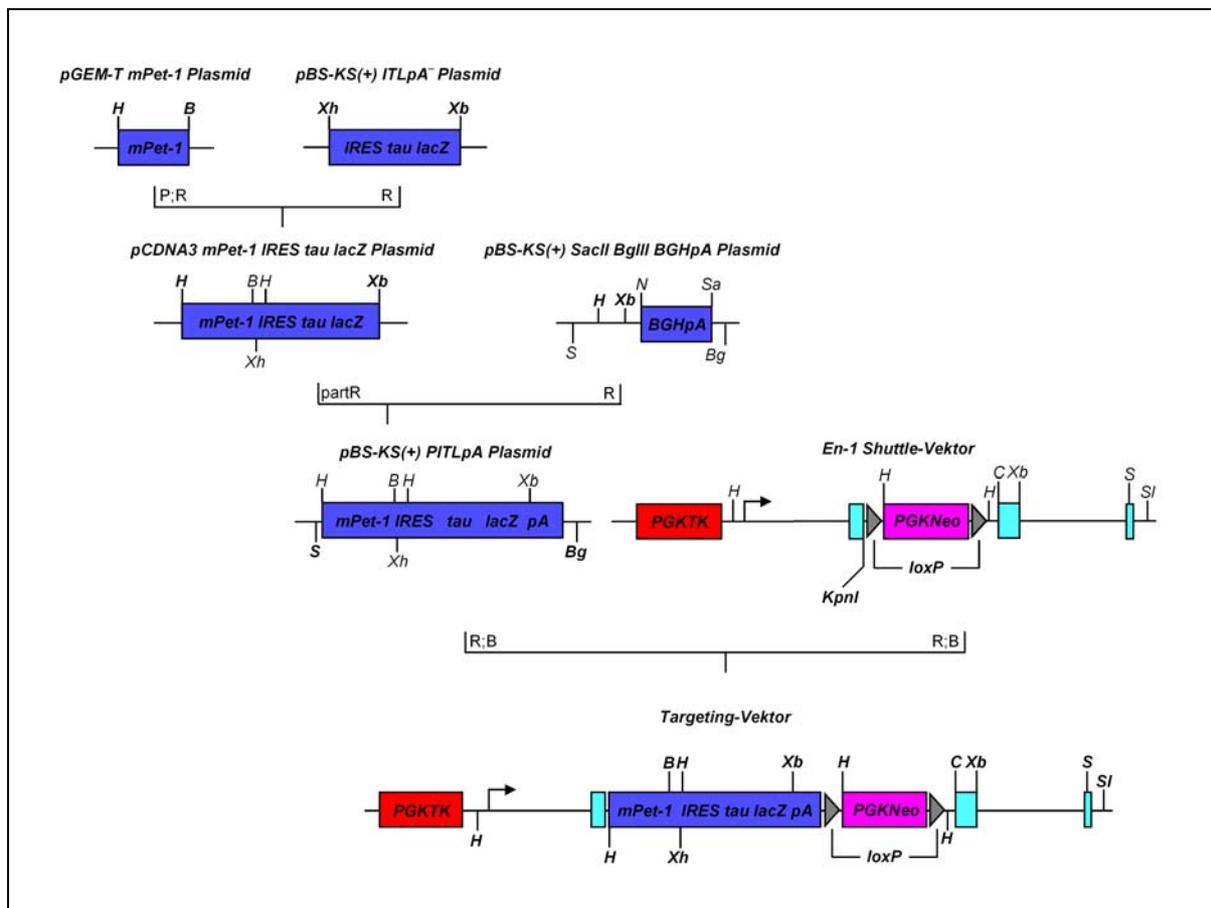
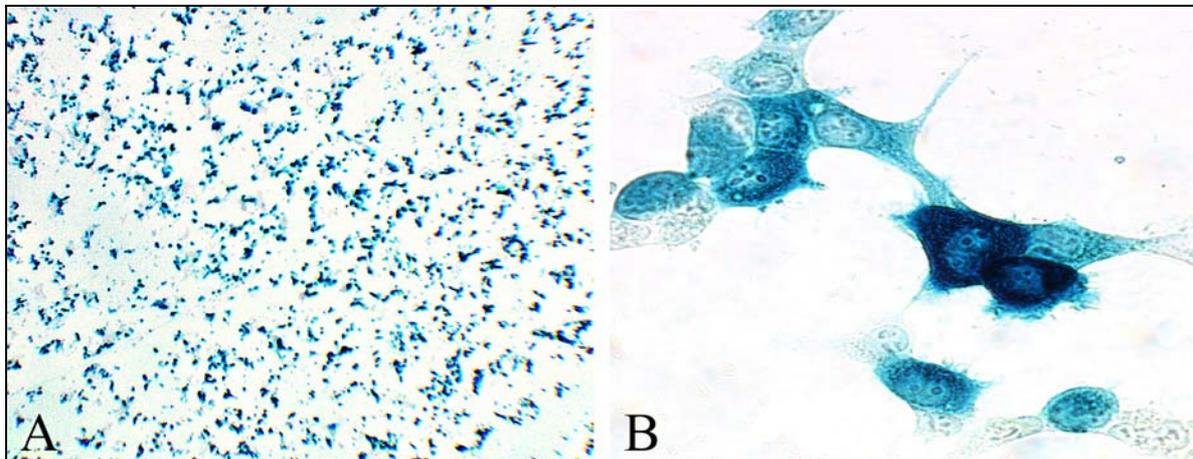


ABB.: 20 KLONIERUNGSSTRATEGIE DES *TARGETING*-VEKTORS →

**ABB.: 20 Klonierungsstrategie des *TARGETING*-VEKTORS**

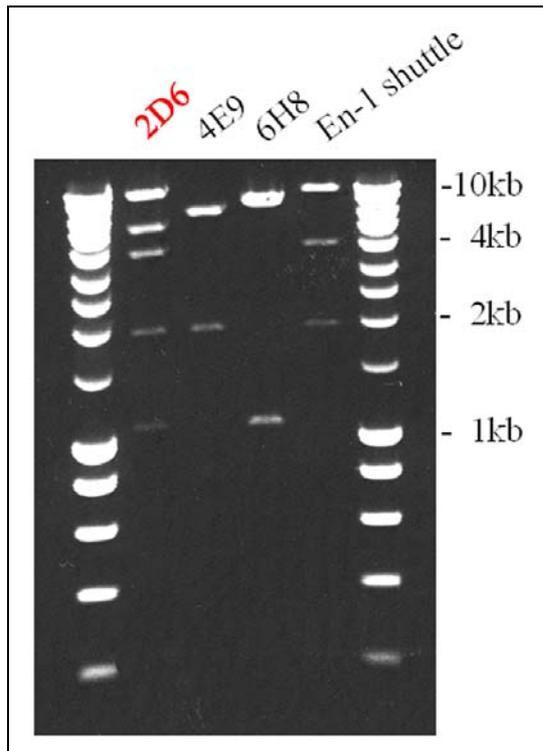
Der sukzessive Aufbau des *Targeting*-Vektors erfolgte wie im Text beschrieben. Die einzelnen Klonierungsschritte sind durch Klammern verdeutlicht. P, PCR; R, Restriktionsverdau; partR, partieller Restriktionsverdau; B, *Blunt-end ligation*; Restriktionsschnittstellen: *Bg*, *BgIII*; *Sa*, *SacII*; *Xb*, *XbaI*; *H*, *HindIII*, *B*, *BamHI*; *Xh*, *XhoI*; *C*, *ClaI*; *S*, *SacI*; *Sl*, *SalI*

Die codierende Sequenz der *mPet-1* cDNA wurde mit genspezifischen Primern mittels RT-PCR amplifiziert und TA-kloniert. Als Matrize wurde Gesamt-RNA aus 129 SvJ ES-Zellen isoliert um Isogenität zu gewährleisten, denn die homologe Rekombination erfolgte später in dieser ES-Zelllinie. Die codierende *mPet-1* Sequenz wurde mit Primern die eine *HindIII* und eine *BamHI* Schnittstelle enthielten reamplifiziert, einem Restriktionsverdau unterzogen und in den eukaryotischen Expressionsvektor *pCDNA3* subkloniert. Anschließend erfolgte die Klonierung der *IRES-tau-lacZ*-Kassette über die Restriktionsschnittstellen *XhoI* und *XbaI* in *pCDNA3*. Die Funktionsfähigkeit dieses intermediären Konstruktes, respektive der Reporter-kassette wurde durch den Nachweis der  $\beta$ -Galaktosidaseaktivität in HEK 293 Zellen nach der Transfektion des Konstruktes erbracht. (ABB. 21).

**ABB.: 21 FUNKTIONALITÄT DER REPORTERKASSETTE**

Zur Überprüfung der Funktionalität der Reporter-kassette wurden HEK 293 Zellen mit dem intermediären *mPet-1-IRES-tau-lacZ*-Konstrukt transfiziert und eine X-Gal Färbung durchgeführt. **(A)** Die Transfektionseffizienz lag bei ca. 90%. **(B)**  $\beta$ -Galaktosidaseaktivität konnte sowohl im Zellkern als auch im Zytoplasma detektiert werden.

Die mir freundlicherweise von Dr. Peter Mombaerts zur Verfügung gestellte Reporter-Kassette enthielt kein *poly-A* Signal zur Terminierung der Transkription. Weiterhin war aufgrund einer Schnittstelleninkompatibilität die Isolierung der *mPet-1 IRES-tau-lacZ*-Kassette zusammen mit dem *poly-A* Signal des *pCDNA3* Vektors nicht möglich. Aus diesen Gründen wurde zunächst ein *SacII*, *BglIII* *Polylinker* in den Phagemidvektor *pBS-KS(+)* eingefügt. Anschließend wurde ein PCR-generiertes *poly-A* Signal des bovinen Wachstumshormons (*BGH*, bovine growth hormon) über die Schnittstellen *NotI* und *SacII*, sowie das *mPet-1 IRES tau lacZ*-Fragment über *HindIII* und *XbaI* gerichtet in den *pBS-KS(+)* Vektor kloniert. Indem ein Restriktionsverdau mit den Enzymen *SalI* und *BglIII* durchgeführt wurde, konnte nun das gesamte rekombinante Fragment mit einer Größe von 6,2 kB isoliert und in den *En-1 3'-Shuttle*-Vektor kloniert werden, der die Homologiearme sowie die Selektionskassetten enthielt. Hierzu wurde der *En-1 3'-Shuttle*-Vektor mit *KpnI* linearisiert, und die kohäsiven Enden des Vektors und des Inserts einer Klenow-Reaktion unterzogen, um stumpfe Enden zu generieren. Nach erfolgter Ligation (s. 5.7.10.1) und Transformation (s. 5.7.10.5) wurden drei rekombinante Klone (2D6, 4E9, 6H8) mit einer radioaktiv markierten und spezifischen Probe für *tau* (TAB.: 4) mittels Koloniehybridisierung (s. 5.7.5.4; 5.7.6) identifiziert (DATEN NICHT GEZEIGT). Um sicherzustellen, dass sich während des letzten Klonierungsschrittes zum fertigen *Targeting*-Vektor keine unerwünschten Mutationen, insbesondere in der codierenden *mPet-1* Sequenz ereignet haben, wurde die isolierte Plasmid DNA (s. 5.7.11) durch eine Restriktionsanalyse überprüft. Nur der Klon 2D6 enthielt die gesamte *mPet-1 IRES tau lacZpA*-Kassette in der richtigen 5' → 3' Orientierung. (ABB.: 22). Dieses Ergebnis wurde durch Sequenzierung (s. 5.7.17) bestätigt (DATEN NICHT GEZEIGT). Ebenso wurden intermediäre Konstrukte überprüft.

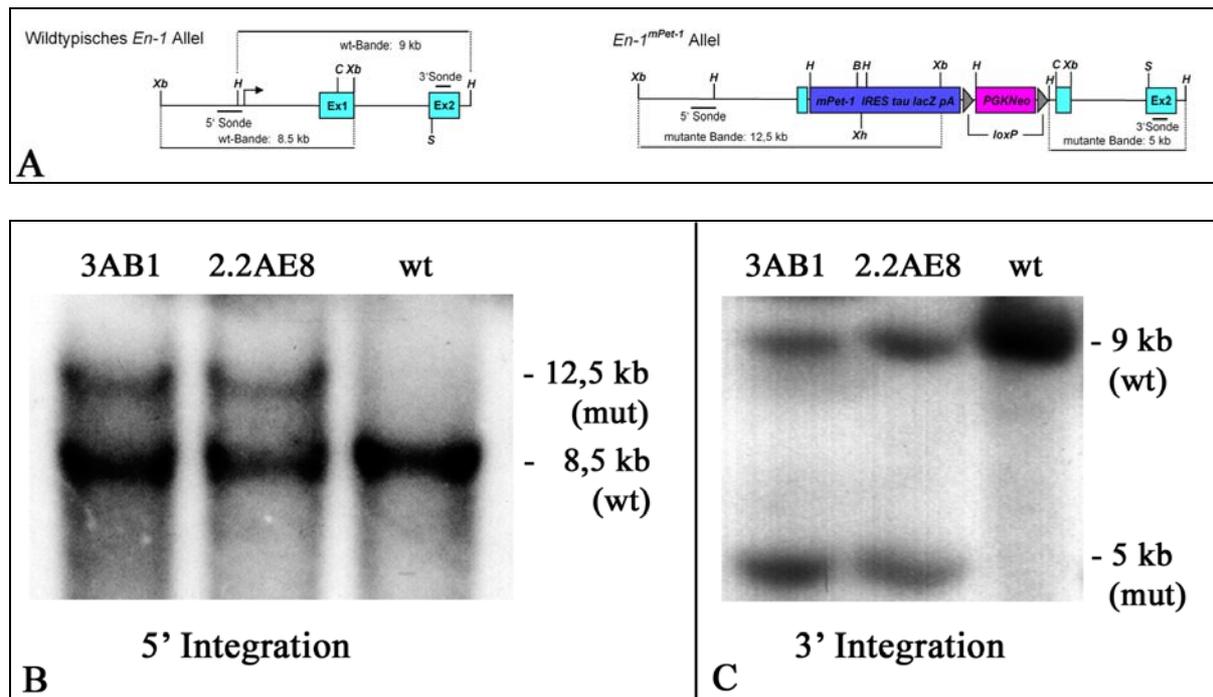
**ABB.: 22****RESTRIKTIONSANALYSE DER KLONE 2D6, 4E9, 6H8**

Alle drei Klone wurden einem Restriktionsverdau mit *HindIII* unterzogen. Nur Klon 2D6 zeigte das aufgrund der Restriktionskarte (Abb.: 19) erwartete Muster mit fünf Banden der Größe: 10 kB (Vektor *pBS K/S*, 3'Homologiearm); 5 kB (*IRES tau lacZ*); 3,9 kB (5'Homologiearm); 1,9 kB (*PGKNeo*); und 1,2 kB (*mPet-1*, *IRES*). Die Gesamtgröße des *Targeting*-Konstruktes lag bei 22 kB. Als Kontrolle wurde der *En-1* 3'-Shuttle-Vektor (15,8 kB) ebenfalls mit *HindIII* verdaut. Wie erwartet fehlt die 1,2 kB und die 5 kB Bande des *mPet-1-IRES-tau-lacZ-Inserts*.

**3.4.3 HOMOLOGE REKOMBINATION IN ES-ZELLEN**

Das homologe Rekombinationsereignis in mitotischen ES-Zellen ist in (Abb.: 19) graphisch dargestellt. Zur Elektroporation von ES-Zellen (s. 5.9.3.2) wurde der *Targeting*-Vektor mit *SalI* linearisiert. Insgesamt wurden 2 unabhängige Elektroporationen durchgeführt. Da die homologe Rekombination gegenüber der nicht-homologen Integration bis um den Faktor  $10^5$  seltener auftreten kann, wurde das im vorigen Abschnitt vorgestellte Konstrukt verwendet, welches eine positiv/negativ Doppelselektion und somit eine Anreicherung homolog rekombinierter Klone ermöglicht. Die Positiv-Selektion Neomycin resistenter Klone erfolgte mit Geneticin (G418), einem Neomycin Analogon und die Negativ-Selektion mit Gancyclovir (s. 5.9.3.3). Insgesamt wurden 450 Klone isoliert. Zur Identifizierung von ES-Zell Klonen in denen eine homologe Rekombination im *En-1* Locus stattgefunden hatte, wurde eine *Southern-Blot* Analyse durchgeführt (s. 5.7.16.2). Die aus ES-Zellen isolierte genomische DNA (s. 5.7.1.2) wurde mit dem Restriktionsenzym *HindIII* geschnitten, ein *Southern-Transfer* (s. 5.7.5.1) durchgeführt und mit der  $^{32}\text{P}$  markierten (s. 5.7.15), externen 3'-Sonde, ein etwa 700 bp großes *EcoRI-SalI* Fragment des Plasmids *ESEN-1* (s. TAB.: 7), hybridisiert. Klone bei denen neben dem Wildtyp-Allel (wt-Bande 9kB) auch das rekombinante Allel (mutante Bande 5 kB) detektiert werden konnte, wurden zusätzlich mit der 5'-Sonde (BROCCOLI, ET AL., 1999) getestet (ABB.: 23

A,B,C). Die auf Nylonmembranen immobilisierte ES-Zell DNA (s. 5.7.5.1) wurde zuvor mit *Xba*I geschnitten und anschließend mit dem 1,2 kB großen,  $^{32}$ P markierten (s. 5.7.15), *Sac*I Fragment aus dem Vektor SC-1 (s. TAB.: 7) hybridisiert. Von den insgesamt 450 getesteten Klonen zeigten zwei Klone (3AB1; 2.2AE8) homologe Rekombination für den 5'-Arm und für den 3'-Arm am *En-1* Genort (Abb.: 23 A,B,C). Somit lag die Rekombinationsfrequenz insgesamt bei 0,33%. Die Daten der Elektroporationen sind in TAB. 1 zusammengefasst.



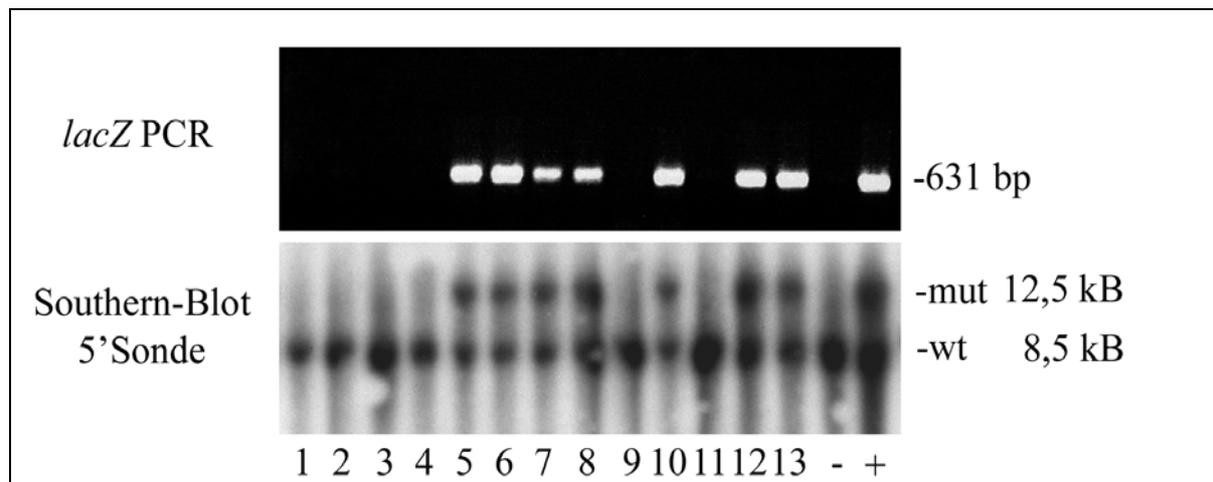
#### ABB.: 23 HOMOLOGE REKOMBINATION IN ES-ZELLEN

**(A)** Graphische Darstellung der erwarteten Banden nach einem homologen Rekombinationsereignis im *En-1* Genort. **(B,C)** Von den insgesamt 450 getesteten Es-Zellklonen zeigten zwei Klone (3AB1 und 2.2AE8) homologe Rekombination für den 5'-Arm und den 3'-Arm. Für die 5'-Integration konnte in der *Southern-Blot* Analyse eine mutante Bande von 12,5 kB mit der 5'-Sonde und für die 3'-Integration eine mutante Bande von 5 kB mit der 3'-Sonde, detektiert werden. Die wt-Banden zeigten wie erwartet eine Größe von 8,5 kB und 9 kB.

#### 3.4.4 ETABLIERUNG DER TRANSGENEN MAUSLINIE

ES-Zellen beider Klone wurden wie in 5.9.7 beschrieben in Blastocysten von C57BL/6N Spenderweibchen injiziert, ein Embryotransfer durchgeführt und somit Chimären generiert (s. 5.9.7). Die nach regulärer Tragezeit geborenen Chimären konnten anhand einer gemischten Fellfarbe identifiziert werden. Das bräunliche

Agouti, stammt von der mutierten 129SvJ ES-Zelllinie und die schwarze Fellfärbung von den C57/BL6N Spenderblastozysten. Weiterhin konnte auch der prozentuale Anteil an mutierten Zellen in der Chimäre anhand der Fellfarbe abgeschätzt werden. Zur Etablierung der heterozygot, mutierten *En-1<sup>mPet-1/+</sup>* Linie wurden nur männliche Chimären deren Fellfarbe überwiegend Agouti (>95%) war mit C57BL/6N Weibchen verpaart. Da Agouti dominant vererbt wird, wurden Neugeborene mit schwarzer Fellfarbe getötet und nur Nachkommen der ersten Filialgeneration (F1) mit der Fellfarbe Agouti auf Keimbahntransmission der Mutation getestet, denn trotz ausreichender Selektion (s. 5.9.3.3) kann eine Kontamination mit wildtypischen 129SvJ ES-Zellen nicht vollends vermieden werden. Hierzu wurde die *lacZ*-PCR (ABB.: 24; s. 5.7.16.1) eingesetzt und das Ergebnis durch eine *Southern-Blot* Analyse (s. 5.7.16.2) mit der 5'-Sonde (ABB.: 24) und der externen 3'-Sonde (DATEN NICHT GEZEIGT) (TAB.: 7) verifiziert. Nur Chimären des Klons 3AB1 vererbten das mutierte *En-1<sup>mPet-1</sup>* Allel. Die Daten der Blastocysteninjektionen und der Embryotransfers sind TAB.:1 zusammengefasst.



**ABB.: 24 GENOTYPISIERUNG DER F1-GENERATION**

Nur Nachkommen mit der Fellfarbe Agouti aus der Verpaarung der männlichen Chimären des Klons 3AB1 mit C57BL/6N Weibchen wurden auf Keimbahntransmission der Mutation getestet. Heterozygote Mutanten, wurden mit spezifischen *Primern* (TAB.: 6) für die *lacZ*-Reporter-kassette anhand einer PCR-Bande mit einer Größe von 631 bp identifiziert. Da diese Tiere zur Gründung der *En-1<sup>mPet-1/+</sup>* Linie dienten, wurde das Ergebnis der *lacZ*-PCR durch eine *Southern-Blot* Analyse verifiziert. Mit der 5'-Sonde konnte erwartungsgemäß bei allen Tieren eine Wildtypbande mit einer Größe von 8,5 kb detektiert werden. Bei *lacZ* positiven Tieren konnte zusätzlich die anhand der Genkarte (ABB.: 23 A) kalkulierte, mutante Bande von 12,5 kb detektiert werden.

**TAB.: 1 ZUSAMMENFASSUNG DER DATEN AUS DEN ELEKTROPORATIONEN, DEN BLASTOCYSTENINJEKTIONEN UND DEN EMBRYOTRANSFERS**

	Elektroporation 1	Elektroporation 2
ES-Zelllinie	129 SVJ	129 SVJ
Zellzahl / Kuvette:	7 000 000	7 000 000
DNA-Menge / Kuvette:	20ug	20ug
Anzahl elektroporierter Kuvetten:	5	4
Kapazität:	500uFD	500uFD
Puls (ms):	8,1 8,3 9,1 7,2 6,3	9,1 8,3 6,1 7,8
Selektion in Tagen:	8	8
Anzahl selektierter Klone (G418/Ganc):	250	200
Positiv genotypisierte Klone:	3AB1	2.2AE8
Rekombinationsfrequenz:	1/250	1/200
Injizierte Zellen / Blastocyste	15(+/- 5) / 1	15(+/-5) / 1
Anzahl injizierter Blastocysten	20	18
Anzahl der Embryotransfers:	2	2
Anzahl der Chimären / Chimärismus	3 / 95-98%	keine
Transmission der Mutation / Keimbahn:	20 / 54	keine

### 3.5 ANALYSE DER *EN-1*<sup>*MPET-1/+*</sup> MAUS

Die erste makroskopische Analyse ergab, dass die *En-1*<sup>*mPet-1/+*</sup> Mäuse lebensfähig und fertil sind. Im Vergleich zu den wildtypischen Geschwistern des gleichen Wurfs ist keine Veränderung in der Körpergröße und des Gewichtes festzustellen. Das Verhalten der Tiere ist unauffällig.

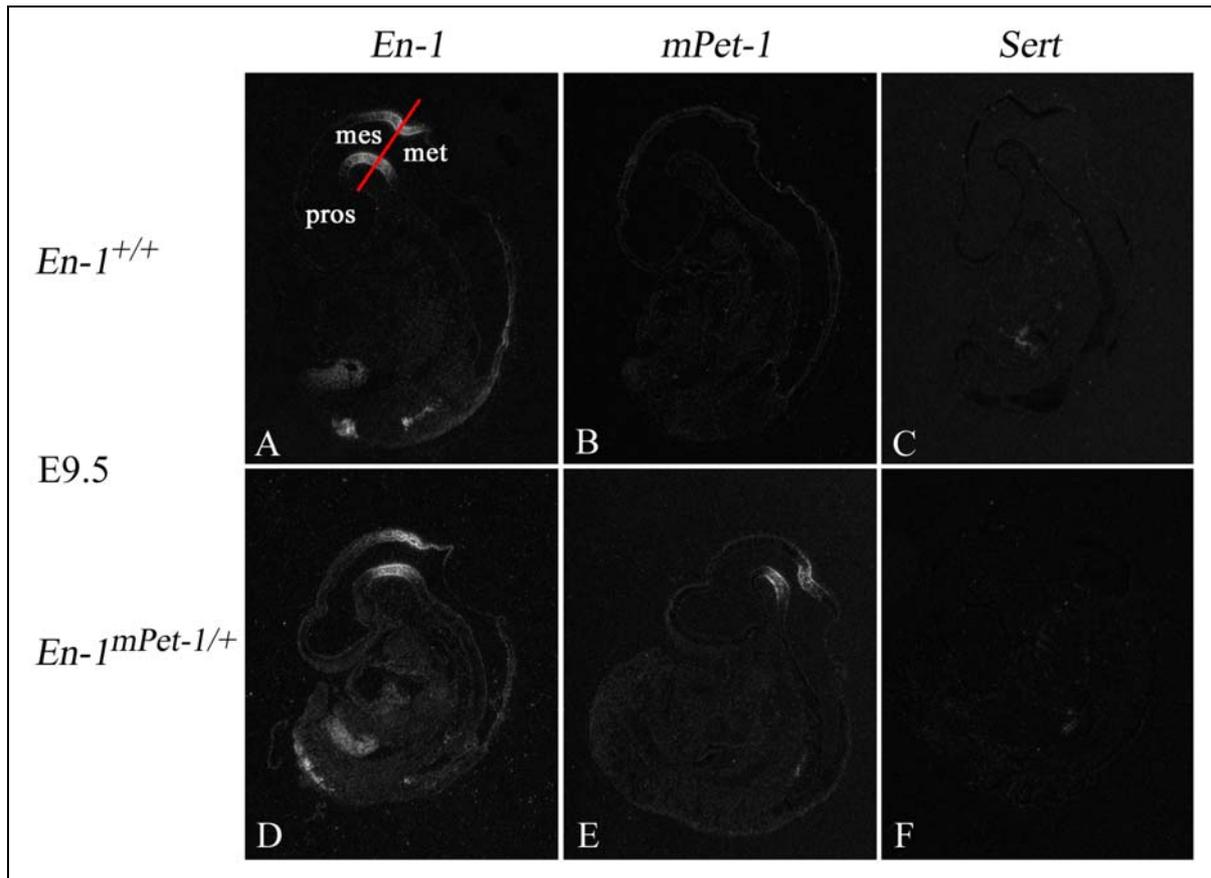
#### 3.5.1 *MPET-1* IST EKTOPISCH UND VORZEITIG EXPRIMIERT

Zum Nachweis des zusätzlichen *mPet-1* Transkriptes in der *En-1* Expressionsdomaine wurde eine vergleichende Expressionsstudie im Stadium E9,5, E12,5 und E18.5 durchgeführt. In heterozygoten Embryonen des Entwicklungsstadiums E9,5 ist *mPet-1* ebenso wie *En-1* rostral und caudal vom MHO exprimiert (ABB.: 25 D,E). Im Wildtyp konnte wie erwartet keine *mPet-1* Expression detektiert werden (ABB.: 25 B), da endogenes *mPet-1* erst ab E11 exprimiert wird (ABB.: 14 A,B). Bei transgenen Tieren des Stadiums E12,5 ist *mPet-1* ebenfalls ektopisch im Isthmus (MHO) exprimiert und mit der *En-1* Expression in der heterozygoten *En-1*<sup>*mPet-1/+*</sup> Mutanten

sowie im Wildtyp vergleichbar (ABB.: 26 A,C,D). Im Wildtyp hingegen beschreibt die endogene *mPet-1* Expression spezifisch die rostralen und caudalen Gruppen der serotonergen Neuronen des ventralen Metencephalons (ABB.: 26 B UND DATEN NICHT GEZEIGT). Bei E18.5 beschreibt die *mPet-1* Expression im Wildtyp die Raphe Kerne und ist in der gezeigten Schnittebene im dorsalen Raphe Kern detektierbar (ABB.: 27 B). *mPet-1* ist in der ventralen MHR der Mutanten ebenso wie *En-1* stark in der Substantia nigra, im ventralen Tegmentum und im dorsalen Raphe nucleus exprimiert (ABB.: 27 D, E). Verglichen mit der *En-1* Expression in der Mutanten und im Wildtyp erscheint die *mPet-1* Expression im Cerebellum, im inferioren und superioren Colliculus, Strukturen die sich aus dem dorsalen Neuroepithel entwickeln, etwas reduziert. (ABB.: 27 A, D, E).

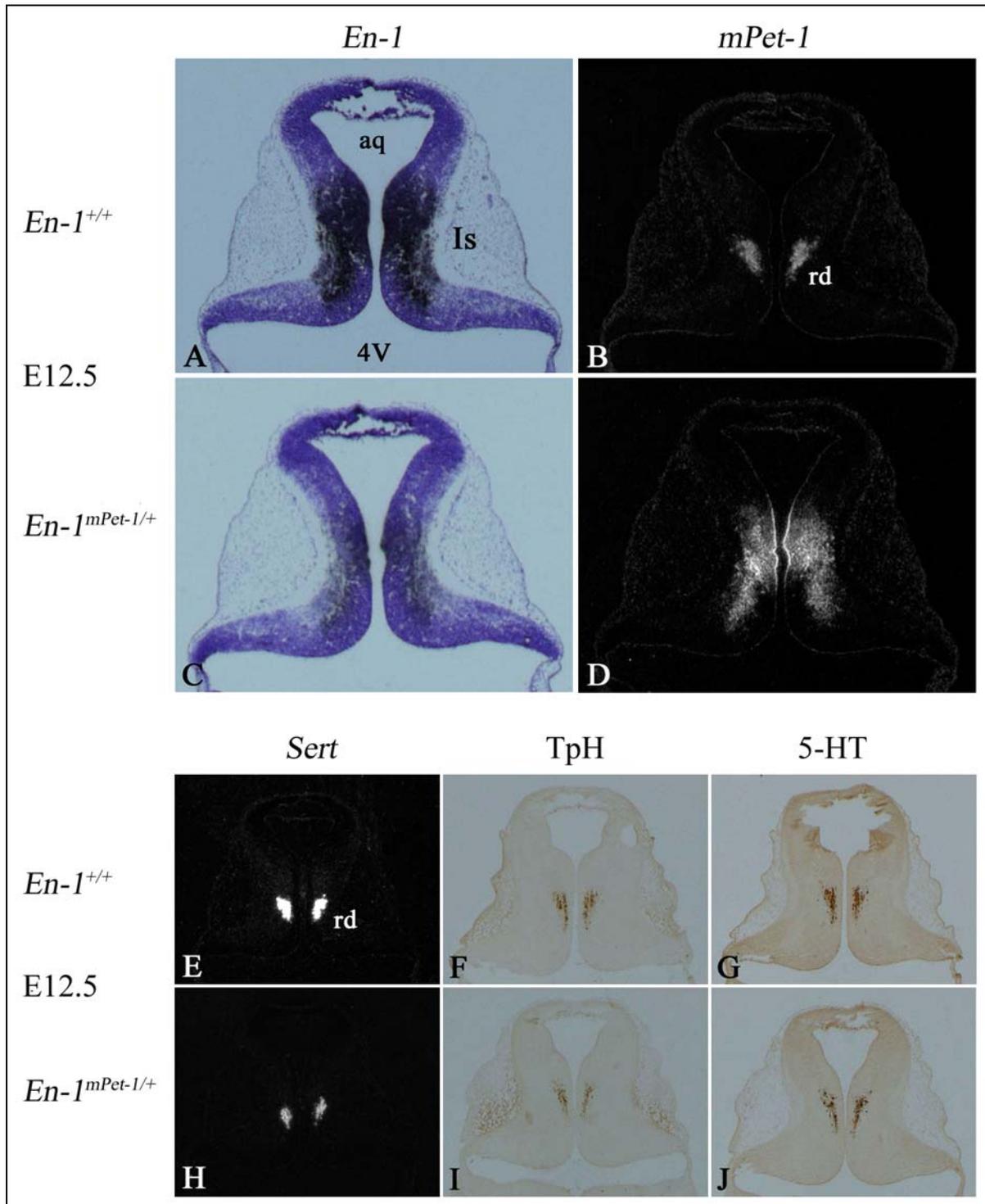
### 3.5.2 SEROTONERGE MARKER SIND IN DER *EN-1<sup>mPET-1/+</sup>* MAUS NICHT INDUZIERT

Um aufzuklären, ob *mPet-1* eine instruktive Rolle bei der Spezifizierung serotonerger Neuronen spielt, wurde das Expressionsprofil von spezifischen, serotonergen Markergenen studiert. Hierzu zählen der Serotonintransporter (*Sert*) und die Tryptophanhydroxylase (*TpH*) (Hansson et al., 1998; Rattray et al., 1999; Rind et al., 2000; Hendricks et al., 2003). Vergleicht man die Expression von *Sert* bei E 9,5 in der Mutanten (ABB.: 25 F) und im Wildtyp (ABB.: 25 C) mit der ektopischen *mPet-1* Expression (ABB.: 25 E) wird deutlich, dass *Sert* nicht ektopisch und nicht vorzeitig induziert wird. Auch bei E12.5 ist eine mit der isthmischen *mPet-1* Expression (ABB.: 26 D) vergleichbare ektopische Expression von *Sert* nicht detektierbar (ABB.: 26 H). Vielmehr beschreibt die *Sert* Expression in der Mutanten (ABB.: 26 H) ebenso wie im Wildtyp (ABB.: 26 E) den Nucleus raphe dorsalis. Weiterhin ist aus ABB.: 26 F,G,I,J zu entnehmen, daß in dieser Region weder der 5-HT Biosynthesemarker *TpH* noch der Neurotransmitter selbst (5-HT) ektopisch induziert sind. Im späten Entwicklungsstadium des Mausembryos, bei E18.5, kennzeichnet die ektopische *mPet-1* Expression die Substantia nigra, die Colliculi und das Cerebellum (ABB.: 27 A,B,D,E). Verglichen mit der *En-1* Expression in der Mutanten (ABB.: 27 D) erscheint die ektopische *mPet-1* Expression in den dorsalen Strukturen etwas schwächer (Abb.: 27 E) Auch hier konnte keine *mPet-1* induzierte Veränderung der terminalen serotonergen Marker *Sert*, *TpH* und 5-HT gezeigt werden (ABB.: 27 G-L).



**Abb.: 25** DIE REGIONALE UND TEMPORALE VERLAGERUNG DER *MPET-1* EXPRESSION FÜHRT NICHT ZUR VORZEITIGEN UND EKTOPISCHEN INDUKTION DES SEROTONINTRANSPORTERS

Radiaktive *in-situ* Hybridisierung auf sagittalen Paraffinschnitten (8 $\mu$ m) von wildtypischen Embryonen (**A-C**) und heterozygoten Mutanten (**D-F**) des Entwicklungsstadiums E9.5. Im Wildtyp (**A**) ist *En-1* im dorsalen und ventralen Mes-/Metencephalon (mes; met) exprimiert, wohingegen *mPet-1* (**B**) und *Sert* (**C**) nicht detektierbar sind. Der Isthmus ist durch eine rote Linie gekennzeichnet. In *En-1<sup>mPet-1/+</sup>* Embryonen ist die *En-1* Expression unverändert (**D**). Die ektopische *mPet-1* Expression stellt sich wie die *En-1* Expression dar, erscheint jedoch in ihrer A/P-Ausdehnung etwas schmaler als *En-1* (vgl. **E,A**) *Sert* ist nicht induziert (vgl. **F mit E,A**). pros, Prosencephalon



**Abb.: 26 Serotonerge Marker sind bei E12.5 in *En-1*<sup>mPet-1/+</sup> Embryonen nicht induziert**

(A,B,E,F,G) Konsekutive Coronalschnitte von der isthmischen Region im wildtypischen Embryo. (C,D,H,I,J) Konsekutive Coronalschnitte der gleichen Ebene im heterozygoten Embryo. (A,C) *In-situ* Hybridisierungen mit den *En-1* Sonde in der Hellfeldaufnahme. Dunkelfeldaufnahmen der *in-situ* Hybridisierungen mit *mPet-1* (B,D) und der *Sert* Sonde (E,H). Immunfärbungen mit  $\alpha$ -TpH (F,I) und  $\alpha$ -5-HT (G,J). Is, Isthmus (MHO); rd, nucleus raphe dorsalis; aq, aqueduct; 4V, vierter Ventrikel

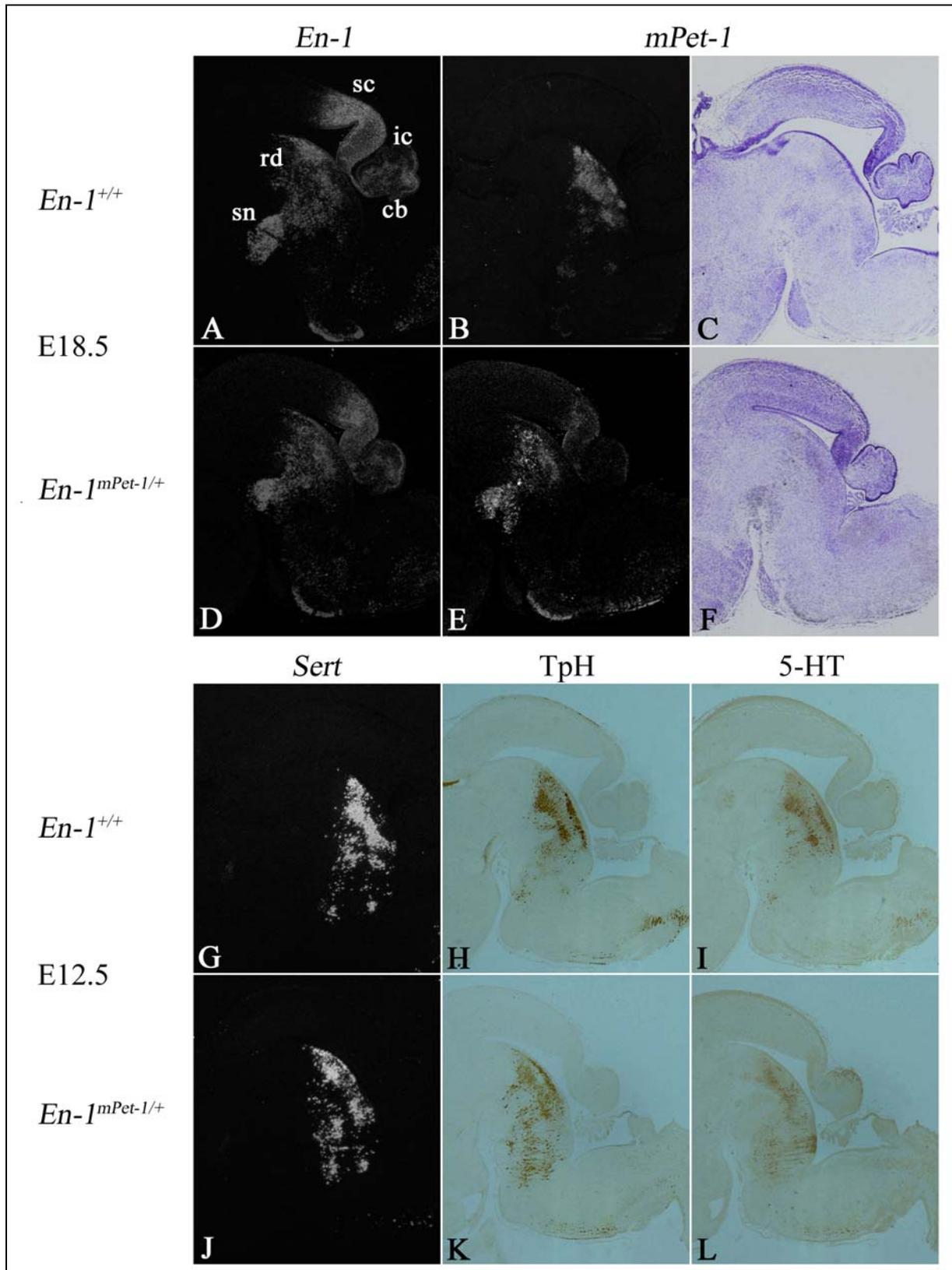


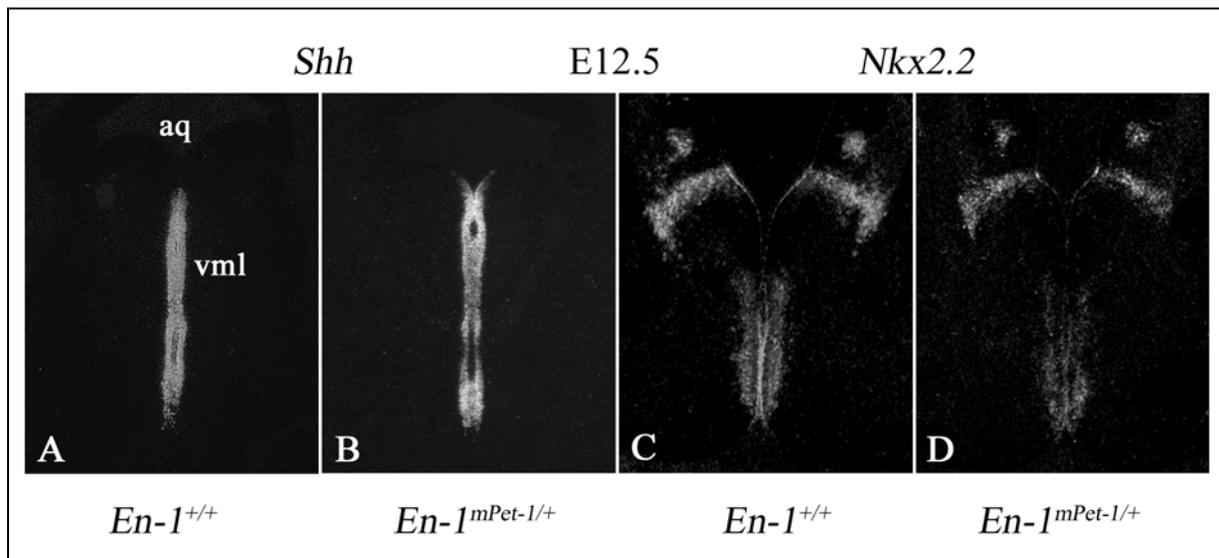
ABB.: 27 IN DER SPÄTEN EMBRYONALPHASE SIND SEROTONERGE MARKER IN *En-1*<sup>mPet-1/+</sup> MÄUSEN NICHT VERÄNDERT →

**ABB.: 27 IN DER SPÄTEN EMBRYONALPHASE SIND SEROTONERGE MARKER IN *EN-1*<sup>MPET-1/+</sup> MÄUSEN NICHT VERÄNDERT**

**(A,B,C,G,H,I)** Konsekutive Mediosagittalschnitte des wildtypischen, embryonalen Gehirns bei E18,5. **(D,E,F,J,K,L)** Konsekutive Mediosagittalschnitte von Gehirnen heterozygoter Embryonen des gleichen Stadiums. **(A,D)** *In-situ* Hybridisierungen mit der *En-1* Probe in der Dunkelfeldaufnahme. *In-situ* Hybridisierungen mit *mPet-1*, Dunkelfeld **(B,E)**, Hellfeld **(C,F)**, und *Sert* Dunkelfeld **(G,J)**. Immunfärbungen mit  $\alpha$ -TpH **(H,K)** und  $\alpha$ -5HT **(I,L)**. *mPet-1* ist in der Mutanten ebenso wie *En-1* im inferioren / superioren Colliculus (ic / sc), im Cerebellum (cb), im Nucleus raphe dorsalis (rd) und in der Substantia nigra (sn) ektopisch exprimiert und somit dorsorostral dislociert **(A,D,E)**. Die ektopische *mPet-1* Expression **(E)** erscheint in den Colliculi und im Cerebellum etwas schwächer als die *En-1* Expression in der Mutanten **(D)**. Die serotonergen Marker beschreiben sowohl in der Mutanten **(J,K,L)** als auch im Wildtyp **(G,H,I)** die Raphe Kerne und sind in dieser Schnittebene im Nucleus raphe dorsalis detektierbar.

**3.5.3 SHH UND Nkx2.2 WERDEN NICHT DURCH MPET-1 REGULIERT**

Der in einem D/V Gradienten sezernierte Faktor Sonic hedgehog (Shh) ist im Notochord und in der Bodenplatte entlang der A/P-Achse des Embryos exprimiert. Es wurde gezeigt, dass dieses Morphogen eine wichtige Rolle bei der Induktion von dopaminergen und serotonergen Neuronen in der ventralen Mittel-, Hinterhirnregion spielt (YE ET AL., 1998). Die serotonergen Neuronen entwickeln sich aus distinkten, ventralen Vorläuferzellen, die *Nkx2.2* als Antwort auf das graduelle Shh Signal exprimieren. Somit spielt neben *Shh* auch *Nkx2.2* eine bedeutende Rolle bei der ventralen neuronalen Musterbildung. Die Expressionsmuster von *Shh* und *Nkx2.2* sind in der heterozygoten Mutanten bei E12,5 gegenüber dem Wildtyp nicht verändert (ABB.: 28). Diese Daten zeigen somit, dass *mPet-1* in der serotonergen Signaltransduktionskaskade stromabwärts von *Shh* und *Nkx2.2* zu positionieren ist, und dass *mPet-1* beide Faktoren nicht in einem Rückkopplungsmechanismus reguliert.



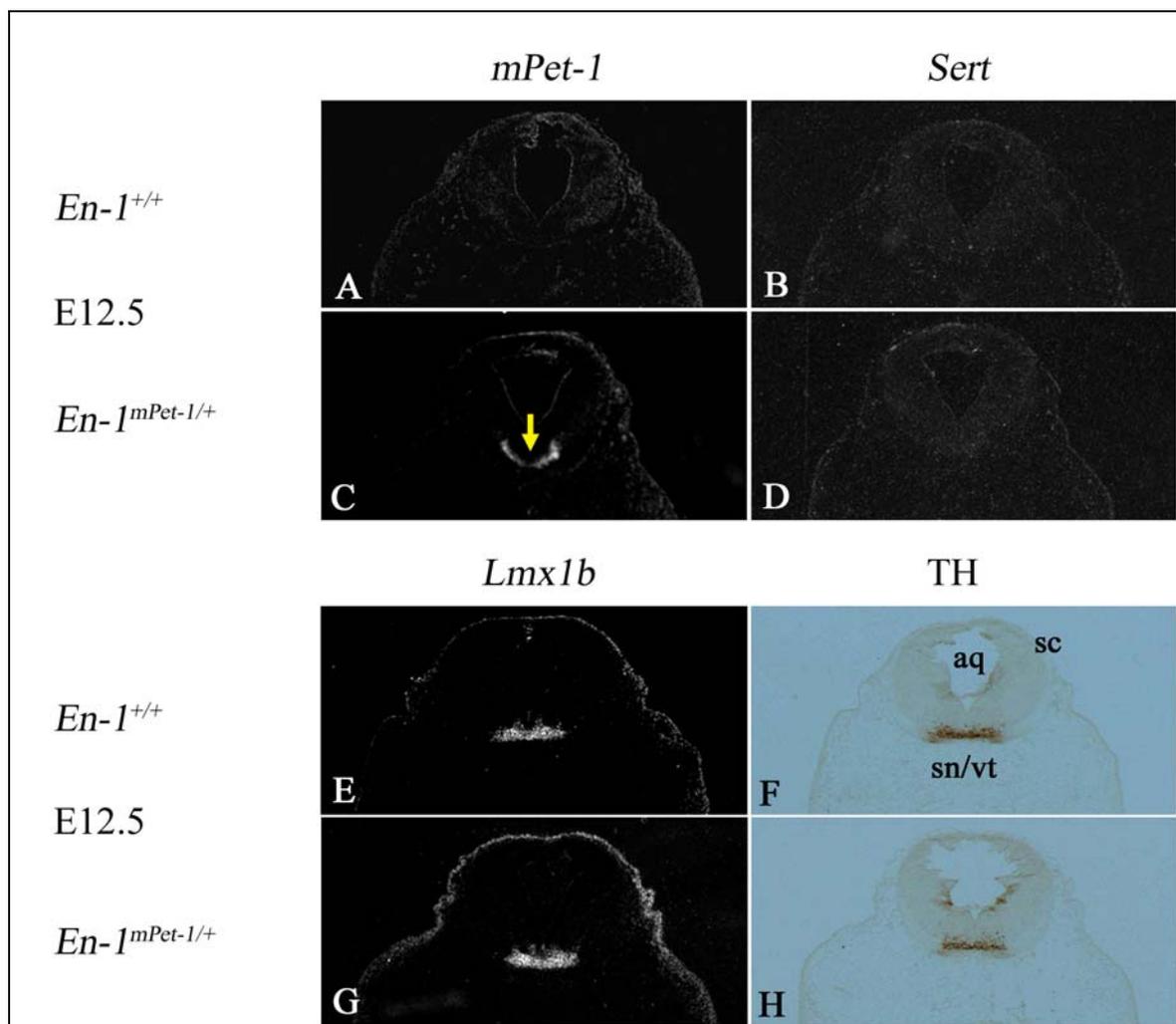
**ABB.: 28 SHH UND NKX2.2 SIND NICHT DURCH MPET-1 REGULIERT**

(A-D) *In-situ* Hybridisierungen auf coronalen Schnitten bei E12.5. Verglichen mit dem Wildtyp (A,C) sind in der heterozygoten Mutanten (B,D) die Expressionsmuster von *Shh* (A,B) und *Nkx2.2* (C,D) identisch. Somit agiert *mPet-1* in der serotonergen Spezifizierungskaskade stromabwärts und reguliert auch beide Faktoren nicht in einem Rückkopplungsmechanismus. aq, Aquedukt; vml, ventrale Mittellinie

### 3.5.4 DIE EKTOPISCHE MPET-1 EXPRESSION IN DER SUBSTANTIA NIGRA UND IM VENTRALEN TEGMENTUM

Wie schon bei E9 gezeigt hat sich die Expressionsdomäne von *mPet-1* in der Mutanten auch bei E12.5 nach rostral über die Mittel-Hinterhirngrenze hinweg, in das ventrale Mesencephalon verlagert (ABB.: 29 C). Im Wildtyp kann *mPet-1* dort nicht detektiert werden (ABB.: 29 A). In dieser Region entwickeln sich die mesencephalen dopaminergen Neurone der Substantia nigra und des ventralen Tegmentums. Neben Markern wie *Pitx3* (nur Substantia nigra Neurone) und *Nurr1* sind sie durch die Expression der Tyrosin-Hydroxylase (TH) (ABB.: 29 F) gekennzeichnet. Beide Neurotransmitterpopulationen exprimieren *Lmx1b* (ABB.: 29 E; s. 37 B). Im Vergleich zum Wildtyp (ABB.: 29 E,F) ist die TH- und *Lmx1b* Expression in der Mutanten (ABB.: 29 G,H) nicht verändert. Aufgrund dieser unveränderten *Lmx1b* Expression kann festgestellt werden, dass *Lmx1b* nicht durch *mPet-1* reguliert wird. Basierend auf der unveränderten TH-Expression ist weiterhin davon auszugehen, dass die mesencephalen, dopaminergen Neurone nicht durch ektopisches *mPet-1* in ihrer Entwicklung beeinträchtigt werden. *Sert*, respektive serotonerge Neuronen konnten

ebenso wie im Isthmus (ABB.: 26) auch in dieser Region nicht induziert werden. (ABB.: 29 B,D). Das zeigt, dass weder *mPet-1* alleine noch in Kombination mit *Lmx1b* ausreicht um einen serotonergen Phänotyp zu induzieren. Zugleich bekräftigt dieses Resultat, die erst kürzlich von CHENG ET AL., 2003 veröffentlichten Daten, dass ein kombinatorischer Code der Faktoren *mPet-1*, *Lmx1b* und *Nkx2.2* welches nicht in mesencephalen dopaminergen Zellen exprimiert ist (PATTYN ET AL., 2004), notwendig ist für die Spezifizierung des serotonergen Neurotransmitterphänotyps.



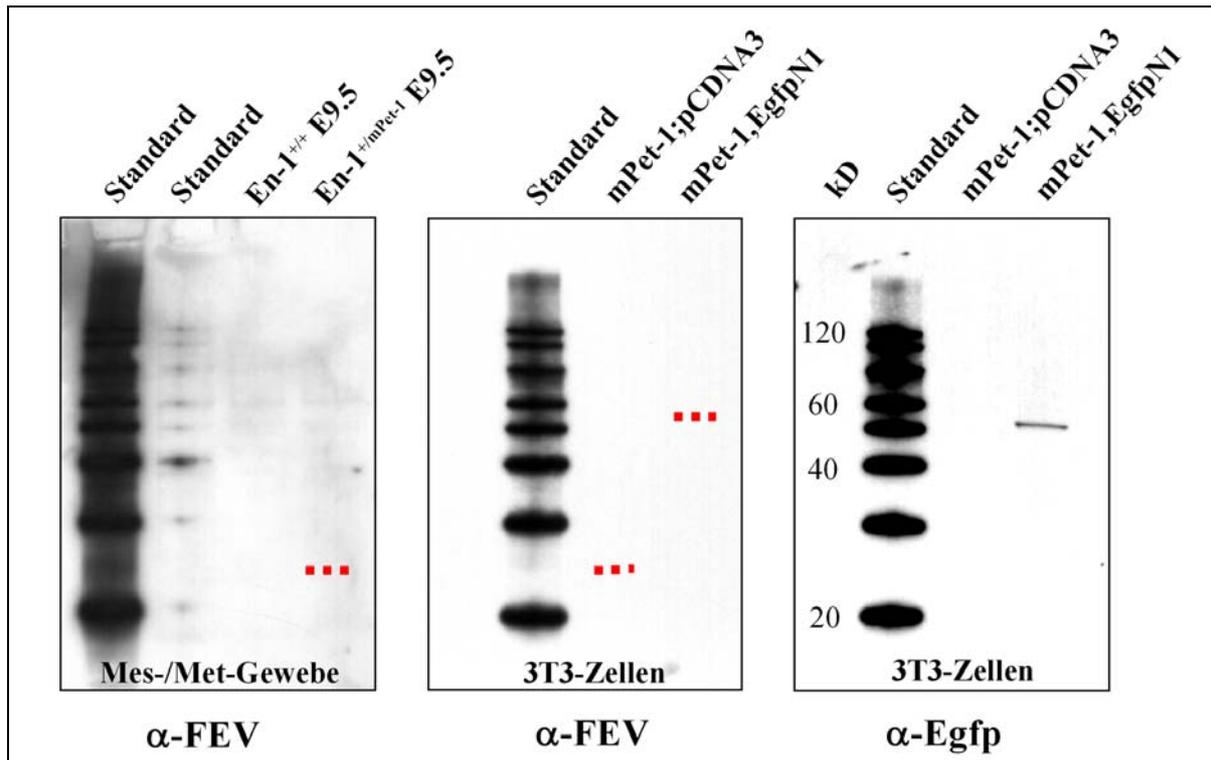
**ABB.: 29** DIE EKTOPISCHE *MPET-1* EXPRESSION IM VENTRALEN MESENCEPHALON

(A-H) Coronale Paraffinschnitte in der mesencephalen Ebene (A,B,C,D,E,G) *In-situ* Hybridisierungen: mit der *mPet-1* CDS-Sonde (A,C) der *Sert* Sonde (B,D) und der *Lmx1b* Sonde (E,G). Immunfärbung mit dem  $\alpha$ -TH Antikörper (C,F); Im Wildtyp (*En-1<sup>+/+</sup>*) sind *mPet-1* (A) und *Sert* (B) im nicht im Mesencephalon exprimiert. In der heterozygoten Mutanten (*En-1<sup>mPet-1/+</sup>*) ist *mPet-1* ektopisch in der Substantia nigra (sn) und im ventralen Tegmentum (vt) detektierbar.

**ABB.: 29** (C,Pfeil), *Sert* jedoch nicht (D). Verglichen mit dem Wildtyp (E,F) ist die Expression von *Lmx1b* und Th in der Mutanten (G,H) unverändert. aq, Aqueduc; pn, Pons; sc, superiorer Colliculus

### 3.5.5 ÜBERPRÜFUNG DER FUNKTIONALITÄT DES *KNOCK-IN* ALLELS

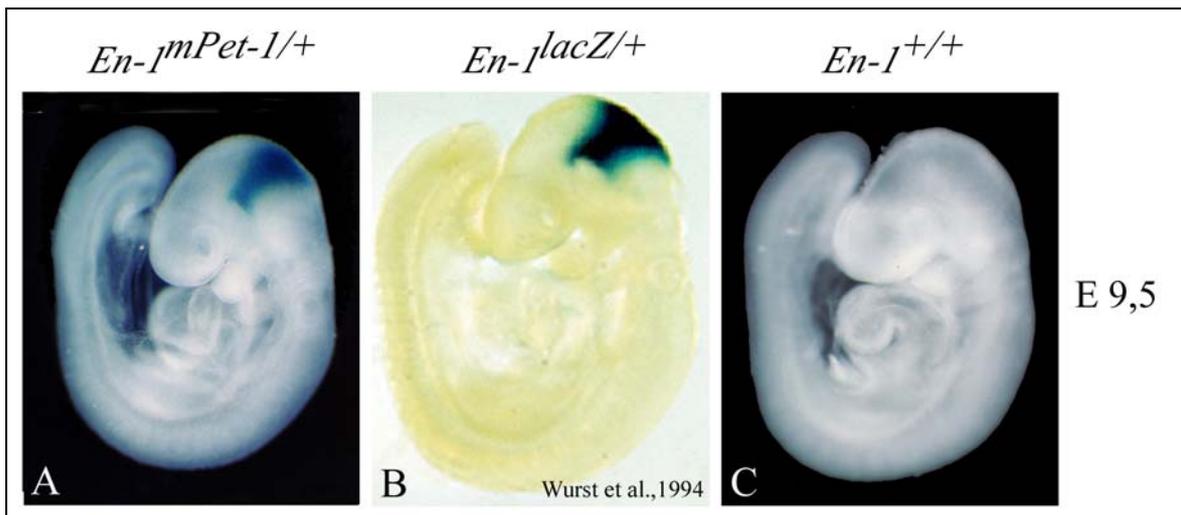
Da in den heterozygoten Tieren entgegen unserer Hypothese keine Veränderung in der Expression der Marker der serotonergen Spezifizierungskaskade, insbesondere derer für ausdifferenzierte serotonerge Neurone (*Sert*, TpH, 5-HT), festgestellt werden konnte, wurde die Funktionsfähigkeit des *Knock-In* Allels überprüft. Die in ABB.: 25-27 gezeigte ektopische *mPet-1* mRNA Expression beweist eindeutig, dass das mutierte Allel transkribiert wird. Ein eindeutiger Beweis für die Funktionsfähigkeit des Transgens wäre der Nachweis des ektopisch translatierten mPet-1 Proteins. Da zum Zeitpunkt der Analyse kein  $\alpha$ -mPet-1 Antikörper zur Verfügung stand, wurde alternativ versucht, den Beweis mit einem Antikörper zu führen, der gegen das humane homolog FEV gerichtet ist und eine Kreuzreaktivität mit dem Mausprotein aufweisen sollte. Das Proteinextrakt zur *Western-Blot* Analyse (s. 5.7.3; 5.7.5.3) wurde aus wildtypischem und aus Mittel-/Hinterhirngewebe von *En-1<sup>mPet-1/+</sup>* Embryonen im Stadium E9.5 gewonnen. Da *mPet-1* unter dem *En-1* Promoter ebenso wie *En-1* selbst schon bei E9.5 exprimiert wird (ABB.: 25) und dagegen endogenes *mPet-1* erst ab E11 (ABB.: 14) sollte das mPet-1 Protein mit einer Größe von ca. 25 kD zu diesem Zeitpunkt in der Mutante aber nicht im Wildtyp detektierbar sein. Sowohl in der *Western-Blot* Analyse (ABB.: 30) als auch bei Immunfärbungen auf Paraffin-, Gefrierschnitten und Ganzkörperpräparaten unter verschiedenen experimentellen Bedingungen, konnte jedoch kein spezifisches Signal detektiert werden (DATEN NICHT GEZEIGT). Das zeigt, dass der gegen das humane Protein FEV gerichtete Antikörper keine Kreuzreaktivität mit dem Mausprotein mPet-1 aufweist.



**ABB.: 30**     **WESTERN-BLOT ANALYSE**

In der *Western-Blot* Analyse konnte das erwartete 25 kD *mPet-1* Protein (rote perforierte Linie) im Mes-/Metencephalon der Mutanten mit dem  $\alpha$ -FEV Antikörper nicht detektiert werden. Als Kontrolle wurden 3T3-Zellen mit dem *pCDNA3*-Vektor der die *mPet-1* CDS unter den *CMV*-Promotor enthielt und mit dem *mPet-1/Egfp* Fusionstranskript transfiziert. Auch hier konnte die erwartete *mPet-1* Bande (25 kD, rote perforierte Linie) sowie auch die des Fusionsproteins (57 kD rote, perforierte Linie) nicht mit  $\alpha$ -FEV immunologisch dargestellt werden, wohingegen  $\alpha$ -Egfp das Fusionsprotein sehr spezifisch detektiert.

Dennoch konnte die Funktionsfähigkeit des Transgens gezeigt werden, indem die Aktivität der  $\beta$ -Galaktosidase in histochemischen Färbungen an *En-1<sup>mPet-1/+</sup>* Embryonen des Stadiums E9.5 nachgewiesen wurde. In der *En-1* Domäne war eine deutliche Blaufärbung sichtbar (ABB.: 31 A). Da die Expression dieses Enzyms von den gleichen regulatorischen Elementen kontrolliert wird wie die zusätzliche *mPet-1* Kopie, ist davon auszugehen, dass *mPet-1* Protein bei E9.5 ektopisch vorhanden ist.

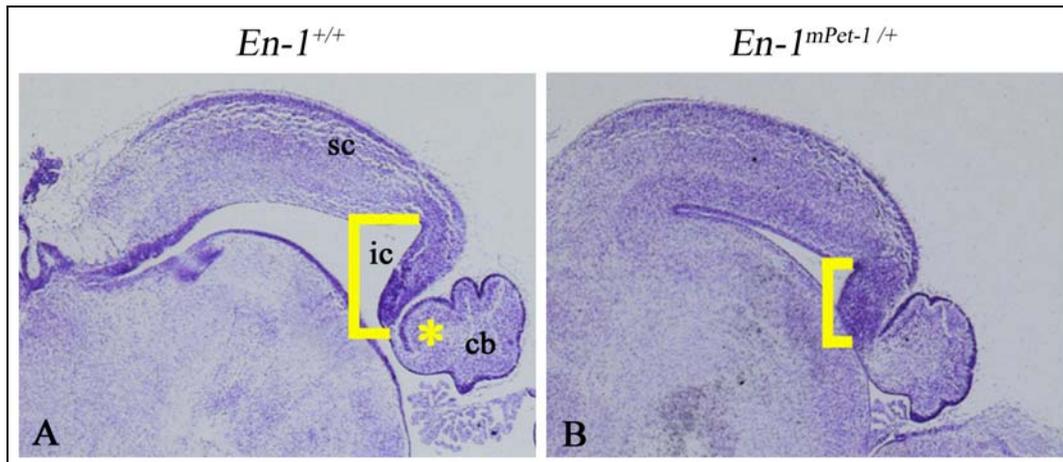


**ABB.: 31**     **DAS *KNOCK-IN* ALLEL IST FUNKTIONAL**

X-Gal Färbung an Embryonen, in denen der *En-1* Locus heterozygot mutiert ist und an wildtypischen Embryonen bei E9.5. **(A)** *En-1 mPet-1 IRES tau lacZ Knock-In* Allel; **(B)** *En-1 lacZ Knock-out* Allel; **(C)** Wildtyp. Der Nachweis der  $\beta$ -Galaktosidaseaktivität in der *En-1* Expressionsdomäne (**Vgl. A;B**) bestätigt einerseits die Ergebnisse der Southern-Blot Analyse (ABB.: 23), dass eine homologe Rekombination des *Targeting*-Vektor am *En-1* Genort stattfand und indiziert andererseits mit der Expression des  $\beta$ -Gal-Proteins die Funktionsfähigkeit des *Knock-In* Allels **(A)**. Im wildtypischen Embryo konnte erwartungsgemäß keine Färbung festgestellt werden **(C)**.

### 3.5.6     *EN-1<sup>MPET-1/+</sup>* MÄUSE ZEIGEN EINEN MUSTERBILDUNGSDEFEKT IN DER MHR

Der superiore- und der inferiore Colliculus sowie das Cerebellum sind Derivate des *En-1* exprimierenden, dorsalen Neuroepithels der MHR. Bei der Analyse der spätembryonalen (E18.5) *En-1<sup>mPet-1/+</sup>* Gehirne konnte auf Mediosagittalschnitten festgestellt werden, dass der sich entwickelnde inferiore Colliculus im Vergleich zum Wildtyp in seiner Größe reduziert ist (ABB.: 32 A,B, KLAMMER). Der superiore Colliculus zeigt keine morphologischen Defekte (ABB.: 32 A,B). Außerdem ist in der heterozygoten *En-1<sup>mPet-1/+</sup>* Mutanten die anterobasale Region des embryonalen Cerebellums (IM WILDTYP, ABB.: 32 A, MIT EINEM STERN GEKENNZEICHNET) deletiert.



**ABB.: 32 MUSTERBILDUNGSDEFEKTE IN DER *EN-1<sup>MPET-1/+</sup>* MUTANTEN BEI E18.5**

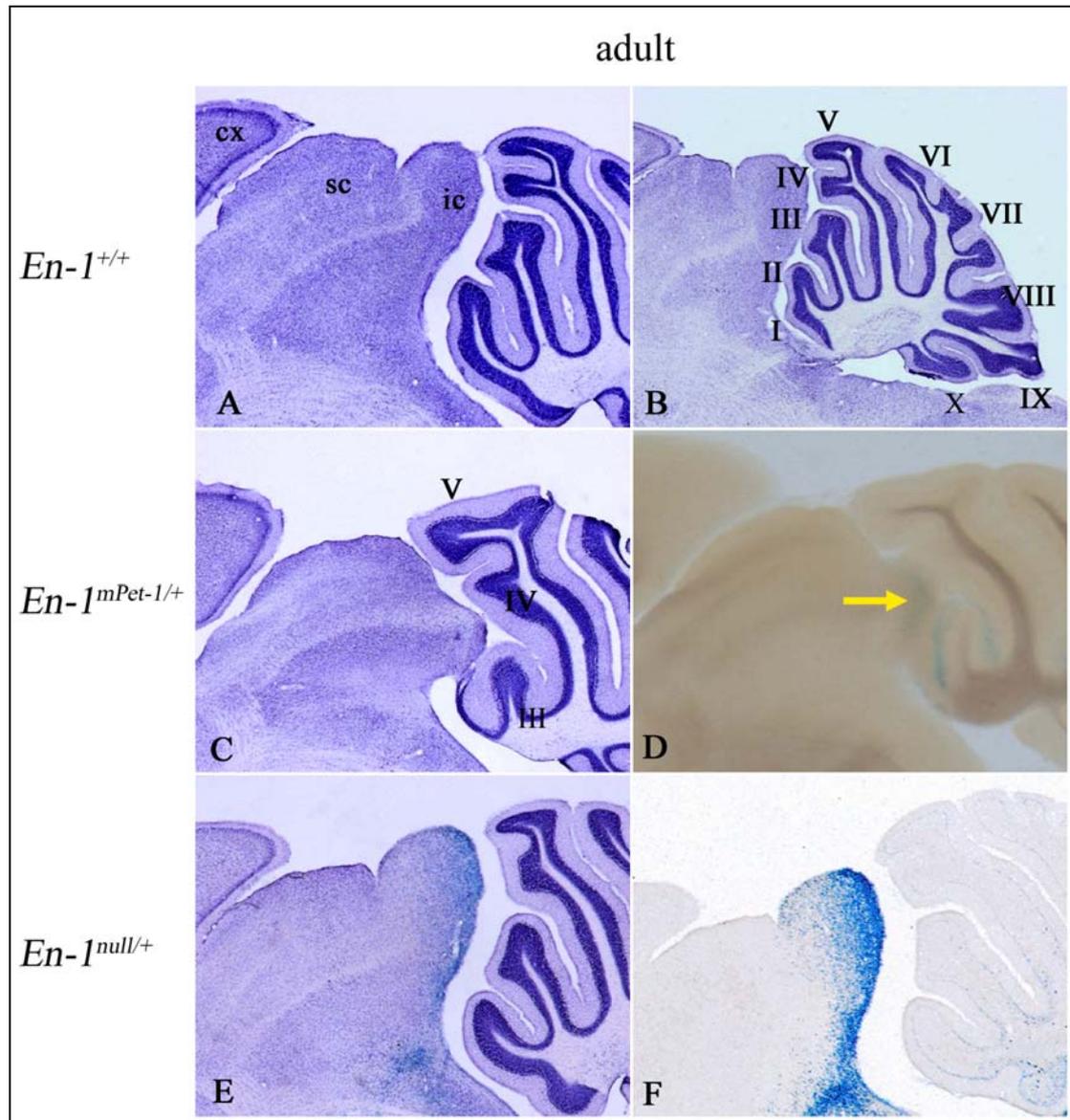
**(A,B)** Nissl-Färbung auf mediosagittalen Paraffinschnitten (8µm) von wildtypischen **(A)** und mutierten **(B)** Gehirnen bei E18.5. Die Klammern in **(A)** und **(B)** verdeutlichen die Größenreduktion des inferioren Colliculus (ic) in der Mutanten **(B)**. Die in **(A)** mit einem Stern gekennzeichnete Region im Cerebellum des Wildtyps fehlt in den mutierten Gehirnen **(B)**. cb, Cerebellum; sc, superiorer Colliculus

Diese embryonalen Gewebsdefekte haben zur Folge, dass die korrespondierenden adulten Strukturen ebenfalls fehlen oder malformiert sind.

In der Kresylviolett Übersichtsfärbung an adulten, wildtypischen Gehirnen kann der superiore Colliculus eindeutig aufgrund seiner laminaren Struktur vom inferioren Colliculus abgegrenzt werden (ABB.: 32 A). Im Gegensatz zum Wildtyp (*En-1<sup>+/+</sup>*) (ABB.: 32 A,B) und zu der *En-1<sup>null/+</sup>* Kontrolle (ABB.: 32 E,F) fehlt der inferiore Colliculus in der *En-1<sup>mPet-1/+</sup>* Mutanten (ABB.: 32 C,D) fast vollständig. Im Vergleich zu der *lacZ* exprimierenden *En-1<sup>null/+</sup>* Mutante (ABB.: 32 E,F) ist in der heterozygoten *En-1<sup>mPet-1/+</sup>* Mutanten nur noch die apikale Region des inferioren Colliculus erhalten und durch die *lacZ*-Reporterexpression in der *En-1<sup>mPet-1/+</sup>* Mutanten visualisiert (ABB.: 32 C,D PFEIL). Weiterhin ist der inferiore Colliculus ebenso wie der superiore Colliculus dislociert (ABB.: 32 C,D).

Das adulte Cerebellum wird im Modellsystem der Nagetiere (Ratte, Maus) entlang der A/P-Achse durch vier große Fissuren in fünf Lobi, den anterobasalen Lobus, den anterodorsalen Lobus, den centralen Lobus, den posterioren Lobus und den inferioren Lobus unterteilt. Man unterscheidet weiterhin von anterior nach posterior die Windungen I – X (ALTMANN UND BAYER, 1997) (ABB.: 32 B). In der *En-1<sup>mPet-1/+</sup>* Mutanten betreffen die morphologischen Veränderungen im Cerebellum den anterobasalen Lobus. Die Windungen I und II fehlen komplett und die Windung III ist

in ihrer Größe stark reduziert (ABB.: 32 C). Da die *En-1<sup>null/+</sup>* Mutante keinen Phänotyp in der MHR aufweist, (ABB.: 32 E,F) (WURST ET AL., 1994) implizieren die für die *En-1<sup>mPet-1/+</sup>* Mutante beschriebenen Musterbildungsdefekte, dass mPet-1 Protein ektopisch vorhanden ist und diesen Phänotyp in einem noch unbekanntem Mechanismus verursachen könnte.



**ABB.: 33** DER MITTEL-/HINTERHIRNPHÄNOTYP DER ADULTEN *EN-1<sup>MPET-1/+</sup>* MAUS

(A, B) Wildtypkontrolle; (C, D) heterozygote *En-1<sup>mPet-1/+</sup>* Mutante; (E, F) heterozygote *En-1<sup>null/+</sup>* Kontrolle. (A, B, C, E) X-Gal / Nissl Doppelfärbung. (D, F) X-Gal Färbung. Da im Gegensatz zur *En-1<sup>null/+</sup>* Kontrolle (E,F) keine *lacZ* Expression auf 50µm dicken, sagittalen Kryoschnitten von *En-1<sup>mPet-1/+</sup>* Gehirnen (C) detektiert werden konnte, wurden 500 µm dicke Vibratomschnitte angefertigt (D). Analog zum fast vollständigen Verlust des inferioren Colliculus (ic) ist die *lacZ* Expression, neben der

**ABB.: 33** schwachen Expression im Cerebellum, nur noch schwach im apikalen ic detektierbar (**Vgl. C, D Pfeil, E, F**). Im Vergleich zu den Kontrollen (**A, B, E, F**) fehlen in der *En-1<sup>mPet-1/+</sup>* Mutante die cerebellären Foliae I und II. Windung III ist verkleinert (**C, D**).  
I – X, Nummerierung der Kleinhirnwindungen; cx, Cortex; ic, inferiorer Colliculus; sc, superiorer Colliculus;

Zusammenfassend ist festzustellen, dass: **(1)** *mPet-1* in der *En-1<sup>mPet-1/+</sup>* Maus wie erwartet ektopisch in der MHR, respektive in der *En-1* Expressionsdomäne exprimiert wird. **(2)** die Translatierbarkeit des Transgens mittels einer X-Gal Färbung gezeigt wurde. **(3)** sich die ektopische Expression von *mPet-1* während der Embryonalentwicklung in Gewebsdefekten der MHR äußert und im adulten Tier zu einem nahezu vollständigen Verlust des inferioren Colliculus und Teilen des Cerebellums führt. **(4)** terminale serotonerge Marker weder im Isthmus noch im ventralen Mesencephalon ektopisch induziert werden. Somit zeigt die heterozygote *En-1<sup>mPet-1/+</sup>* Mutante zwar einen Musterbildungsphänotyp in der MHR aber nicht wie aufgrund unserer Hypothese erwartet eine Induktion serotonerger Neuronen. Eine mögliche Ursache für den fehlenden serotonergen Phänotyp könnte ein Gendosis-Effekt sein: d.h., eine ektopische *mPet-1* mRNA Kopie und somit die Menge ektopischen Proteins reicht nicht aus um terminale serotonerge Marker zu induzieren. Aus diesem Grund wurde die Analyse mit den homozygoten *En-1<sup>mPet-1/mPet-1</sup>* Mäusen fortgesetzt.

### 3.6 DIE ANALYSE DER *EN-1<sup>MPET-1/MPET-1</sup>* MAUS

Da in *En-1<sup>mPet-1/mPet-1</sup>* Embryonen beide *En-1* Allele durch je eine *mPet-1* mRNA Kopie ersetzt wurden, entstand eine Null-Mutation für *En-1*, die wie schon einleitend in (2.4.1) beschrieben zu einer Deletion der Mittel-Hinterhirn-Region (ABB.: 34) führt. Die *En-1<sup>mPet-1/mPet-1</sup>* Mäuse sterben ebenso wie die *En-1<sup>null/null</sup>* Mutanten (WURST ET AL., 1994) kurz nach der Geburt. Somit war es nicht möglich eine , homozygote Linie zu etablieren. Dennoch konnte ein möglicher, serotonerger Phänotyp in der ventralen MHR der frühen *En-1<sup>mPet-1/mPet-1</sup>* Embryonen studiert werden. Die analysierten *En-1<sup>mPet-1/mPet-1</sup>* Embryonen stammen aus Kreuzungen heterozygoter Geschwister der F2 Generation mit einem gemischten 129SvJ / C57BL6/N Hintergrund und konnten aufgrund ihrer veränderten Morphologie ab dem Stadium E9.5 eindeutig identifiziert werden (ABB.: 34).

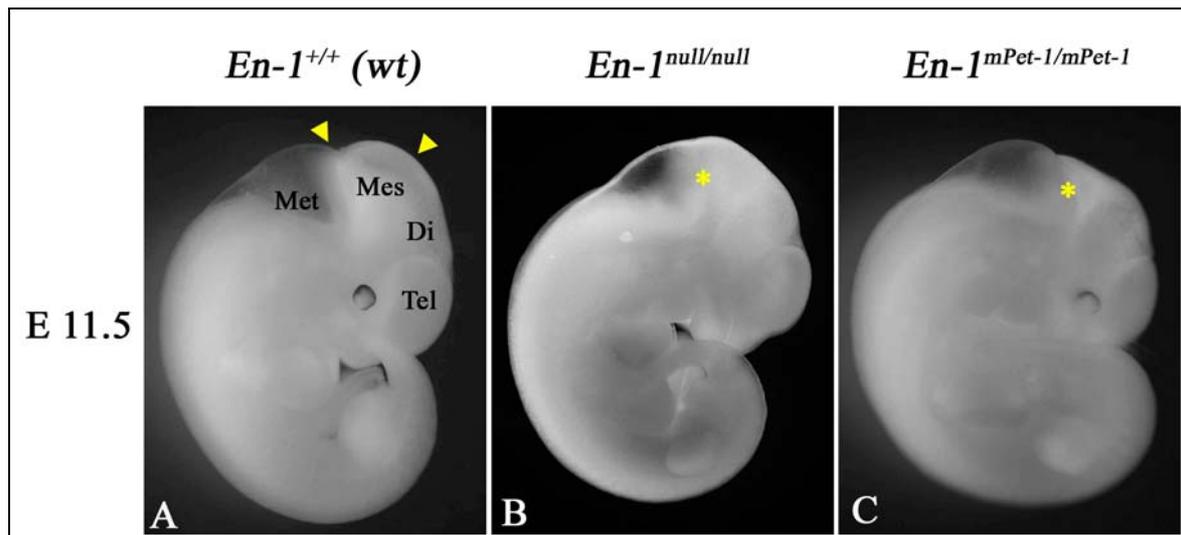


ABB.: 34

**DIE DELETION DER MHR IN HOMOZYGOTEN *mPET-1* MUTANTEN**

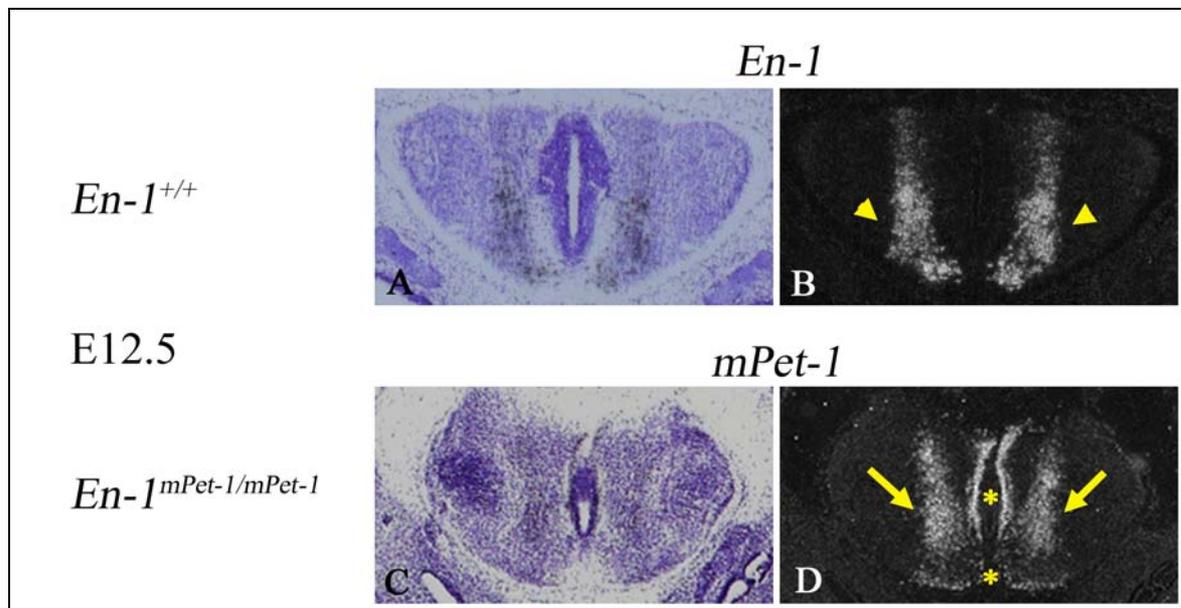
(A-C) Dunkelfeldaufnahmen von Embryonen des Stadiums E11.5 in der lateralen Ansicht. Die in der homozygoten *mPet-1* Mutanten (C,) ebenso wie in der *En-1* Null-Mutanten (B) deletierte MHR (Sterne) ist im Wildtyp (A) durch **gelbe Pfeilspitzen** gekennzeichnet. Met, Metencephalon; Mes, Mesencephalon, Di, Diencephalon; Tel, Telencephalon

Ebenso wie die heterozygoten (s. 3.5), wurden auch die homozygoten Embryonen im Hinblick auf eine Veränderung in der Markergenexpression serotonerger Neuronen untersucht. *En-1<sup>null/null</sup>* und *En-1<sup>+/+</sup>* Embryonen wurden als Kontrolle verwendet um auszuschließen, dass ein eventueller, serotonerger Phänotyp der *En-1<sup>mPet-1/mPet-1</sup>* Mäuse durch die entstehende *En-1* Null-Mutation verursacht wird. Die vergleichende Expressionsanalyse bei E12.5 umfasste die *Upstream*-Gene *Nkx2.2* und *Lmx1b*, sowie die postmitotischen serotonergen Markergene *mPet-1*, *Sert* und *TpH*. Eine Veränderung in der Verteilung von 5-HT wurde ebenfalls untersucht.

**3.6.1 DIE EKTOPISCHE *mPET-1* EXPRESSION IN DER HOMOZYGOTEN MUTANTEN**

In homozygoten *mPet-1* Mutanten stellt sich die ektopische *mPet-1* Expression, bei E12.5, wie die *En-1* Expression in der ventralen MHR von heterozygoten Embryonen dar. Neben Strukturen wie der Substantia nigra (DATEN NICHT GEZEIGT), ist *mPet-1* ektopisch in der Pons homozygoter Tiere exprimiert (ABB.: 35 D, PFEILE) Diese, bilateral zur endogenen *mPet-1* Expression im Nucleus raphe pontis (ABB.: 35 D, STERN), positionierte Regionen sind identisch mit der pontinen *En-1*

Expressionsdomäne im Wildtyp (ABB.: 35 B, PFEILSPITZEN). Ventral wird die ektopische *mPet-1* Region durch die endogene *mPet-1* Expression im Nucleus raphe magnus begrenzt (ABB.: 35 D, STERN). Im Wildtyp ist *En-1* nicht in den pontinen Raphe-Kernen detektierbar (Abb.: 35 B).



**ABB.: 35** *MPET-1* IST IN DER PONS EKTOPISCH EXPRIMIERT

(A,B) Wildtyp (*En-1<sup>+/+</sup>*); *in-situ* Hybridisierung mit der *En-1* Antisense-Sonde; (B,D) Homozygote Mutante (*En-1<sup>mPet-1/mPet-1</sup>*); *in-situ* Hybridisierung mit der *mPet-1* CDS Antisense-Sonde; (A,C) Hellfeldaufnahmen; (B,D) korrespondierende Dunkelfeldaufnahmen. *mPet-1* ist bei E12.5 ektopisch (D, Pfeile) vergleichbar mit der wildtypischen *En-1* Expression (B, Pfeilspitzen) in der Pons detektierbar. Die endogene *mPet-1* Expression beschreibt die Nuclei raphe pontis und raphe magnus (gelbe Sterne).

### 3.6.2 DIE EKTOPISCHE INDUKTION VON *SERT*

Wie aufgrund bisher gezeigter Expressionsdaten zu erwarten, sind *mPet-1* und *Sert* in den serotonergen Kernen des Metencephalons von homozygoten Tieren und auch in den Kontrollembryonen (*En-1<sup>+/+</sup>*; *En-1<sup>Null/Null</sup>*) co-exprimiert. In der Pons ist die endogene Co-Expression beider Gene im Nucleus raphe pontis und im Nucleus raphe magnus detektierbar (ABB.: 36 UND DATEN NICHT GEZEIGT). Interessanterweise konnte auf coronalen Schnitten bei E12.5 gezeigt werden, dass *Sert* spezifisch in der pontinen, ektopischen *mPet-1* Expressionsdomäne homozygoter Mutanten (*En-1<sup>mPet-1/mPet-1</sup>*) induziert ist (ABB.: 36 E, PFEILE; ABB.: 36 F, PFEILSPITZEN). Jedoch

konnte dieses Ergebnis bei E12.5 in einem weiteren Embryo nicht reproduziert werden (DATEN NICHT GEZEIGT). In den Kontrollembryonen (ABB.: 36 A-C; G-I) konnte eine ektoische *mPet-1* und *Sert* Expression nicht detektiert werden.

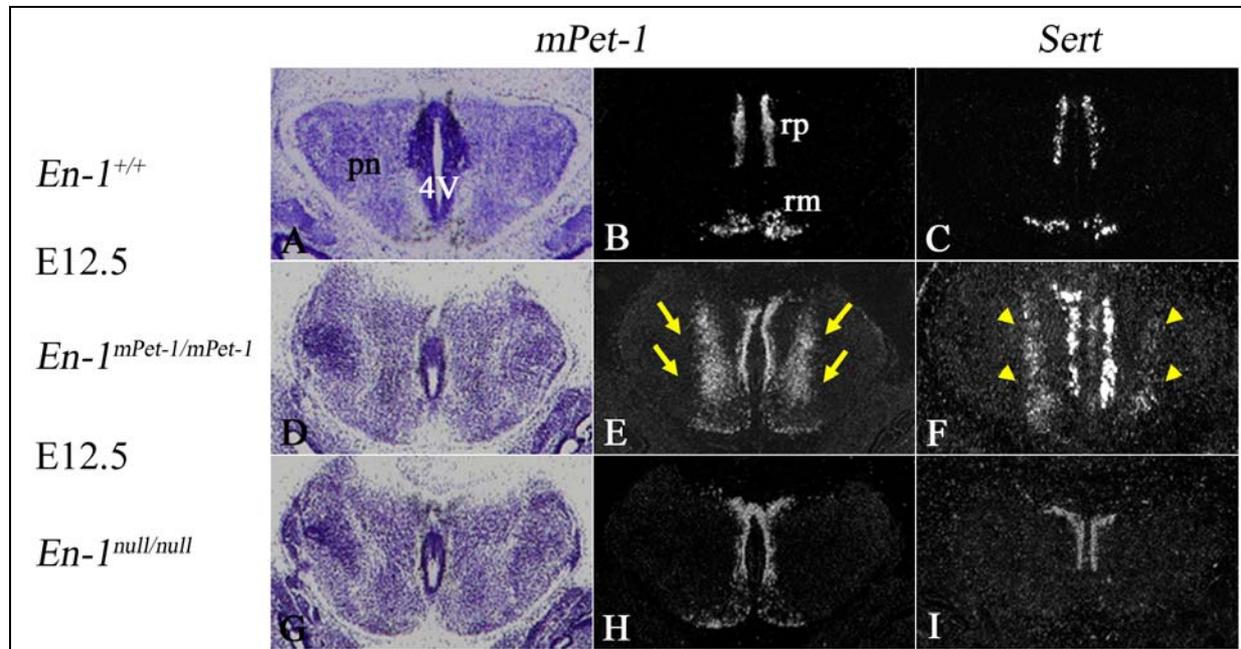


ABB.: 36

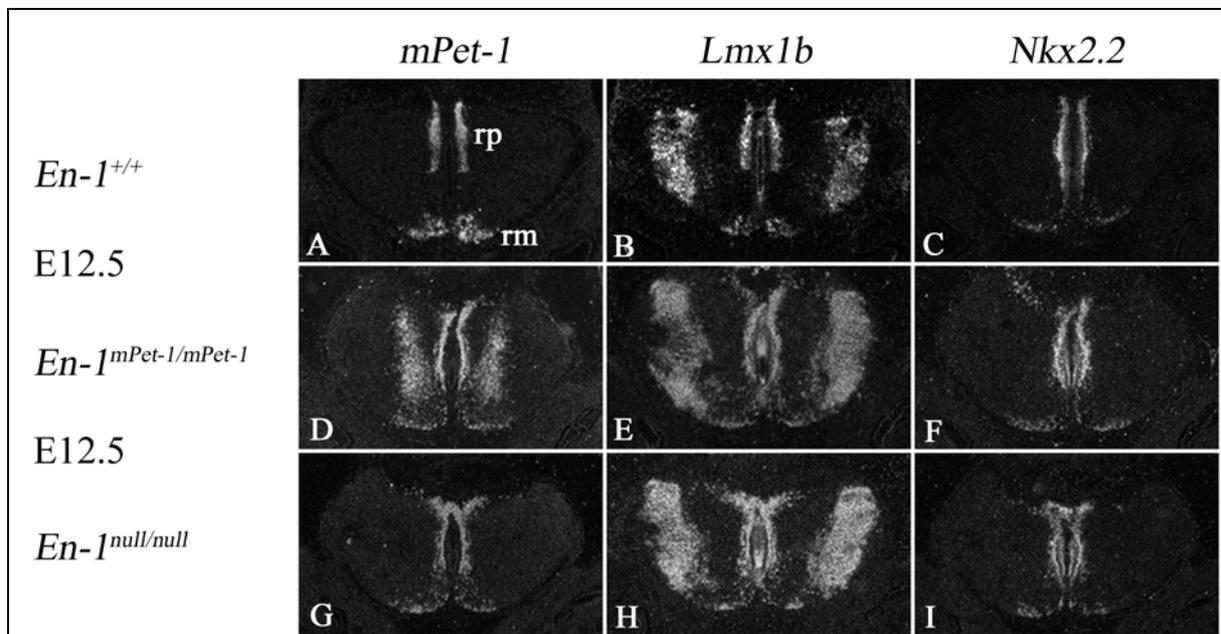
**DIE EXPRESSION VON *SERT* IN DER HOMOZYGOTEN *EN-1*<sup>MPET-1/MPET-1</sup> MUTANTEN**

(A,B,D,E,G,H) *In-situ* Hybridisierungen mit der *mPet-1* CDS-Sonde und (C,F,I) mit der *Sert* Sonde, auf coronalen Paraffinschnitten bei E12.5. Die endogene *mPet-1* Expression ist im Wildtyp (A,B), in der *mPet-1* Mutanten (D,E) und in der *En-1* Mutanten (G,H) sowohl im Nucleus raphe pontis als auch im Nucleus raphe magnus detektierbar. Die Expression von endogenem *Sert* in der Pons (C,F,I) entspricht diesem Profil (Vgl. B,C ; E,F ; H,I). Im Gegensatz zu den Kontrollen (A,B,C,G,H,I) ist *mPet-1* (E, Pfeile) in den *En-1*<sup>*mPet-1/mPet-1*</sup> Mutanten ektoisch, in der Pons exprimiert. In dieser Domain konnte *Sert* detektiert werden (F, Peilspitzen).

pn, Pons; 4V, vierter Ventrikel; rp, Nucleus raphe pontis; rm, Nucleus raphe magnus

### 3.6.3 DIE *NKX2.2* UND *LMX1B* EXPRESSION ENTSPRICHT IN DER HOMOZYGOTEN MUTANTEN BEI E12,5 DER WILD-TYPISCHEN EXPRESSION

Wie in der Einleitung bereits dargestellt agiert *Nkx2.2* in der serotonergen Spezifizierungskaskade stromaufwärts von *mPet-1* und stromabwärts von *Shh*. *Lmx1b* kann in der genetischen Hierarchie auf der gleichen Ebene wie *mPet-1* positioniert werden (ABB. 8). In den Mutanten und in den Kontrollen sind *Nkx2.2* und *Lmx1b*, bei E12.5, in den serotonergen Zellen der Raphe Kerne co-exprimiert (ABB.: 37). In der ektopischen, *mPet-1/Sert* positiven Region, der Pons konnte jedoch eine vergleichbare Co-Lokalisation und somit eine ektopische Induktion von *Nkx2.2* und *Lmx1b*, nicht festgestellt werden (VGL. ABB.: 36 E,F MIT ABB.: 37 E,F).

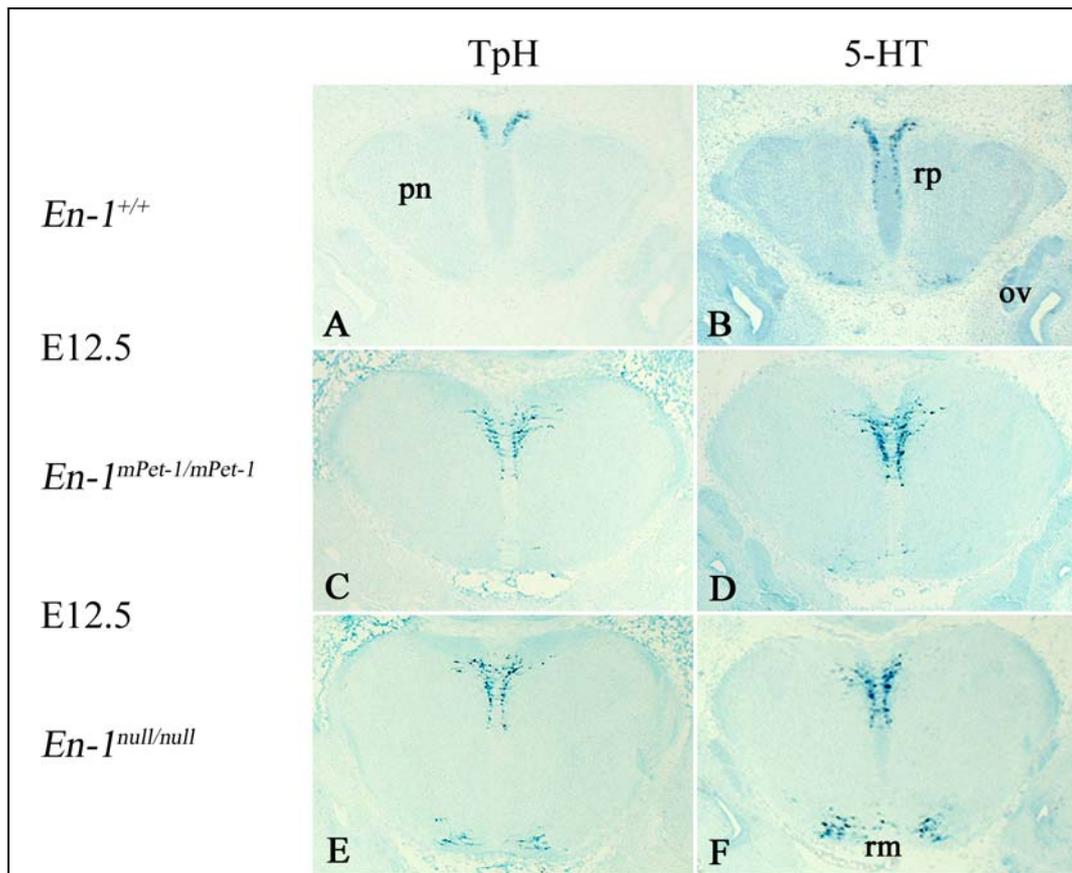


**ABB.: 37** *NKX2.2* UND *LMX1B* SIND IN DER HOMOZYGOTEN MUTANTEN NICHT EKTOPISCH EXPRIMIERT

(A,B,C) Wildtyp; (D,E,F) Homozygote *mPet-1* Mutante; (G,H,I) *En-1* Null-Mutante; (A-I) Dunkelfeldaufnahmen von *in-situ* Hybridisierungen auf coronalen Paraffinschnitten mit der *mPet-1* CDS Sonde (A,D,G), mit der *Lmx1b* Sonde (B,E,H) und mit der *Nkx2.2* Sonde (C,F,I). Die Expressionsmuster von *Lmx1b* und *Nkx2.2* sind in der *En-1<sup>mPet-1/mPet-1</sup>* Mutanten, verglichen mit den Kontrollembryonen (*En-1<sup>+/+</sup>*, *En-1<sup>Null/Null</sup>*), nicht verändert. aq, Aquedukt; rm, Nucleus raphe magnus; rp, Nucleus raphe pontis; sn, Substantia nigra

### 3.6.4 TPH UND 5-HT SIND IN DER EKTOPISCHEN *MPET-1* POSITIVEN REGION DER PONS NICHT INDUZIERT

Ausdifferenzierte serotonerge Neuronen sind durch die Expression von *Sert* und *TpH* sowie durch die Präsenz des Neurotransmitters 5-HT definiert. Um zu untersuchen ob durch die ektopische *mPet-1* Expression die Marker *TpH* und 5-HT induziert werden, wurden Immunfärbungen mit  $\alpha$ -*TpH* und  $\alpha$ -5-HT Antikörpern durchgeführt.



**ABB.: 38** TPH UND 5-HT SIND IN DER PONS DER *EN-1<sup>MPET-1/MPET-1</sup>* MUTANTEN NICHT EKTOPISCH EXPRIMIERT

(A,C,E) Immunfärbungen mit  $\alpha$ -*TpH* und (B,D,F) mit  $\alpha$ -5-HT auf konsekutiven Coronschnitten; (A,B) Wildtyp; (C,D) Homozygote *mPet-1* Mutante; (E,F) *En-1* Null Mutante. In der homozygoten *mPet-1* Mutanten sind *TpH* (C) und 5-HT (D) ebenso wie in den Kontrollen (A,B ; E,F) in den serotonergen Kerngebieten co-exprimiert. Ektopisch konnte weder *TpH*, noch 5-HT detektiert werden (VGL. C,D UND ABB.: 36 E,F) pn, Pons; rp, Nucleus raphe pontis; rm Nucleus raphe magnus

Wie aus ABB.: 38 zu entnehmen konnte TpH und 5-HT in den serotonergen Zellen der Raphe Kerne, sowohl in der homozygoten Mutanten (*En-1<sup>mPet-1/mPet-1</sup>*) als auch in den Kontrollen (*En-1<sup>+/+</sup>*; *En-1<sup>null/null</sup>*), detektiert werden. In der ektopischen *mPet-1* Region (ABB.: 36 E) hingegen, konnte die Expression von TpH und 5-HT Protein nicht nachgewiesen werden (ABB.: 38 C,D).

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass: **(1)** auch zwei zusätzliche *mPet-1* mRNA Kopien nicht ausreichend sind um ektopisch serotonerge Neuronen zu induzieren. **(2)** *Sert* in der homozygoten Situation, bei E12.5, ektopisch in der Pons induziert wurde (n=1), jedoch dieses Resultat in einem weiteren Tier der F2 Generation mit einem gemischten 129SvJ X C57BL6/N Hintergrund nicht reproduzierbar war. **(3)** *Nkx2.2* und *Lmx1b* bei E12.5 im Gegensatz zu der endogenen *mPet-1/Sert* Expression in den Raphe Kernen, mit der ektopischen *mPet-1/Sert* Expression nicht co-lokalisiert sind.

## 4 DISKUSSION

---

In der vorliegenden Arbeit wurde die *mPet-1* cDNA isoliert und der genomische Locus identifiziert sowie die genomische Struktur des *mPet-1* Gens aufgeklärt. Anhand von Sequenzvergleichen auf Nukleotidebene und auf Proteinebene wurde gezeigt, dass *mPet-1* das orthologe Gen zu dem Rattengen *Pet-1* und dem humanen Gen *FEV* darstellt. Eine Ets-Domäne im N-terminus des Proteins klassifiziert *mPet-1* als Ets-Transkriptionsfaktor und in der phylogenetischen Analyse konnte *mPet-1* der Subfamilie der Fli-1 Faktoren zugeordnet werden. In der Expressionsanalyse wurde gezeigt, dass *mPet-1* im Gehirn ausschließlich in serotonergen Neuronen exprimiert wird, und der früheste Marker für serotonerge Neuronen ist (PFAAR ET AL., 2002). Diese spezifische, frühe Expression und die Tatsache, dass Ets-Proteine wichtige Regulatoren in der Entwicklung verschiedenster Organsysteme darstellen (BARTEL ET AL., 2000) deuten darauf hin, dass *mPet-1* an der Spezifizierung serotonerger Neuronen instrumentell beteiligt sein könnte. Nach Erkenntnissen aus *LOF*-Studien (*loss of function*), die in der Maus durchgeführt wurden, ist *mPet-1* ein essentielles Molekül des genetischen Programms, welches die Differenzierung serotonerger Neuronen auslöst. Im *K.O.* Experiment konnte der Verlust der Marker *Sert*, *TpH* und 5-HT, die ausdifferenzierte serotonerge Neuronen charakterisieren, gezeigt werden (HENDRICKS ET AL., 2003). Diese Daten deuten darauf hin, dass *mPet-1* in der Signaltransduktionskaskade zur Spezifizierung serotonerger Neuronen stromaufwärts von *TpH*, *Sert*, und 5-HT zu positionieren ist. Da im *LOF*-Experiment keine Aussage darüber getroffen werden kann, ob *mPet-1* ausreichend ist um serotonerge Neurone zu spezifizieren, wurde im Rahmen dieser Arbeit ein *GOF*-Experiment (*gain of function*) durchgeführt. Indem die *mPet-1* cDNA unter die Kontrolle des *En-1* Promoters gebracht wurde entstand ein Tiermodell, an dem eine mögliche induktive Funktion von *mPet-1* während der gesamten Embryonalentwicklung regionspezifisch im Mes-/Metencephalon studiert werden konnte. In diesem Modellsystem konnte gezeigt werden, dass eine vorzeitige und ektopische Expression von *mPet-1* in der MHR weder in den heterozygoten, noch in den homozygoten Mutanten zur ektopischen Induktion serotonerger Neuronen führt. Interessanterweise konnte aber eine ektopische Induktion des *Serotonintransporters* (*Sert*) in der Pons von einem homozygoten Tier gezeigt werden. Dies ist ein Hinweis darauf, dass *mPet-1* nicht nur für die Differenzierung

serotonerger Neuronen notwendig ist (HENDRICKS ET AL., 1999, 2003) sondern auch ausreicht um den Serotonintransporter (*Sert*) in Abhängigkeit der Gendosis und des Zellkontextes zu induzieren. Gegenwärtig ist nicht klar wieso dieser ursprüngliche Befund nicht bestätigt werden konnte. Eine Ursache hierfür könnte der genetische Hintergrund sein, da die Experimente in einem gemischten C57/BL6 X 129/SvJ durchgeführt wurden. Um diese Hypothese zu überprüfen, müssten diese Analysen auf einem reinen C57/BL6 bzw. 129/SvJ wiederholt werden.

Außerdem wurde ein Musterbildungsdefekt des inferioren Colliculus und des Cerebellums in der heterozygoten Mutante beobachtet, der jedoch nicht erwartet war. Dieser Phänotyp deutet auf ein regulatorisches *Feedback* (*mPet-1* → *En-1*) hin.

#### 4.1 DIE MOLEKULARE ANALYSE VON *MPET-1*

Wie in Kapitel 3.1 beschrieben wurde in der Maus der neue Ets-Faktor *mPet-1* identifiziert, und seine genomische Organisation aufgeklärt. Die abgeleitete Primärstruktur des Proteins weist eine hochkonservierte, N-terminale Ets-DNA-Bindungsdomäne und eine alaninreiche C-terminale Repressordomäne auf. Phylogenetische Analysen zeigten, dass die Ets-Domäne von *mPet-1* am nächsten mit den Ets-Domänen der FLI-1/ERG Proteinen verwandt und somit dieser Subfamilie von Ets-Faktoren zugeordnet werden kann. Innerhalb der Ets-Domäne ist die Aminosäuresequenz zwischen den Spezies Maus, Ratte und Mensch zu 100% konserviert. Außerhalb der DNA-Bindungsdomäne bestehen jedoch zum Teil erhebliche Unterschiede zwischen den Proteinen. Verglichen mit *mPet-1* sind im humanen FEV Protein 8 Aminosäuren ausgetauscht und in Position 200 findet sich ein zusätzliches Prolin. Diese Unterschiede sind sehr wahrscheinlich evolutionär begründet, da es sich bei evolutionär bedingten Mutationen meist um Punktmutationen handelt, die zu einer Substitution einzelner Aminosäuren führen. Das Rattenprotein *Pet-1* besitzt am N-Terminus im Vergleich zu *mPet-1* 103 zusätzliche Aminosäuren. Dies könnte zu der Annahme führen, dass die von uns isolierte cDNA am 5' Ende nicht vollständig ist. Das ist jedoch aus folgenden Gründen nicht anzunehmen: 54 bp stromaufwärts unseres designierten Startcodons befindet sich ein Stop-Codon im gleichen Leseraster, und 260 bp stromaufwärts konnte eine *TATA-Box* in der Promoterregion identifiziert werden. Außerdem konnte in diesem Sequenzbereich kein weiteres ATG, in keinem der 3 Leseraster, identifiziert werden und im humanen Protein FEV wird ebenfalls das von uns als

Startcodon bestimmte ATG als funktionelles ATG benutzt. Die Richtigkeit unserer publizierten *mPet-1* Sequenz (PFAAR ET AL., 2002) bestätigt sich zudem in der von HENDRICKS ET AL., 2003 veröffentlichten Mausequenz, die unseren Daten entspricht. Weiterhin könnte spekuliert werden, dass bei der Isolierung der Ratten cDNA ein technisches Problem vorlag oder dass, *Pet-1* ein anderes Gen ist und nicht wie *FEV* ein Ortholog darstellt. Dies erscheint jedoch sehr unwahrscheinlich, weil sich *Pet-1* und *mPet-1* lediglich durch die 103 zusätzlichen N-terminalen Aminosäuren unterscheiden und die Primärstruktur ansonsten völlig identisch ist. Somit ist davon auszugehen, dass *Pet-1* ebenfalls ein Ortholog zu *mPet-1* ist und es sich um hier um eine Speziesvariation handeln könnte.

## 4.2 DIE *MPET-1* EXPRESSION

*mPet-1* ist ein seltenes Beispiel für ein Transkriptionsfaktorgen, das im Gehirn ein sehr spezifisches und eng begrenztes Expressionsmuster zeigt. Auch außerhalb des ZNS ist *mPet-1* nur in wenigen Geweben exprimiert.

Anhand der Northern-Blot Analyse an ausgewählten adulten Geweben konnte gezeigt werden, dass *mPet-1* im Hoden exprimiert wird. Die *in-situ* Hybridisierung zeigte, dass *mPet-1* in den reproduktiven Zellen (Spermatogonien-, zyten-, tiden) lokalisiert ist. Serotonin ist jedoch in den Lyedig'schen Zellen sowie in den Mastzellen der Hoden vorhanden (CSABA ET AL., 1998; FRUNGIERI ET AL., 1999). Da *mPet-1* und 5-HT im Hoden nicht co-exprimiert sind, kann *mPet-1* dort auch nicht, im Gegensatz zum ZNS, in die Induktion von 5-HT involviert sein. Weiterhin beeinträchtigt *mPet-1* die Fertilität adulter Mäuse nicht, denn die heterozygote *mPet-1* Mutante ist fertil. Folglich hat *mPet-1* im Hoden eine andere Funktion als im ZNS, die aufzuklären bleibt.

In den entereochromaffinen Zellen und im Nervensystem des Darms befinden sich etwa 90% der gesamten Serotoninmenge des menschlichen Organismus. In der Ratte wird *Pet-1* im Darm exprimiert (FYODOROV ET AL., 1998). In der Maus hingegen ist *mPet-1*, wie in der Northern-Blot Analyse gezeigt, dort nicht exprimiert. Dies könnte auf Speziesunterschiede zurückzuführen sein. Weiterhin bedeutet dies, dass *mPet-1* in der Maus ausschließlich in die Spezifizierung der zentralen serotonergen Neuronen involviert ist und nicht in die Spezifizierung der serotonergen Neurone des Darmes. Damit unterscheiden sich die serotonergen Zellen im Darm in ihrer

Entstehung von denen des ZNS. Ein weiterer Hinweis darauf, dass es sich bei den serotonergen Neuronen des Darmes und denen des ZNS um grundsätzlich unterschiedliche Populationen handelt, ist der Befund, dass die Serotoninsynthese im ZNS von *Tph-2* und im Darm *Tph-1* kontrolliert wird (WALTHER UND BADER, 2003; WALTHER ET AL., 2003; ZHANG ET AL., 2004).

Erstaunlicherweise konnte die *mPet-1* Expression im Gehirn durch Northern-Blot-Analysen nicht nachgewiesen werden. Eine mögliche Ursache hierfür ist, dass verglichen mit der Gesamtzellzahl des adulten Gehirns, *mPet-1* nur in wenigen Zellen exprimiert wird und somit die *mPet-1* Expression unter der Nachweisgrenze der Northern-Blot Analyse bleibt, obwohl *polyA<sup>+</sup>* RNA des gesamten Gehirns verwendet wurde. Im Gegensatz hierzu konnte bei der *in-situ* Hybridisierung *mPet-1* entlang der A/P Achse im sich entwickelnden dorsalen Rhombencephalon in 2 Clustern detektiert werden und markiert spezifisch ein einziges Neurotransmittersystem, denn die beiden Expressionsdomänen entsprechen dem rostralen und dem caudalen Cluster serotonerger Neuronen (LAUDER UND BLOOM, 1974; LAUDER ET AL., 1982). Somit unterscheidet sich *mPet-1* von den anderen Transkriptionsfaktoren, die in die Spezifizierung serotonerger Neuronen involviert sind. So sind beispielsweise *Nkx2.2* und *Lmx1b* oder die *Gata* Faktoren neben ihrer Expression in der serotonergen Zellpopulation auch in anderen Regionen des Gehirns exprimiert. *Lmx1b* kann in der Substantia nigra, des ventralen Tegmentums und auch in der lateralen pontinen Region detektiert werden. *Nkx2.2* ist in ventralen Vorläuferzellen des Neuralrohres exprimiert und spielt eine wichtige Rolle bei der Neurogenese und der Musterbildung in der ventralen MHR und im Rückenmark (BRISCOE ET AL., 1999; HENDRICKS ET AL., 1999).

Das präzise *mPet-1* Expressionsmuster deutet darauf, dass *mPet-1* spezifisch an der Entwicklung serotonerger Neuronen beteiligt ist. Diese Vermutung wurde im *LOF*-Experiment untersucht. In *mPet-1* defizienten Mäusen konnte interessanterweise gezeigt werden, dass zentrale serotonerge Neuronen etwa zu 80%, gemessen an der Markergenexpression (z.B. *Sert*, *Tph*) nicht ausdifferenzieren (HENDRICKS ET AL., 2003). Somit kann die Aussage getroffen werden, dass *mPet-1* ein essentieller Faktor des genetischen Programms darstellt welches die Differenzierung zentraler serotonerger Neuronen steuert. Dass jedoch nur 80% der serotonergen Zellen nicht differenziert werden, könnte damit zusammenhängen, dass wir (PFAAR ET AL., 2002) in der adulten Expressionsanalyse des Wildtyps zeigen konnten, dass nicht alle *Sert*

positiven Zellen auch *mPet-1* exprimieren. Somit ist *mPet-1* für die Aufrechterhaltung einer Subpopulation notwendig. Ähnliches konnte vor kurzem für *Pitx-3* im dopaminergen System gezeigt werden. Entgegen früherer Annahmen markiert *Pitx-3* im adulten Tier auch nur eine Subpopulation der mesencephalen dopaminergen Neuronen. (SMIDT ET AL., 1997). Unter diesem Aspekt stellt sich daher die Frage, ob *mPet-1* in der Tat ausreicht um alle serotonergen Neurone zu spezifizieren, oder ob *mPet-1* eher ein Faktor ist, der für die Aufrechterhaltung des serotonergen Phänotyps ausschließlich in einer großen Subpopulation (80%) notwendig ist.

Das LOF-Experiment kann weiterhin keine Auskunft darüber geben, ob *mPet-1* ausreicht, um diese 80% serotonerger Neuronen zu spezifizieren. Als ein Hinweis dafür ist neben der spezifischen Expression vor allem in Betracht zu ziehen, dass *mPet-1*, wie von uns gezeigt (PFAAR ET AL., 2002), den frühesten Marker für serotonerge Neurone darstellt. Um nun diese Frage zu beantworten ob *mPet-1* ausreicht den serotonergen Phänotyp zu induzieren wurde im Rahmen dieser Arbeit ein GOF-Experiment durchgeführt.

#### 4.3 DIE HETEROZYGOTE *MPET-1* MUTANTE ZEIGT KEINEN SEROTONERGEN PHÄNOTYP

Im GOF-Experiment wurde eine klassische *Knock-In* Strategie verfolgt und *mPet-1* ektopisch unter dem *En-1* Promoter exprimiert. Entscheidend für die Wahl des *En-1* Promoters war, dass die *En-1* Expressionsdomäne in der ventralen MHR mit der Expression der Faktoren *Shh*, *Fgf-8*, *Nkx2.2* und *Lmx1b*, korreliert. Somit konnte sichergestellt werden, dass die räumliche und zeitliche Erweiterung der natürlichen *mPet-1* Expressionsdomäne mit den Faktoren überlappt, die an der frühen neuronalen Musterbildung und auch an der Spezifizierung serotonerger Vorläuferzellen beteiligt sind.

Serotonerge Neurone und mesencephale, dopaminerge Neurone entwickeln sich aus ventralen Vorläuferzellen in der proliferativen Zone der Basalplatte. Ihre Induktion wird von *Shh* und *Fgf-8* (HYNES AND ROSENTHAL, 1999; GORIDIS UND ROHRER, 2002) reguliert. Für die Induktion der serotonergen Neuronen in r1 ist *Nkx2.2* nicht notwendig (BRISCOE ET AL., 1999). Obwohl im ventrorostralen Metencephalon der *En-1<sup>mPet-1/+</sup>* Mutanten alle Faktoren vorhanden sind, die für Spezifizierung serotonerger Neuronen notwendig sind, konnten jedoch durch die ektopische *mPet-1* Expression postmitotische serotonergen Marker in dieser Region, d.h. außerhalb der

rostralen Raphe Kerne, nicht ektopisch induziert werden. Da in der *En-1<sup>mPet-1/+</sup>* Maus nur *mPet-1* ektopisch exprimiert wird und die Determinanten, die in der serotonergen Spezifizierungskaskade stromaufwärts von *mPet-1* zu positionieren sind, in ihrem Expressionsprofil nicht verändert sind, deutet dieses Ergebnis darauf hin, dass *mPet-1* alleine nicht ausreicht um serotonerge Neurone, zu spezifizieren.

Die ektopische *mPet-1* Expression unter den *En-1* Promoter in der gesamten MHR führt auch zu einer rostralen Verschiebung der endogenen *mPet-1* Expressionsdomäne über den MHO hinweg. Somit ist *mPet-1* in der SN und in der VTA exprimiert. *Lmx1b* ist nicht nur in serotonergen Neuronen sondern auch in den mesencephalen dopaminergen Neuronen exprimiert. Somit ist, vermittelt durch *Shh* und *Fgf-8*, kompetentes Gewebe und auch die Faktoren *Lmx1b* und *mPet-1* die für die Spezifizierung serotonerger Neuronen notwendig sind, im ventralen Mesencephalon ebenso wie im ventralen Metencephalon vorhanden. Dennoch konnten serotonerge Neurone dort nicht induziert werden. Mehrnoch, die Entwicklung der mesencephalen dopaminergen Neuronen ist nicht durch die ektopische *mPet-1* Expression beeinträchtigt. Dies deutet darauf hin, dass noch andere Faktoren notwendig sind um rostrale, serotonerge Neurone zu spezifizieren. Zum einen könnte dies der induzierende Faktor *Fgf-4* sein, der im Mesencephalon nicht exprimiert ist. Zum anderen könnten noch unbekannte Faktoren, die durch *Otx-2* im Mittelhirn induziert werden oder *Otx-2* selbst, die serotonerge Induktion in diesem Gebiet reprimieren. Dass in der Tat *Otx-2* oder eine durch *Otx-2* induzierte Genkaskade eine wichtige Rolle in der Spezifizierung von serotonergen Neuronen spielen könnte, wird durch den Phänotyp von Mausmutanten unterstützt, in denen die *Otx*-Dosis verringert bzw. *Otx-2* überexprimiert wurde. Im Falle der Verringerung der *Otx*-Dosis wird die serotonerge Zellpopulation vergrößert, während sie im Falle einer ektopischen Expression von *Otx-2* im rostralen Hinterhirn drastisch verringert wird (BRODSKI ET AL. 2003).

Neben den bereits genannten Ursachen könnte der fehlende serotonerge Phänotyp in der heterozygoten *En-1<sup>mPet-1/+</sup>* Mutante folgende Ursachen haben. **(1)** Das Transgen ist eventuell nicht funktionell. **(2)** Die Gendosis ist nicht ausreichend, um die Expression postmitotischer serotonerger Marker zu induzieren. *mPet-1* wird im Gegensatz zu seiner wildtypischen Expression schon bei E9.5 und vergleichbar mit *En-1* in der MHR auf beiden Seiten des MHO exprimiert. Auch bei E12.5 konnte eindeutig gezeigt werden, dass das Transgen ektopisch exprimiert wird. Mit dem

Nachweis der  $\beta$ -Galaktosidaseaktivität in der *En-1* Expressionsdomäne konnte die Expression der rekombinanten *mPet-1 IRES tau lacZ mRNA* bestätigt werden und zugleich wurde die Translatierbarkeit des mutierten Allels in einer Farbreaktion gezeigt. Ein direkter Beweis für das ektopisch vorhandene mPet-1 Protein war jedoch nicht möglich, da für mPet-1 kein Antikörper zur Verfügung stand und der alternativ verwendete  $\alpha$ -FEV (human) Antikörper keine Kreuzreaktivität mit mPet-1 der Maus zeigte. Somit kann man aufgrund dieser Ergebnisse davon ausgehen, dass das Transgen in der gewünschten Art und Weise funktioniert und der fehlende Phänotyp in der *En-1<sup>mPet-1/+</sup>* Mutanten eventuell auf einen Gendosiseffekt zurückzuführen ist und eine zusätzliche *mPet-1* Kopie nicht ausreicht um einen serotonergen Phänotyp zu induzieren.

Weiterhin muss man in Betracht ziehen, dass zum Zeitpunkt der Analyse im transgenen Allel das Neomycinresistenzgen zur Selektion homolog rekombinierter ES-Zellklone noch vorhanden war. Dieses Antibiotikaresistenzgen kann die Expression benachbarter Gene herunterregulieren und somit den Phänotyp des transgenen Tieres beeinflussen. (OLSON ET AL., 1996; PHAM ET AL., 1996; FLOSS ET AL., 1996; BROCCOLI ET AL., 1999). Aus diesem Grund sollte die mit *loxP* Seiten flankierte Neomycinresistenz, nachdem die mutante Mauslinie etabliert ist, durch Einkreuzen einer Mauslinie, die die Cre-Rekombinase exprimiert, entfernt werden. Dies ist Gegenstand aktueller Kreuzungen. Die Analyse dieser Tiere wird in Kürze Aufschluss darüber geben können, ob die Neomycinresistenz-Genkassette tatsächlich die ektopische Induktion serotonerger Neurone in der *En-1<sup>mPet-1/+</sup>* Maus inhibiert, obwohl das nach den bisher gezeigten Daten wahrscheinlich nur in geringem Ausmaß oder nicht der Fall ist. Würde die Neomycinresistenz-Genkassette die Expression des *mPet-1 IRES tau lacZ* Transgens signifikant herunterregulieren, könnte die  $\beta$ -Galaktosidaseaktivität in der *En-1* Expressionsdomäne nicht oder nur schwach nachgewiesen werden. Weiterhin wäre die ektopische *mPet-1* Expression vermutlich stärker beeinträchtigt als gezeigt. Gegen eine starke Herunterregulierung der Expression des Transgens und für die Präsenz ektopischen *mPet-1* Proteins spricht weiterhin der Musterbildungsphänotyp in der *En-1<sup>mPet-1/+</sup>* Mutanten. So ist die Reduktion der *lacZ* Expression, die besonders deutlich im adulten inferioren Colliculus zu erkennen ist, wahrscheinlich eher auf den Verlust des Gewebes zurückzuführen, als auf eine *Downregulation* des *mPet-1* Transgens bedingt durch die Promoteraktivität des Neomycinresistenzgens.

#### 4.4 IN DER *EN-1<sup>mPET-1/+</sup>* MAUS LIEGT EIN MUSTERBILDUNGSDEFEKT DER MHR VOR

Wie bereits in der Einleitung dargestellt sind regionspezifisch exprimierte Transkriptionsfaktoren wie *Otx-2*, *Gbx-2*, *En-1*, und auch sezernierte Faktoren wie *Fgf-8* und *Wnt-1* von essentieller Bedeutung bei der neuronalen Musterbildung in der MHR (WURST ET AL., 2001; PRAKASH ET AL., 2004). *En-1* ist als permissiver Faktor für die Erhaltung der MHR von enormer Bedeutung. *En-1<sup>null/+</sup>* Mäuse zeigen keinen Phänotyp. *En-1<sup>null/null</sup>* Mäuse weisen neben Entwicklungsdefekten des Sklerotoms schon bei E9.5 eine Deletion der MHR auf. Neugeborene sterben kurz nach der Geburt und die Colliculi sowie das Cerebellum fehlen. (WURST ET AL., 1994). Der inferiore Colliculus ist bei E18.5 verkleinert und die anterobasale Region des sich entwickelnden Cerebellums fehlt in den *En-1<sup>mPet-1/+</sup>* Mutanten. Weiterhin konnte festgestellt werden, dass sowohl der inferiore Colliculus als auch Teile des Cerebellums in der adulten *En-1<sup>mPet-1/+</sup>* Mutanten fehlen. Die Art der Gewebedefekte deutet darauf hin, dass es sich eventuell um einen intermediären *En-1<sup>null/null</sup>* Phänotyp handeln könnte. Dieser Phänotyp wurde jedoch für die *En-1<sup>null/+</sup>* Mäuse nicht gezeigt, bei denen die Neomycinresistenz ebenso wie bei den *En-1<sup>mPet-1/+</sup>* Mutanten noch im *En-1* Locus integriert ist. Somit sind die morphologischen Defekte in der *En-1<sup>mPet-1/+</sup>* Mutanten höchstwahrscheinlich auf die vorzeitige und ektopische Expression des Ets-Faktors *mPet-1* unter dem *En-1* Promotor zurückzuführen.

Ets-Faktoren sind transkriptionelle Regulatoren mit diversen biologischen Funktionen und Aktivitäten (GHYSDAEL UND BOUREUX, 1997; PAPAS ET AL., 1997; DITTMER UND NORRHEIM, 1998; GHOSH UND KOLODKIN, 1998). Sie sind in Kooperation mit anderen Transkriptionsfaktoren und diversen Co-Faktoren in eine Vielzahl von Regulationsmechanismen involviert, die ein normales und abnormales Zellverhalten einschließlich Proliferation, Differenzierung, Zellmigration und Onkogenese kontrollieren. (WASYLYK ET AL., 1998; RAIBLE UND BRAND, 2001; SHARROCKS., 2001; OIKAVA ET AL., 2003). Die meisten Ets-Proteine agieren als Transkriptionsaktivatoren. Jedoch wurde für einige Familienmitglieder eine Funktion als Transkriptionsrepressor gezeigt. Hierzu zählen beispielsweise die Ets-Proteine ERF, Net, und Yan (O'NEILL ET AL., 1994; SGOURAS ET AL., 1995; MAIRA ET AL., 1996; SHARROCKS ET AL., 1997; CHAKRABARTI UND NUCIFORA, 1999; LOPEZ ET AL., 1999; SHARROCKS., 2001). *FEV* das humane *mPet-1* Ortholog ist in den centralen serotonergen Neuronen des Menschen spezifisch exprimiert und wurde ebenfalls als Transkriptionsrepressor identifiziert. Es konnte gezeigt werden, dass die direkte transkriptionelle Repression durch die

Alanin reiche carboxyterminale Domäne vermittelt wird (MAURER ET AL., 2003, 2004). Diese Domäne wurde auch in mPet-1 identifiziert. Somit argumentieren diese Daten dafür, dass mPet-1 als Transkriptionsrepressor agieren könnte. Vorausgesetzt, dass mPet-1 als Transkriptionsrepressor agiert und im *En-1* Promoter eine mPet-1 Bindestelle vorhanden ist, könnte mPet-1 an den *En-1* Promoter binden und sowohl das intakte *En-1* Allel als auch das mutierte *En-1<sup>mPet-1/+</sup>* Allel und somit sich selbst partiell herunterregulieren. Die etwas verminderte Expression des Transgens bei E9.5, E18.5 und in den adulten *En-1<sup>mPet-1/+</sup>* Mäusen würde diese Hypothese unterstützen. Diese verminderte *En-1* Aktivität könnte in dem hier beschriebenen Phänotyp resultieren, welcher durch einen verkleinerten IC und dem Fehlen des anterobasalen Lobus des Cerebellums charakterisiert ist: In *En-1<sup>mPet-1/+</sup>* Mäusen ist die *En-1* Gendosis einerseits nicht mehr ausreichend, um die vollständige Entwicklung der MHR wie in der *En-1<sup>null/+</sup>* Mutante zu gewährleisten, andererseits ist die *En-1* Gendosis noch zu hoch, um einen vollständigen *En-1<sup>null/null</sup>* Phänotyp zu generieren. Dadurch entsteht der beschriebene, morphologisch intermediäre Phänotyp.

Jedoch muss erwähnt werden, dass folgende Daten gegen eine Repressorfunktion von mPet-1 sprechen. In der Arbeit von HENDRICKS ET AL., 1999 wird gezeigt, dass die Promotoren von *Sert* und *TpH* Bindungsstellen für mPet enthalten, und im Knock-out Experiment wird gezeigt, dass in etwa 80% der serotonergen Zellen *Sert* und *Tph* nicht detektiert werden konnten, obwohl diese Zellen noch vorhanden sind. Weiterhin dürfte im Falle, dass mPet-1 als Repressor agiert keine ektopische *Sert* Expression in der Pons zu finden sein. Daher deuten diese Resultate eher darauf hin, dass mPet-1 als ein Transkriptionsaktivator fungiert.

Somit kann aus der bisherigen Datenlage keine definitive Aussage darüber getroffen werden ob mPet-1 als Transkriptionsrepressor oder als Transkriptionsaktivator zu klassifizieren ist. Möglicherweise agiert mPet-1 in Abhängigkeit des zellulären Kontextes, seiner Interaktionspartner oder aufgrund posttranslationeller Modifikationen sowohl als Aktivator als auch als Repressor.

Ein weiterer Erklärungsversuch für die Entstehung des Musterbildungsphänotyp könnte sein, dass ektopisches mPet-1 Protein in der MHR der *mPet-1* Mutanten in einem dominant negativen Mechanismus interagiert. Ets-Faktoren sind in entwicklungsrelevante Prozesse involviert. Im Zebrafisch konnte gezeigt werden, dass die Ets-Faktoren *ERM* und *PEA-3* als Zielgene von Fgf-8 an der Musterbildung in der

MHR beteiligt sind (RAIBLE UND BRAND 2001). Weiterhin formen Ets-Faktoren Heterodimere mit anderen Ets-Faktoren (POTTER ET AL., 2000). So ist beispielsweise Erg und ER-81(ETV-1) in einem Heterokomplex assoziiert (CARRERE ET AL., 1998). Somit wäre es durchaus denkbar, dass auch *mPet-1* mit ERM oder Pea-3 complexiert und das induktive Fgf-8 Signal des MHO dominant negativ inhibiert, was sich in der *En-1<sup>mPet-1/+</sup>* Mutanten in einem Musterbildungsdefekt äußern würde.

Abschließend ist festzustellen, dass die ektopische Expression von *mPet-1* unter dem *En-1* Promoter höchstwahrscheinlich ein Eingriff in das fein abgestimmte und komplexe genetische Netzwerk darstellt welches die normale Entwicklung der MHR kontrolliert. Ob dieser Eingriff auf eine Interaktion von *mPet-1* mit dem *En-1* Promotor zurückzuführen ist, oder ob weitere Transkriptionsfaktoren und morphogenetische Faktoren, welche ebenfalls unabdingbar für die korrekte Entwicklung der MHR sind (*Pax-2/5*, *Otx-2*, *Gbx-2*, *Fgf-8* und/oder *Wnt-1*), durch ektopisches *mPet-1* beeinflusst sind, bleibt abzuklären.

#### **4.5 SERT IST IN DER *EN-1<sup>MPET-1/MPET-1</sup>* MUTANTEN SPEZIFISCH UND EKTOPISCH INDUZIERT, JEDOCH NICHT DER KOMPLETTE SEROTONERGE PHÄNOTYP**

Entgegen der Annahme, dass ein zusätzliches *mPet-1* Transkript nicht ausreicht um serotonerge Neuronen zu induzieren, wurden jedoch in den homozygoten *En-1<sup>mPet-1/mPet-1</sup>* Mutanten, in denen die Gendosis durch ein zweites, zusätzliches *mPet-1* Transkript verdoppelt ist, auch keine ektopischen serotonergen Neuronen, respektive TpH und 5-HT, induziert.

In der homozygoten *mPet-1* Mutanten wird *mPet-1* in der *En-1* Expressionsdomäne ektopisch in der Pons exprimiert. Im Vergleich zu den Kontrollembryonen ist die *Nkx2.2* und *Lmx1b* Expression in den homozygoten *mPet-1* Mutanten unverändert. Somit ist *mPet-1* zwar ektopisch in der Pons vorhanden, aber nicht *Nkx2.2* und *Lmx1b*. Diese Resultate bestätigen die Daten von CHENG ET AL., 2003 dass nur die Kombination dieser drei Faktoren den serotonergen Neurotransmitterphänotyp induzieren kann und dass *mPet-1* alleine nicht ausreicht um den kompletten Phänotyp zu induzieren.

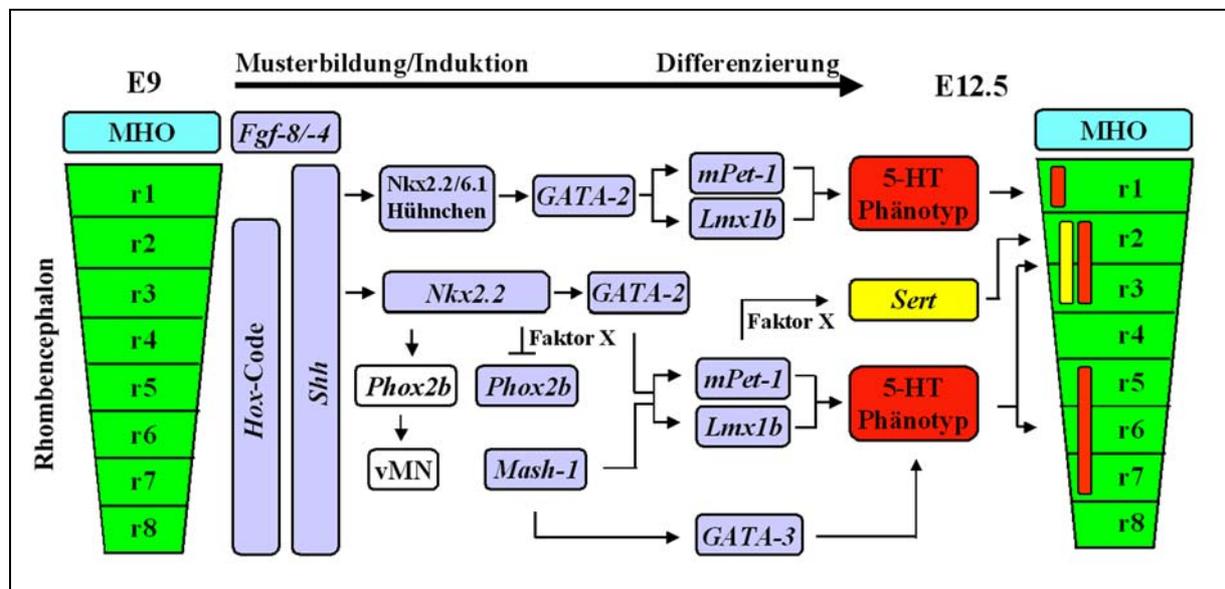
Interessanterweise wurde *Sert* bei E12.5, ektopisch in der Pons homozygoter Tiere detektiert. Diese ektopische *Sert* Expression ist mit der pontinen, ektopischen *mPet-1* Expression co-lokalisiert. Erstaunlich war die Beobachtung, dass nur *Sert* aber nicht TpH und 5-HT ektopisch induziert wurden.

Die Hypothese, dass *mPet-1* instrumentell an der Induktion von *Sert* beteiligt ist, kann wie folgt untermauert werden. Die in postmitotischen, serotonergen Zellen zur 5-HT Synthese notwendigen Faktoren *Lmx1b* und *mPet-1* (CHENG ET AL., 2003; DING ET AL., 2003; HENDRICKS ET AL., 2003) werden parallel aktiviert (CHENG ET AL., 2003; PATTYN ET AL., 2004), und konstituieren nicht wie von DING ET AL., 2003 vorgeschlagen eine genetische Kaskade in der *mPet-1* ein Zielgen von *Lmx1b* darstellt. Somit kann wie gezeigt, *Sert* durchaus von *mPet-1* induziert werden ohne dass *Lmx1b* in den gleichen Zellen vorhanden ist. Das ist ein Hinweis darauf, dass die parallelen Signaltransduktionswege über *Lmx1b*, *Gata-3* und *mPet-1*, die zur Ausbildung des kompletten serotonergen Phänotyps führen, jeweils für Teilaspekte dieses finalen serotonergen Phänotyps zuständig sind. Beispielsweise ist *Gata-3* für die regelrechte Ausbildung der Cytoarchitektur serotonerger Neurone in den caudalen Raphe Kernen notwendig (VAN DOORNINCK ET AL., 1999).

Weiterhin kann man spekulieren, dass *mPet-1* in Abhängigkeit des zellulären Kontextes und in Kooperation mit dort exprimierten, aber bislang noch unbekanntem Transkriptionsfaktoren ausreichend ist um *Sert* spezifisch zu induzieren. Diese Hypothese wird unterstützt durch Erkenntnisse die bei der GABAergen Neurogenese gewonnen wurden. *Mash-1* ist sowohl im Telencephalon als auch im Mesencephalon exprimiert. Obwohl GABAerge Neuronen im Mesencephalon von *Mash-1* Null-Mutanten fehlen, werden sie aber im Telencephalon generiert. Das deutet darauf hin, dass die GABAerge Neurogenese im Telencephalon von anderen Transkriptionsfaktoren abhängt. Die Homeoboxfaktoren *Nkx2.1* und *Dlx1/2* werden ausschließlich im ventralen Telencephalon exprimiert und sind dort an der GABAergen Neurogenese maßgeblich beteiligt. Im Mesencephalon können durch die ektopische Expression von *Heslike* in Kooperation mit *Mash-1* GABAerge Neuronen induziert werden. (ANDERSON ET AL., 1997A,B; CASAROSA ET AL., 1999; SUSSEL ET AL., 1999; MARIN ET AL., 2000; JESSELL 2000; CASPARI UND ANDERSON 2003; MIYOSHI ET AL., 2004).

Die durch *mPet-1* induzierte ektopische Expression von *Sert* bei E12.5 stellt ein vorläufiges Resultat dar, denn in einem zweiten Tier konnte dieses Ergebnis nicht reproduziert werden. Dieser drastische Unterschied in der Ausprägung des Phänotyps ist womöglich auf den gemischten (129/SvJ X C57BL/6), genetischen Hintergrund der analysierten Tiere zurückzuführen. Abhängig vom genetischen Hintergrund können bestimmte Gene, sogenannte *Modifier*, den Phänotyp eines

transgenen Tieres unterschiedlich stark beeinflussen. Die Responsivität auf *Modifier* ist bei Tieren mit der *En-1<sup>null/null</sup>* Mutation besonders stark ausgeprägt. Im reinen 129SvJ Hintergrund äußert sich der Phänotyp in einem Verlust der Colliculi und des Cerebellums. Hingegen im C57BL/6 Hintergrund ist die Deletion des Cerebellums nicht mehr existent. Diese Hintergrundeffekte sind auch für *Pax-2* defiziente Mäuse beschrieben. So zeigen 100% der *Pax-2* defizienten Mäuse im 129SvJ Hintergrund eine Exencephalie. Im C57BL/6 Hintergrund ist die Penetranz dieses Phänotyps auf 30% reduziert. (BILIOVOCKY ET AL., 2003; SCHWARZ ET AL., 1997). Somit sind weitere Analysen transgener Tiere in einem definierten genetischen Hintergrund notwendig, um das noch vorläufige Modell, in dem *mPet-1* eine instrumentelle Rolle bei der Induktion des Serotonintransporters spielt, zu bestätigen.



**ABB.: 39**    **MODELL ZUR FUNKTION VON *MPET-1* BEI DER INDUKTION VON *SERT* UND DER SPEZIFIZIERUNG SEROTONERGER NEURONEN**

*mPet-1* und *Lmx1b* als *Downstreameffektoren* verschiedener induktiver Signale (z.B. *Nkx2.2*) sind notwendig, um einen 5-HT Neurotransmitterphänotyp zu induzieren. In Kooperation mit mindestens einem noch unbekanntem Faktor X ist *mPet-1* ausreichend, um *Sert* unabhängig von *Lmx1b* zu induzieren. Das Rhombencephalon ist grün dargestellt. Die Gene der Spezifizierungskaskade sind mit hellblauen Boxen unterlegt. Die serotonergen Neurone sind rot gekennzeichnet. Der Serotonintransporter und die Region, in der *Sert* in der *En-1<sup>mPet-1/mPet-1</sup>* Mutanten ektopisch induziert wurde sind gelb markiert. vMn, viscerale Motoneurone; MHO, Mittel-/Hinterhirnorganisations

Zusammenfassend können die Daten unseres *Knock-In* Experimentes so interpretiert werden, dass *mPet-1* alleine nicht ausreicht, um den 5-HT Neurotransmitterphänotyp zu induzieren. Obwohl während des letzten Jahres enorme Fortschritte gemacht wurden um die Spezifizierung serotonerger Neurone auf genetischer Ebene zu verstehen, sind noch nicht alle beteiligten Faktoren bekannt und die dem genetischen Netzwerk zugrunde liegenden Interaktionen beteiligter Faktoren nicht völlig aufgeklärt und verstanden. Das Resultat, dass *mPet-1* abhängig von seiner Gendosis aber unabhängig von *Lmx1b* und in Kombination mit mindestens einem, noch unbekanntem Faktor *Sert* induzieren kann ist ein weiteres Indiz für das Verständnis dieses komplexen genetischen Netzwerks.

## 5 MATERIAL UND METHODEN

---

### 5.1 GERÄTELISTE

<b>Agarosegel - Elektrophoreseapparaturen:</b>	MWG-Biotech; PeqLab, Perfect Blue
<b>Autoklav:</b>	ASS und Aigner, Typ 667-1ST
<b>Rotor Stator Dispergiergerät:</b>	IKA Labortechnik, Ultraturrax
<b>Eismaschine:</b>	Scotsman, AF200
<b>Elektrophorese-Netzgeräte:</b>	E-C Apparatus Inc., EC 250-90, EC3000-90 Consort, E443
<b>SDS-PAGE-Kammer:</b>	BioRad, MiniProtean <sup>®</sup> 3
<b>Elektroblot-Gerät:</b>	BioRad, Criterion Blotter
<b>Elektroporationsgeräte:</b>	Biorad, Gene Pulser <sup>®</sup> II, Pulse Controller Plus
<b>Entwicklermaschiene für Röntgenfilme:</b>	AGFA, Curix 60
<b>Feinwaagen:</b>	Sartorius LC220S, LC6201S, BA210S
<b>Flüssigstickstofftank:</b>	MVE Cryogenics, XLC230
<b>Gefrierschrank (- 80°C):</b>	Heraeus
<b>Gefrierschrank (- 20°C):</b>	Liebherr
<b>Geigerzählrohr:</b>	Berthold, LB122
<b>Geldokumentationsanlage:</b>	Herolab
<b>Heizblöcke:</b>	Eppendorf, Thermomixer 5463/Comfort
<b>Heizer / Magnetprüher:</b>	IKA Labortechnik, RCT basic
<b>Heizplatte:</b>	Minitüb, HT200
<b>Hybridisierungsöfen:</b>	ThermoHybaid; UVP, Hybridizer HB100
<b>Hybridisierungsflaschen:</b>	Thermo Hybaid
<b>Inkubatoren (Bakterien):</b>	New Brunswick, Innova 4230

<b>Inkubatoren (ES-Zellen):</b>	Heraeus
<b>Isotopenzähler:</b>	Scott - lab, Easicount 400
<b>Kaltlichtquellen:</b>	Leica, KL 1500; Zeiss, KL 2500 LCD
<b>Kameras:</b>	Zeiss, AxioCam MRC, HRC; Fuji, HC2000
<b>Kryostat:</b>	Microm, HM 560
<b>Kühlschränke:</b>	Liebherr
<b>Laborglaswaren:</b>	Schott
<b>Mikromanipulatoren:</b>	Leitz, Labovert FS; Leica, DMIRB
<b>Mikroschmiede für Glaskapillaren:</b>	Bachofer
<b>Mikroskope:</b>	Leica DMIL, MZ8, MZ6, APO, M3Z Zeiss Axiovert 200M, Axioplan 2, Stemi SV 6 LSM 5 meta
<b>Mikrotome:</b>	Microm, HM 355S; Leica, RM2155
<b>Mikrowelle:</b>	Bosch
<b>Paraffin-Einbettvorrichtung:</b>	Sakura, Tissue-TEK <sup>®</sup> TEC
<b>PCR-Geräte:</b>	Eppendorf, Mastercycler Gradient
<b>Photometer:</b>	Eppendorf, Biophotometer
<b>pH-Messgerät:</b>	WTW, pH 538
<b>Pipettierhilfe:</b>	Brand, Accujet <sup>®</sup>
<b>Pipetten (2µl - 1 ml):</b>	Gilson
<b>Pumpe:</b>	Abimed, Minifus3;
<b>Reinstwasser-Aufbereitungsanlage:</b>	Millipore, MilliQ
<b>Schüttler:</b>	Heidolph, Unimax 2010, Polymax 1040; Brand, Nutator
<b>Sterilbänke:</b>	Nunc, Laminar Flow Workstation, Microflow Safety Cabinet
<b>UV-DNA / RNA-Crosslinker :</b>	Stratagene, UV Stratalinker <sup>®</sup> 1800
<b>Vortex:</b>	Scientific Industries, Vortex Genie 1

<b>Wärmeschränke:</b>	Memmert
<b>Wasserbäder:</b>	Julabo U3 ; Lauda A100/E100; Leica HI 1210
<b>Zentrifugen:</b>	Sorvall, RC5C Plus (Rotoren: GSA, SA600) Heraeus, Biofuge pico/fresco, Varifuge 3.0R Hettich, Universal 30F, Eba 12

## 5.2 BEZUGSQUELLEN VON ENZYMEN, CHEMIKALIEN, ANTIKÖRPERN UND ANDEREN VERBRAUCHSMATERIALIEN

<b>American National Can, USA</b>	Parafilm®
<b>Amersham, Freiburg</b>	Nylontransfermembranen Hybond N+, Hybond N Rundmembranen, MicroSpin™ S-300HR Säulen, Megaprime™ DNA labelling systems, Redivue™ [ $\alpha$ - $^{32}$ P]dCTP [ $\gamma$ - $^{32}$ P]ATP, 5'-End labelling Kit , T4 Poly- nucleotid Kinase, Rapid-hyb-buffer, Röntgen- kassetten mit Intensifier, ECL-Western- Blotting Detection Reagents
<b>BDH Lab. Supplies, Poole, GB</b>	DPX Einschlussmittel
<b>Becton Dickinson, Sparks, USA</b>	LB-Medium, Bacto™ Agar
<b>Becton Dickinson, Europe (Schubert &amp; Weiss, München) Biozym</b>	Falcon®-Gefäße, Kanülen, Spritzen Agarose, PCR-Reaktionsgefäße
<b>BioRad, München</b>	Triton®-X100, Ionentauscher Resin AG 501-X8
<b>Chemicon, Hofheim</b>	Leukemia Inhibitory Factor (LIF)
<b>Clontech, Heidelberg</b>	<i>pEGFP-N1</i> Vector
<b>Eppendorf, Hamburg</b>	Safe-Lock-Reaktionsgefäße (1,5/2,0 ml) Phase-Lock-Gel®
<b>Fresenius AG, Bad Homburg</b>	Ampuwa®-Wasser

<b>GIBCO BRL, Eggenstein</b>	ART <sup>®</sup> Sterilfilterspitzen, 1kb <sup>+</sup> -Ladder, Formamid, Restriktionsenzyme incl. 10x Puffer, PBS, Fötales Kälberserum, Goat Serum, Zellkulturmedien und Zusätze Superscrit <sup>™</sup> First-Strand Synthesis System for RT-PCR
<b>Greiner Labortechnik, Frickenhausen</b>	Bakterienkulturschalen, Einmalpipetten
<b>ICN / Cappel, Aurora, USA</b>	Rabbit $\alpha$ 5-HT IgG
<b>Invitrogen, Karlsruhe</b>	TOPO TA Cloning <sup>®</sup> Kit, pCR II <sup>®</sup> TOPO <sup>®</sup> Vector <i>pCDNA3</i> <sup>®</sup> -Vector, E. coli TOP 10F <sup>®</sup> Kompetente Zellen, Magic Mark Protein Ladder
<b>Jackson Immuno Res., USA (Vertrieb Dianova, Hamburg)</b>	Peroxidase conj. and biotinylated Rabbit $\alpha$ -Goat IgG
<b>Kodak, New Haven, USA (Vertrieb Sigma, Deisenhofen)</b>	Autoradiographie-Emulsion (Typ NTB-2) Entwickler (D-19), Fixierer, Entwickler Filme (Biomax, X-OMAT)
<b>Linaris</b>	HistoGreen <sup>™</sup>
<b>MBI Fermentas, St. Leon-Roth</b>	Restriktionsenzyme incl. 10x Puffer T4 DNA-Ligase, <i>Taq</i> -Polymerase, Prestained Protein Ladder
<b>Menzel Gläser, Braunschweig</b>	Superfrost <sup>®</sup> Plus Objektträger
<b>Merck, Darmstadt</b>	Natriumacetat, Magnesiumchlorid, Natriumhydroxid, Maltose, Calciumchlorid, Natriumchlorid, Isopropanol, Ethanol, Methanol, Formamid, Salzsäure, Eisessig Borsäure, Chloroform
<b>MILLIPORE, Neu Isenburg</b>	Ultrafree <sup>®</sup> -MC Filters (NMWL 30,000)
<b>Molecular Probes, Eugene, USA</b>	Alexa Fluor <sup>™</sup> 546 phalloidin
<b>NEB, Frankfurt Main</b>	Restriktionsenzyme incl. 10x Puffer
<b>Nunc, Wiesbaden</b>	Verbrauchsmaterial aller Art für die Zellkultur
<b>OriGene Tech., Rockville, USA</b>	Mouse 12 major tissue PolyA <sup>+</sup> RNA Northern Blot
<b>Pall, Ann Arbor, USA</b>	BioTrace <sup>™</sup> PVDF-Membran

<b>Pel-Freeze, Rogers, USA</b>	PK-Antikörper Rabbit $\alpha$ -TH IgG
<b>Promega, Mannheim</b>	Wizard <sup>®</sup> Genomic DNA Purification Kit <i>pGEM<sup>®</sup>-T</i> , <i>pGEM<sup>®</sup>-T Easy Vector Systems</i> for PCR-cloning, RNasin
<b>QIAGEN, Hilden</b>	QIAquick <sup>®</sup> PCR-Purification Kit, QIAprep <sup>®</sup> Spin Miniprep Kit, QIAquick <sup>®</sup> Gel Extraction Kit, Qiagen <sup>®</sup> Plasmid Maxi Kit, RNeasy <sup>™</sup> Kit
<b>Roche, Mannheim</b>	DNA-Molekulargewichtstandards, dNTPs, NTPs, DTT, ProteinaseK, Restriktionsenzyme incl. 10x Puffer, RNaseA, T4 DNA-Ligase, Klenow, T3-, T7-, SP6-RNA Polymerase, <i>Taq</i> -Polymerase, RNase-Inhibitor t-RNA, Fugene6
<b>Roth, Karlsruhe</b>	Roti <sup>®</sup> Phenol/Chloroform, Trockenperlen, Rotiszint <sup>®</sup> -Szintillationslösung
<b>Santa Cruz, Heidelberg</b>	PK-Antikörper Goat $\alpha$ -FEV IgG (C-18 K030)
<b>Schleicher &amp; Schüll, Kassel</b>	Faltenfilter, Polytrap-Papier
<b>Sigma, Deisenhofen</b>	PEG, Succrose, Glucose, Maltose, Kaliumferrocyanid, Kaliumferricyanid, Glycerol, Mineralöl, Natriumphosphat, Natriumhydrogenphosphat, MOPS, EDTA, EGTA, Desoxycholat, Nonidet-P40, Trizma <sup>®</sup> Base, Magnesiumsulfat, Glycin, DMSO, DMF, Bromphenolblau, Kresylviolett, DTT, SDS, 2-Mercaptoethanol, Zitronensäure, Natriumcitrat, Paraformaldehyd, Glutaraldehyd, Ampicillin, Kanamycin, Heparin, Methyl Salicylat, Poly-L-Lysin, Tween20, X-Gal, IPTG, Wasserstoff-peroxid, Diaminobenzidin, Ethidiumbromid, Levamisol, BSA, Ficoll 400, PVP 40, MK Antikörper $\alpha$ -TpH (WH-03),
<b>Stratagene, Heidelberg</b>	<i>p-Bluescript<sup>®</sup> II KS+</i> Vector
<b>USB, Cleveland, USA</b>	Shrimp Alkaline Phosphatase
<b>Vector Laboratories, Burlingame, USA</b>	Biotinylated Goat $\alpha$ -Rabbit IgG Vecta <sup>®</sup> Stain ABC-Kit, Vector <sup>®</sup> M.O.M <sup>™</sup> Immunodetection-Kit
<b>Whatman, Maidstone, GB</b>	3MM-Filterpapier

## 5.3 ZUSAMMENSETZUNG DER REAGENZIEN, PUFFER UND STAMMLÖSUNGEN

### 5.3.1 MOLEKULARBIOLOGIE

DEPC-Wasser:	0,1% Diethyl Pyrocarbonat
Ethidiumbromid-Lösung:	10 mg EtBr / 1ml Wasser
EDTA 0,5 M: (pH 8,0 mit NaOH eingestellt)	186,1 g Na <sub>2</sub> EDTA·2H <sub>2</sub> O ad 1000 ml H <sub>2</sub> O
10 x FA-Gel-Puffer: (pH 7,0 mit NaOH eingestellt)	200 mM 3-[N-Morpholino] propan- sulfonsäure (MOPS) 50 mM Natriumacetat 10 mM EDTA
1 x FA -Gel-Laufpuffer:	100 ml 10 x FA-Gel-Puffer 20 ml Formaldehyd 37% 880 ml DEPC-Wasser
Denaturierungslösung:	0,5 M NaOH 1,5 M NaCl
Depurinierungslösung:	0,2 M HCl
Hybridisierungslösung (für Phagen-Bibliothek)	15% Formamid 7% SDS 1% BSA 0,5 M Natriumphosphat (pH 7,2) 0,1 M EDTA
5 x DNA-Ladepuffer	50% Glycerol 50% Wasser 0,01% Bromphenolblau
4 x Laemmli-Auftragpuffer	2,5 ml 1M Tris-HCl pH 6,8 0,8 g SDS 0,4 ml 2-ME 0,001% Bromphenolblau 7,1 ml H <sub>2</sub> O
LB-Medium (pH 7,2 mit HCl eingestellt)	1% Bakto -Trypton 0,5% Hefeextrakt 0,5% NaCl
Lysispuffer 1: (Gewebe)	50 mM Tris-HCl (pH 8,0) 50 mM EDTA 10 mM NaCl, 0,5% SDS

Lysispuffer 2: (Gewebe, Embryos)	10 mM Tris-HCL (pH 8,3) 50 mM KCl 0,45% NP40 0,45% Tween 20 0,1 mg/ml Gelatine
Lysispuffer: (ES-Zellen)	10 mM Tris-HCl (pH 8,0) 10 mM EDTA 10 mM NaCl 0,5% N-Laurylsarcosyl
Neutralisierungslösung:	0,5 M Tris-HCl (pH 7,2) 1.5 M NaCl
Protein-Extraktionspuffer:	250 mM Succrose 100 mM NaCl 2,5 mM MgCl <sub>2</sub> 10 mM EGTA 20 mM HEPES 1% Triton-X 100 ad 100 ml H <sub>2</sub> O
1 x Protein-Transferpuffer:	100 ml 10 x SDS Laufpuffer 200 ml Methanol 10 ml SDS 10% 690 ml H <sub>2</sub> O
10 x SDS-Laufpuffer:	125 mM Tris-Base 96 mM Glycine 0,5% SDS ad 1000 ml H <sub>2</sub> O
20 x SSC:	3 M NaCl 0,3 M Natriumcitrat
5 x RNA Ladepuffer:	16 µl gesättigte Bromphenolblau Lösung 80 µl 0,5 M EDTA (pH 8,0) 720 µl Formaldehyd 37% 2 ml Glycerol 3084 µl Formamid 4 ml 10 x FA-Gel-Puffer ad 10 ml H <sub>2</sub> O
10 x TBE:	1 mM Tris-Base 0,83 mM Borsäure 20 mM EDTA
TSS-Lösung:	50 mM MgSO <sub>4</sub> 10% PEG 3000 5% Dimethylsulfoxid (DMSO) ad 100 ml LB-Medium

Tris-HCl 1M (pH 7,5; 8,0; 9,5 mit HCl eingestellt)	121 g Tris-Base ad 1000 ml H <sub>2</sub> O
Wasch-Puffer 1:	0,1% SDS in 2 x SSC
Wasch-Puffer 2:	0,1% SDS in 1 x SSC
Wasch-Puffer 3:	0,1% SDS in 0,5 x SSC
X-Gal Lösung:	20 mg/ml in deionisiertem N,N,-DMF
IPTG-Lösung:	20 mg/ml in H <sub>2</sub> O

## 5.3.2 HISTOLOGIE / MORPHOLOGIE

### 5.3.2.1 HISTOCHEMISCHE FÄRBUNGEN

PBS (pH 7,4)	120 mM NaCl 2,7 mM KCl 3 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 7 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
De-/ Rehydrierungslösungen:	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> OH absolut, 96%, 70% in H <sub>2</sub> O CH <sub>3</sub> OH absolut, 25%, 50%, 75% in PBS

#### 5.3.2.1.1 FÄRBUNG NACH NISSL

Kresylviolett-Lösung	2,5 g Kresylviolett 0,102 g Natriumacetat 1,55 ml Eisessig ad 500 ml H <sub>2</sub> O
----------------------	--

#### 5.3.2.1.2 X-GAL FÄRBUNG

Fixierlösung:	4% PFA in PBS (pH 7,4) 5 mM EGTA 2 mM MgCl <sub>2</sub>
Wasch-Puffer:	2 mM MgCl <sub>2</sub> 0,01% Deoxycholat 0,02% Nonidet-P40 in PBS
X-Gal Färbelösung:	0,1% X-Gal 5 mM Kaliumferrocyanid 5 mM Kaliumferricyanid in Wasch-Puffer

**5.3.2.1.3 F-ACTIN - FÄRBUNG**

Phalloidin-Stocklösung:	Alexa Fluor 594 phalloidin / CH <sub>3</sub> OH 1:200
Phalloidin Färbelösung:	Phalloidin Stocklösung / PBS 1:40 1% BSA (Bovines Serum Albumin)
Block - Puffer:	1% BSA in PBS
Extraktionslösung:	Aceton (- 20°C)
Fixierlösung:	4% PFA in PBS
Wasch-Puffer:	PBS (pH 7,4)

**5.3.2.2 IMMUNHISTOCHEMISCHE FÄRBUNGEN**

Block-Puffer: (für Schnitte)	10% FCS (Fötales Kälberserum) 0,01% Triton-X100 in PBS (pH 7,4)
Antikörper-Lösung:	10% FCS in PBS (pH 7,4)
ABC-Reagenz: (Avidin-Biotin-Complex)	Reagenz A 1 : 300 Reagenz B 1 : 300 10% FCS in PBS (pH 7,4)
Natrium-Citrat Puffer (pH 6):	10 mM Natriumcitrat in H <sub>2</sub> O
Tris-HCl: (pH 7,4 mit HCl eingestellt)	5 mM Tris-Base in H <sub>2</sub> O
Block-Puffer (PBSMT): (für Ganzkörperpräparate)	2% Milchpulver 0,1% Triton-X100 in PBS (pH 7,4)
BI-Puffer: (Bleichen, Inaktivieren endo- gener Peroxidasen für Ganz- körperpräparate)	CH <sub>3</sub> OH, DMSO, H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 35% ( 4 : 1 : 1)
DAB-Stocklösung:	1% 3,3' Diaminobenzidin in H <sub>2</sub> O
DAB-Färbelösung:	1 ml DAB 1% 19 ml Tris-HCl (pH 7,4) 15 µl H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
Histogreen:	2 gtt Substrat; 2gtt H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , 1ml Puffer

**5.3.2.3 IN-SITU HYBRIDISIERUNG AUF PARAFFINSCHNITTEN**

Ammonimacetat 4M:	77,08 g ad 250 ml H <sub>2</sub> O
20 x DEPC SSC:	siehe 2.3.1 + 0,1% DEPC
Triethanolamin (TAE 0,1 M):	10,1 g in DEPC-H <sub>2</sub> O
Deionisiertes Formamid:	10 g Ionentauscher Resin (BioRad AG501-X8) 100 ml Formamid
1 x NTE:	500 mM NaCl 10 mM Tris-HCl (pH 8,0) 5 mM EDTA (pH 8,0)
Hybridisierungspuffer:	50% Formamid 20 mM Tris-HCl (pH 8,0) 300 mM NaCl 5 mM EDTA (pH 8,0) 10% Dextransulfat 0,02% Ficoll 400 0,02% PVP 40 0,02% BSA 0,5 mg/ml tRNA 0,2 mg/ml Blockade-DNA 200 mM DTT
Hybridisierungskammer-Puffer:	100 ml Formamid 105 ml DEPC-H <sub>2</sub> O 20 ml 20 x DEPC-SSC
1 x ProteinaseK Puffer: (pH 7,8 mit HCl eingestellt)	50 mM Tris-HCl (pH 7,6) 5 mM EDTA (pH 8,0)

**5.3.3 ZELLKULTUR****5.3.3.1 ES-ZELLKULTUR**

ES-Zellkulturmedium:	15% FCS (GibcoBRL) 0,1 mM 2-Mercaptoethanol (2-ME) 2 mM L-Glutamin 1.500 U/ml m-LIF in 500 ml DMEM high glucose
Wasch-Medium:	ES-Zellkulturmedium ohne m-LIF

Feeder-Medium:	10% FCS (GibcoBRL) 2 mM L-Glutamin 2 mM MEM nicht essentielle Aminosäuren in 500 ml DMEM
2 x Einfriermedium:	50% FCS (GibcoBRL) 30% ES-Zellkulturmedium 20% DMSO

### 5.3.3.2 NON-ES-ZELLKULTUR

Kulturmedium für NIH/3T3-Zellen und 293 HEK-Zellen	15% FCS (GibcoBRL) 2 mM L-Glutamin in 500 ml DMEM high glucose
2 x BBS (pH 9,96 mit NaOH eingestellt)	50 mM BES N,N-bis(2-hydroxyethyl)-2- aminoethansulfonsäure 280 mM NaCl 1,5 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
CaCl <sub>2</sub> 2,5 M:	7,35g in 20 ml H <sub>2</sub> O

## 5.4 OLIGONUCLEOTIDPRIMER

Die in dieser Arbeit verwendeten Oligonucleotide wurden in der Arbeitsgruppe Biologische Datenverarbeitung (AG BIODV) der GSF von Herrn Utz Linzner mit einem Applied Biosystems 394 DNA/RNA Synthesizer hergestellt. Die Oligonucleotide wurden lyophilisiert geliefert und zur Konzentrationsbestimmung sowie zur weiteren Verdünnung über Nacht bei 4°C in 200 µl Wasser gelöst. Zur Konzentrationsbestimmung wurde die Absorption bei 260 nm gemessen. Eine Absorptionseinheit bei 260 nm (OD<sub>260</sub>) entspricht für einzelsträngige Oligonucleotide ca. 20 µg/ml (Sambrook et al., 1989). Als interner Standard der Konzentrationsbestimmung wurde die Absorption bei 280 nm gemessen. Lag das Verhältnis OD<sub>260</sub> / OD<sub>280</sub> über 1,8 wurde der Wert der OD<sub>260</sub>-Messung zur Konzentrationsberechnung (OD<sub>260</sub> · 20 · Verdünnungsfaktor) herangezogen. Alternativ zu den Oligonucleotiden, die in der GSF hergestellt wurden, wurden HPLC gereinigte Primer der Firma ThermoHybaid benutzt. Stocklösungen sowie Aliquots mit der Arbeitskonzentration von 10 pmol/µl wurden bis zur Verwendung bei der PCR bei - 20°C gelagert. Die Schmelztemperaturen wurden mit dem Oligo-Editor Programm (AG BIODV) berechnet.

## **5.5 VERWENDETE TIERE / HALTUNG**

Zur Gewinnung von Embryonen für die morphologischen Analysen wurden, sofern die Studien nicht an entsprechenden Mutanten durchgeführt wurden, Mäuse des Stammes C3H nach natürlicher Verpaarung verwendet. Alle Mäuse stammen aus den Beständen der GSF-Tierhaltung, wo sie in einem geschlossenen System, unter spezifisch pathogenfreien Bedingungen, gemäß den Bestimmungen der Tierschutzverordnung gehalten und gezüchtet werden. Futter und Wasser standen den Mäusen ad libitum zur Verfügung. Die Temperatur beträgt  $22 \pm 2$  °C und die relative Luftfeuchtigkeit  $55 \pm 5\%$ . Eine automatische Zeitschaltuhr regelt die Tag- und Nachtphasen, die jeweils 12 Stunden betragen. Die Hellphase dauert von 6 bis 18 Uhr. Mäuse aus der Mutantenzucht werden drei Wochen nach der Geburt von den Eltern abgesetzt und nach Geschlecht getrennt. Die Markierung der Mäuse erfolgt durch Ohrlochung.

## **5.6 BESTIMMUNG DER ENTWICKLUNGSSTADIEN VERWENDETER MÄUSE**

Sowohl der Kopulationszeitpunkt als auch das Entwicklungstempo einzelner Embryonen innerhalb eines Wurfes können variieren (KAUFMANN, 1992). Um bei Genexpressionsstudien die dynamisch verlaufende Genexpression mit bestimmten Entwicklungsstadien korrelieren zu können, wird das Alter der Embryonen sowohl in embryonalen Tagen (E) als auch exakter in Theiler-Stadien (TS) angegeben. Nach der Geburt wird das Alter der Mäuse in postnatalen Tagen (P) ausgedrückt. (THEILER, 1989; RUGH, 1990; KAUFMAN, 1992). In dieser Arbeit wurde darauf geachtet, daß zur vergleichenden Analyse von Genexpressionsprofilen möglichst gleichdatierte Föten, sowie gleichaltrige juvenile und adulte Tiere, verwendet wurden.

## **5.7 MOLEKULARBIOLOGIE**

### **5.7.1 ISOLIERUNG GENOMISCHER DNA**

#### **5.7.1.1 ISOLIERUNG VON GENOMISCHER DNA AUS GEWEBE**

Genomische DNA wurde vorwiegend zur Genotypisierung der Mäuse isoliert. Bei adulten Tieren erfolgte die DNA-Isolation aus einem 0,5 - 1cm langem Schwanzstück. Zur Genotypisierung von Embryonen wurde die DNA bei frühen Stadien (E 8,5 bis E 12,5) aus dem Amnion isoliert, bei älteren Embryonen hingegen ebenfalls aus einem Stück des Schwanzes. Das Gewebe wurde in 100 - 600 µl Lysis-Puffer unter Zusatz von 1 mg/ml ProteinaseK, 4 h, maximal über Nacht (ü.N.), bei 55°C schüttelnd inkubiert. Noch vorhandene Proteinreste wurden mit einem äquivalenten Volumen an Roti<sup>®</sup> Phenol/Chloroform durch vorsichtiges Schwenken bei 4°C für 1h extrahiert. Die Trennung der wässrigen Phase von der organischen Phase erfolgte durch zentrifugieren bei 13.000 rpm für 5 min und durch Zusatz des künstlichen Harzes Phase Lock Gel<sup>™</sup> (5Prime-3Prime Inc., Kat.-Nr.: pl-429220). Der wässrige Überstand wurde nochmals mit Roti<sup>®</sup> Phenol/Chloroform für 15 min bei 4°C ausgeschüttelt, die Phasen erneut getrennt und aus der wässrigen Phase die DNA mit dem doppelten Volumen Ethanol absolut, 5 min bei 13.000 rpm präzipitiert. Das DNA-Pellet wurde mit Ethanol 70% gewaschen und bei Raumtemperatur getrocknet. Die Rehydrierung der DNA erfolgte 1h bei 50°C in einem geeigneten Volumen 10 mM Tris-HCl (ph 8,5). Zur weiteren Verwendung wurde die gelöste DNA bei 4°C, oder zur Aufbewahrung, bei -20°C gelagert. Alternativ wurde der Wizard<sup>®</sup> Genomic DNA Purification Kit (Kat.-Nr.: A1125) der Firma Promega verwendet. Die zellulären Proteine werden hierbei nicht mit organischen Lösungsmitteln entfernt, sondern durch Salzpräzipitation wobei die hochmolekulare, genomische DNA in Lösung bleibt. Die DNA wurde anschließend mit 2-Propanol gefällt, entsalzt und wie oben beschrieben weiterbehandelt.

#### **5.7.1.2 ISOLIERUNG GENOMISCHER DNA AUS ES-ZELLEN**

Die Isolierung der DNA erfolgte direkt in den Zellkulturschalen. Das Medium wurde abgesaugt, die Zellen zwei mal mit PBS gewaschen und mit Lysispuffer der 1mg/ml ProteinaseK enthielt, bedeckt. Die Kulturschalen wurden an den Kanten mit Parafilm<sup>®</sup> verschlossen und in einer feuchten Kammer, um den Verdunstungsverlust so gering

wie möglich zu halten, bei 55°C ü.N. inkubiert. Nach Abschluss der Lyse wurde die DNA mit 100µl eiskaltem Ethanol, dem 75 mM NaCl zugesetzt waren, gefällt. Nach dem Zentrifugieren wurde der Überstand dekantiert und die DNA war am Boden der Platten als weiße Filamente sichtbar. Salz wurde durch zweimaliges Waschen mit 70% Ethanol entfernt und die getrocknete DNA in H<sub>2</sub>O gelöst. Diese Methode ermöglichte vor allem eine große Anzahl von ES-Zellklonen nach einem homologen Rekombinationsereignis abzusuchen, bei ausreichender Qualität der DNA.

### **5.7.2 ISOLIERUNG VON GESAMT-RNA AUS GEWEBE UND ZELLEN**

Die Isolation der Gesamt-RNA aus Gewebe und Zellen erfolgte mit dem RNeasy™ System von Qiagen (Kat.-Nr.: 75144). Um eine Degradierung der RNA möglichst zu vermeiden wurde das Gewebe oder die Zellen sofort nach der Präparation schockgefroren, bei -80°C gelagert oder die RNA direkt isoliert. Die Homogenisierung der Präparate erfolgte im Guanidinium-Isothiocyanat-Puffer durch chemische Lyse und durch mechanische Scherung mit einem Rotor-Stator Dispergiergerät (CHOMCZYNSKY UND SACCHI, 1987). Das klare Lysat wurde mit einer äquivalenten Menge Ethanol 70% gemischt und auf die in dem Kit enthaltene Säule gegeben. RNA ab einer Größe von 200 Basen bindet selektiv an die Silicamembran der Säule. Die stark gescherte genomische DNA und andere Bestandteile des Lysats wurden durch Waschen und Zentrifugieren entfernt. Die in geringen Mengen auf der Membran zurückbleibende genomische DNA wurde mit DNase1 entfernt. Abschließend wurde die RNA mit RNase-freiem Wasser eluiert und die Konzentration photometrisch bestimmt. Bei RNA entspricht eine Absorptionseinheit bei 260nm (OD<sub>260</sub>) 40 µg/ml (SAMBROOK ET AL., 1989). Die RNA wurde bis zur weiteren Verwendung unter Zusatz von 1µl (40U) RNase-Inhibitor (Roche, Kat.-Nr.: 799 017) bei -80°C gelagert.

### **5.7.3 ISOLIERUNG VON PROTEINEN AUS GEWEBE UND ZELLEN**

Proteine wurden sowohl aus wildtypischen und mutierten Embryonen als auch aus transfizierten 3T3-Zellen (s. 5.10.3) extrahiert. Die Embryonen, respektive Gewebe der Mittel-/Hinterhirnregion wurden in PBS präpariert und nach der Genotypisierung (s. 5.7.16) in 150µl eiskaltem Proteinextraktionspuffer homogenisiert. Nach Zusatz von 50 µl 4 x Laemmli-Auftragpuffer wurde das native Proteinextrakt 10 min bei 95°C

denaturiert, anschließend auf Eis abgekühlt und 10 min bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Extrakt bei -80°C bis zur Verwendung bei der SDS-PAGE-Elektrophorese (s. 5.7.4.3) gelagert.

## **5.7.4 GEL-ELEKTROPHORESE**

### **5.7.4.1 DNA-GEL-ELEKTROPHORESE**

Zur elektrophoretischen Auftrennung von DNA-Fragmenten wurde die Agarose-Gel-Elektrophorese eingesetzt. Je nach Größe der zu erwartenden DNA-Fragmente wurden 0,5 – 2 %ige Gele angefertigt, wobei hochprozentige Gele, mit ihrer engmaschigen Matrix, eine optimale Trennung von kleinen Fragmenten ermöglicht. Zur Herstellung der Gele wurde die Agarose in 1x TBE eingewogen und in der Microwelle aufgekocht. Bevor die Lösung mit ca. 50°C in Plexiglasträger gegossen wurde, wurde Ethidiumbromid (EtBr, 20 – 100 ng/ml) zugesetzt. In die noch flüssige Agarose wurde ein Kamm eingetaucht um während der Polymerisation Taschen zu formen. Die zu trennenden Proben ( PCR-Produkte, Restriktionsfragmente etc.) wurde mit 5 x Ladepuffer versetzt und im elektrischen Feld getrennt, wobei die DNA als negativer Ladungsträger zur Anode wandert. Je höher die elektrische Feldstärke, desto höher die Trennungsgeschwindigkeit. Als Laufpuffer wurde, ebenso wie für die Gele, 1 x TBE verwendet. Die elektrophoretisch aufgetrennte DNA wurde durch UV-Illumination sichtbar gemacht. In die DNA interkaliertes EtBr wird durch UV-Licht, bei 305 nm angeregt und emittiert orangenes Licht der Wellenlänge 590 nm. Die Nachweisgrenze dieser Methode liegt bei ca. 5 – 10 ng DNA. Die Gele wurden mit einer Videokamera dokumentiert.

### **5.7.4.2 Denaturierende RNA-Gel-Elektrophorese**

RNA wurde unter denaturierenden Bedingungen elektrophoretisch aufgetrennt. Zur Herstellung des Gels wurde 1 – 1,2 % Agarose in 1 x FA-Gel-Puffer gekocht. Bei einer Temperatur von ca. 60°C wurde Formaldehyd bis zu einer Endkonzentration von 2 M hinzugegeben. Der Laufpuffer enthielt 0,5 M Formaldehyd. Durch ständige Umwälzung des Laufpuffers wurden die Formaldehydkonzentrationen equilibriert. Die Gesamt-RNA (10 – 20µg) sowie in-vitro Transkripte und der Längenstandard (Roche Kat.Nr.: 1 062 611) wurden in RNA-Ladepuffer aufgenommen, bis auf 85°C erhitzt,

rasch auf Eis abgekühlt und aufgetragen. Die Auftrennung der RNA erfolgte bei 2 – 2,5 V/cm.

#### **5.7.4.3 SDS-POLYACRYLAMID-GEL-ELEKTROPHORESE (SDS-PAGE)**

Zur Auftrennung denaturierter Proteine wurde die diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid Gel-Elektrophorese nach LAEMMLI (1970) angewendet (GALLAGHER, 1999). In diesem diskontinuierlichen Puffersystem wurden Puffer verschiedener Zusammensetzung und unterschiedlicher pH-Werte verwendet um im Gel einen pH und Spannungsgradienten zu erzeugen. Im Sammelgel erfolgte die Fokussierung der Proteine im elektrischen Feld zwischen den Leitonen ( $\text{Cl}^-$ ) und den Folgeionen ( $\text{Glycin}^-$ ), bevor sie im Trenngel aufgrund ihres Molekulargewichtes aufgetrennt wurden. Zur vertikalen Elektrophorese wurden 15%ige Tris-HCl-Fertiggele (BioRAD, Kat.-Nr.:161-1103) in der Mini-Protean<sup>®</sup>3 Apparatur (BioRad, Kat.Nr.: 165-3301) mit 1x SDS-Laufpuffer verwendet. Von diversen Proteinextrakten (s. 5.7.3) wurden jeweils 12µl aufgetragen. Die elektrophoretische Trennung der Proteine erfolgte bei 20 – 40 mA. Als Molekulargewichtsstandard wurde die Prestained Protein Ladder (MBI, Kat.-Nr.:SM0671) und die Magic Mark Ladder (Invitrogen, Kat.-Nr.: LC5600) verwendet.

#### **5.7.5 TRANSFERTECHNIKEN**

##### **5.7.5.1 SOUTHERN BLOTTING**

Die Methode des *Southern-Transfers* (SOUTHERN, 1975) basiert auf dem durch Kapillarkräfte vermittelten Transfer von elektrophoretisch aufgetrennter DNA und der Immobilisation der DNA auf einer Nylonmembran. Nach Abschluss der Gelelektrophorese wurde das Gel, respektive die doppelsträngige DNA, zur partiellen Fragmentierung für ca. 10 min depuriniert. Anschließend wurde zwei mal 20 min alkalisch denaturiert, danach 1h neutralisiert und 30 min in 2 x SSC gewaschen. Das so vorbehandelte Gel wurde auf Whatman<sup>™</sup>3MM-Filterpapier (Kat.-Nr.: 3030 917) gelegt, dessen Enden in 20 x SSC eintauchten. Das Gel wurde mit Parafilm<sup>®</sup> umlegt um einen Pufferfluss außerhalb des Gels zu vermeiden. Auf das Gel wurde in gleicher Größe eine mit 2 x SSC angefeuchtete, positiv geladene Nylonmembran (Hybond<sup>™</sup> N<sup>+</sup>, Amersham, Kat.-Nr.: RPN 303B) und zwei Lagen SSC-feuchtes Filterpapier gelegt. Dabei wurde darauf geachtet, daß sich zwischen den Lagen

keine Luftblasen befanden, welche den DNA-Transfer stören. Abschließend folgten mehrere Lagen saugfähiges, trockenes Papier. Der Aufbau wurde mit einem ca. 500 g schweren Gewicht beschwert. Während der Transferzeit von 12 – 24 h wurde die 20 x SSC-Lösung durch das Gel über Kapillarkräfte in das trockene Papier gesogen, wobei die DNA mittransportiert wird und an der Nylonmembran haften bleibt (Kapillartransfer). Nach dem Transfer wurde die Membran in 2 x SSC gewaschen und mit UV-Licht (120 mJ, 254 nm) bestrahlt um die DNA kovalent auf dem Filter zu vernetzen (*crosslinking*). In Plastikfolie eingeschweißt, wurden die Membranen bis zur Hybridisierung (s. 5.7.6) mit <sup>32</sup>P markierten Sonden (s. 5.7.14; 5.7.15) bei 4°C gelagert.

### 5.7.5.2 NORTHERN BLOTTING

Bis auf wenige Modifikationen wurde das *Northern-Blotting* zum Transfer und zur Immobilisierung von RNA auf Nylonmembranen analog zum *Southern-Blotting* durchgeführt. Die Auftrennung der RNA erfolgte unter denaturierenden Bedingungen wie in (s. 5.7.4.2) beschrieben. Um das Formaldehyd durch Diffusion aus dem Gel zu entfernen, wurde mehrmals in DEPC-Wasser (RNase freies Wasser) gewaschen. Direkt anschließend wurde der Transfer mit 10 x DEPC-SSC durchgeführt. Um die Gefahr einer Degradierung der RNA, durch ubiquitär vorkommende RNasen, zu minimieren, wurde unter RNase freien Bedingungen gearbeitet. Die Northern-Blotts wurden in der Regel sofort verwendet.

### 5.7.5.3 WESTERN-BLOTTING UND IMMUNODETEKTION

Im SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetrennte Proteine wurden durch *Western-Blotting* (TOWBIN ET AL., 1979; BURNETTE, 1981; SASSE UND GALLAGHER, 2000) in einem Criterion Blotter (BioRad, Kat.-Nr.:170-4070) bei 250 mA und 4°C innerhalb von 3h auf eine BioTrace™PVDF Membran (Pall, Kat.-N.: P/N66543) transferiert. Um unspezifische Bindungen zwischen Proteinen und primärem Antikörper zu vermeiden wurden die Membranen für 2h in PBT mit 5% Magermilchpulver bei Raumtemperatur geblockt. Nach 5 x 10 min Waschen mit PBT erfolgte die Inkubation, für 1h, bei Raumtemperatur, in primären Antikörpern (TAB.: 2) die in PBT verdünnt waren. Ungebundener Antikörper wurde durch Waschen (s.o.) entfernt. Ebenso wurde mit den sekundären Antikörpern verfahren. An die verwendeten sekundären Antikörper

ist eine Merrettich-Peroxidase gekoppelt die enzymatisch das Substrat ECL (Amersham, Kat.-Nr.: RPN2109D1) umsetzt. Die dabei in Form von Chemolumineszenz freiwerdende Energie schwärzt einen für wenige Sekunden aufgelegten Röntgenfilm. Somit sollten auf der Membran immobilisierte Proteine spezifisch detektiert werden.

**TAB.: 2 AK ZUR WESTERN-BLOT-ANALYSE**

Primäre Antikörper	Sekundäre Antikörper
Goat $\alpha$ -FEV IgG (polyklonal) 1 : 100 bis 1 :2000 Santa Cruz, Lot.:c-18 K030, Kat.-Nr.: sc6530	HR-Peroxidase conjugated Rabbit $\alpha$ -Goat IgG, 1 : 100 bis 1 :2000 Jackson Immuno Res., Lot.:57214, Kat.-Nr.:305035-003
BD Living Colors™ A.v. Monoclonal Antibody ( $\alpha$ -Egfp) 1 : 4000 BD Biosciences, Lot.: JL-8, Kat.-Nr.: 8371-1	HR-Peroxidase conjugated Goat $\alpha$ -mouse IgG, 1 :2000 Chemicon, Lot.: 20020591Kat.-Nr.: AQ127P

Goat  $\alpha$ -FEV und HRP conj. Rabbit  $\alpha$ -Goat Antikörper wurden auch bei *Whole mount* Immunfärbungen eingesetzt.

#### 5.7.5.4 HERSTELLUNG DER MEMBRANEN FÜR DIE KOLONIEHYBRIDISIERUNG

Nach erfolgter Subklonierung diverser DNA-Fragmente in geeignete Plasmidvektoren, und Selektion der Transformierten Bakterien auf LB-Agar-Platten mit einem geeigneten Antibiotikum definierter Konzentration wurden einzelne Bakterienkolonien in je ein Loch einer 96-Loch-Platte inokuliert und schüttelnd bei 37°C für 6h inkubiert. Die Deckel von 96-Loch-Platten wurden verwendet um selektive LB-Agar-Platten herzustellen, auf die eine Hybond N+ Membran gleicher Größe gelegt wurde. Ein Stempel mit 96 Metallstiften diente dazu Bakteriensuspension von der 96-Loch-Platte auf die Membran zu stempeln. Es folgte eine Inkubation ü.N. bei 37°C. Die Filter mit den Bakterienkolonien wurden 5 min mit Denaturierungslösung, zwei mal 5 min mit Neutralisierungslösung sowie 5 min mit 2 x SSC behandelt und die DNA mit 120mJ UV-Licht auf der Membran vernetzt. Bis zur Hybridisierung wurden die Filter bei 4°C gelagert.

### 5.7.6 HYBRIDISIERUNG MIT <sup>32</sup>P-MARKIERTEN DNA-SONDEN

Die gewaschenen Filter wurden in Hybridisierungsflaschen mit einem geeigneten Volumen Hybridisierungspuffer benetzt. Zur *Southern*- bzw. *Northern*-Blot-Analyse und bei Koloniehybridisierungen wurde *Rapid-hyb*-Puffer (Amersham, Kat.-Nr.: RPN 1635) verwendet. Prähybridisierung und Hybridisierung erfolgten bei einer für die Sonden optimierten Temperatur. Bei dsDNA-Sonden, einer Größe von ca. 700 – 1200 bp (s. TAB.: 6), lag die Temperatur bei 65°C. Oligonukleotidsonden (s. TAB.: 4) erforderten eine Hybridisierungstemperatur von 50 – 55 °C. Mit *Rapid-hyb*-Puffer wurde 30 bis 60 min. prähybridisiert und 4 – 6 h hybridisiert. Zur Hybridisierung wurden 1 Mio cpm/ml Puffer eingesetzt. Die radioaktiven Proben wurden bei 95°C geschmolzen und rasch auf Eis abgekühlt, bevor sie den vorgewärmten Puffer hinzugegeben wurden. Ungebundene dsDNA-Probe wurde bei 55 – 60 °C, überschüssige Oligonukleotidsonde bei 45 – 55 °C, durch Waschen mit den in 5.3.1 angegebenen Wasch-Puffern 1-3 entfernt. Bei der Hybridisierung von *Northern*-Blotts wurden RNase-freie Puffer und Materialien verwendet.

### 5.7.7 AUTORADIOGRAPHIE

Die hybridisierten Membranen wurden nach dem Waschen mit saugfähigem Papier abgetupft und in Folie eingeschweißt. In Autoradiographiekassetten (Amersham, Kat.-Nr.: RPN11645) mit Intensivierungsfolien (Amersham, Kat.-Nr.: V8811457) wurden Kodak Röntgenfilme X-Omat AR (Sigma, Kat.-Nr.: F5263) mit den hybridisierten Filtern exponiert. Die Expositionszeit, bei –80°C, variierte je nach Intensität der Signale von 4 Stunden bis zu 5 Tagen. Bei genomischen *Southern-Blots* bewegte sich die Expositionszeit normalerweise in einem zeitlichen Rahmen von 6 – 14 h. *Northern-Blots* hingegen wurde bis zu 5 Tagen exponiert. Intensive Signale hybridisierter Plasmid-DNA waren meist nach 2h Exposition autoradiographisch detektierbar. Die Filme wurden nach Ablauf der Expositionsperiode nach Herstellerangaben entwickelt.

### 5.7.8 ISOLIERUNG VON DNA-FRAGMENTEN AUS AGAROSEGELEN

Für die Subklonierung von DNA-Fragmenten (s. 5.7.10) und zur Herstellung [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]dATP markierter Sonden (s. TAB.: 7) wurden PCR-Produkte und Restriktionsfragmente der Plasmidverdaus elektrophoretisch aufgetrennt (s.5.7.4.1) und die

Größe der zu erwartenden Banden anhand eines mitaufgetragenen Längensstandards (Smart Ladder, Eurogentech, Kat.-Nr.: MW-1700-10; 1kB+ Ladder, GibcoBRL, Kat.-Nr.: 10787-018) bestimmt. Nach Abschluss der horizontalen Gel-Elektrophorese wurde das Gel dokumentiert. Banden von Interesse wurden unter UV-Illumination (305 nm) mit einem sterilen Skalpell aus dem Gel herausgeschnitten. Die DNA-Extraktion erfolgte mit dem QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Kat.-Nr.: 28704) nach Angaben des Herstellers. Der Gelblock wurde im Solubilisierungs- und Bindepuffer bei 55°C geschmolzen. Die Lösung wurde auf eine Säule gegeben und bei 17 900 x g zentrifugiert. Hierbei wird die DNA selektiv an die Slicamembran gebunden. Kontaminierende Komponenten wurden durch zweimaliges Waschen entfernt. Die Elution der DNA erfolgte in einem geeigneten Volumen 10mM Tris-HCl (pH 8,5). Bis zur Verwendung lagerte die DNA bei -20°C.

### **5.7.9 AUFREINIGUNG VON PCR - PRODUKTEN**

PCR-Produkte, die in der Agarose-Gel-Analyse (s. 5.7.4.1) eine spezifische Bande zeigten, wurden vor ihrer Subklonierung (s. 5.7.10) in geeignete Vektoren mit dem QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen, Kat.-Nr.: 28104) nach Herstellerprotokoll aufgereinigt.

## **5.7.10 MOLEKULARE KLONIERUNGEN**

### **5.7.10.1 LIGATIONSREAKTIONEN**

Die Klonierung von Restriktionsfragmenten oder synthetisch hergestellter Oligonucleotide, die ausgesuchte Schnittstellen enthielten (*Polylinker*), in geeignete Vektoren erfolgte unter Katalyse rekombinanter Phagen-T4-Ligase. Plasmid-Vektor und Insert wurden in einem Gewichtsverhältnis von 1 : 1 bis 1 : 5 eingesetzt. Die Ligationsreaktion erfolgte ü.N. bei 16°C in einem Ansatz von 16 µl der 5U T4-DNA-Ligase (Roche, Kat.-Nr.: 799009) enthielt. Die Gesamtmengen an eingesetzter DNA betragen 50 – 100 ng.

### **5.7.10.2 DEPHOSPHORYLIERUNGEN**

Bei nicht direktionalen Klonierungen wurde der Plasmid-Vektor um die Rate der Autoligationen zu minimieren mit Alkalischer Phosphatase (AP) (USB, *Shrimp*

*Alkaline Phosphatase* Kat.-Nr.: 70092Z) dephosphoryliert. Da die verwendete AP in handelsüblichen Restriktionspuffern enzymatisch aktiv ist und die Gegenwart von Restriktionsenzymen die Dephosphorylierungsreaktion nicht stört, wurde nach Abschluss der Restriktionsverdau dem Ansatz 1U AP/10 pmol 5'-Enden hinzugegeben und 1h bei 37°C inkubiert. Abschließend wurden die Restriktionsenzyme und die AP 20 min. bei 70°C inaktiviert und der Ansatz mit dem QIAquick PCR Purification Kit (s. 5.7.9) aufgereinigt.

Zeigte sich bei gerichteten Klonierungen eine Konkatenamerbildung des Inserts, wurde die Ligation mit dephosphoryliertem Insert wiederholt.

### **5.7.10.3 GENERIERUNG STUMPFER ENDEN**

War eine Klonierung über kohäsive Enden aufgrund inkompatibler Schnittstellen nicht möglich, wurden stumpfe Enden generiert.

Durch Restriktionsverdau entstandene 5'-Überhänge wurden mit dem Klenow-Fragment der *E. coli* DNA Polymerase 1 (Roche, Kat.-Nr.: 1008412) aufgefüllt. Nach Hitzeinaktivierung der Restriktionsenzyme wurde der Ansatz unter Zugabe von Klenow-Enzym (1U/μg DNA) und 1μl dNTP's (10μM) für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Aufreinigung der DNA erfolgte wie in 5.7.9 beschrieben.

### **5.7.10.4 HERSTELLUNG TRANSFORMATIONS-KOMPETENTER *E. COLI*-ZELLEN**

20 μl einer frischen über Tag Kultur von *Escherichia coli* (*E.-coli*) DH5α-Bakterien (HANAHAN, 1983, 1985) wurden in 20 ml Luria Broth (LB)-Medium inoculiert, bei 37°C und 190U/min geschüttelt bis eine OD<sub>(600)</sub> von maximal 0,3 erreicht war. Die Zellsuspension wurde bei 4°C und 1000 x g für 10 min. zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Zellpellet in 2 ml eiskaltem TSS-Puffer resuspendiert (CHUNG ET AL.; 1989). Die jetzt kompetenten Zellen wurden entweder sofort transformiert oder vorsichtig aliquotiert, im Methanol-Trockeneis-Bad (-80°C) schockgefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

### **5.7.10.5 TRANSFORMATION KOMPETENTER *E. COLI*-ZELLEN**

50 μl kompetente Zellen wurden langsam auf Eis aufgetaut, mit 8 – 16 μl (25 – 100 ng DNA) vorsichtig gemischt und 30 min auf Eis inkubiert. Danach erfolgte ein

Hitzeschock für 90 sec bei 42°C und die Zugabe von 250 µl LB-Medium. Nachdem der Ansatz für 60 min bei 37°C und 180 U/min geschüttelt wurde, erfolgte die Plattierung der Bakteriensuspension auf vorgewärmten LB-Agar-Platten. Zur Selektion enthielten die Platten ein definiertes Antibiotikum (vektoriell codierte Antibiotikaresistenz), einer bestimmten Konzentration (meist Ampicillin 50µg/ml). War es möglich durch die Klonierung ein in dem Vektor vorhandenes *lacZ*-Gen zu unterbrechen wurde zusätzlich eine Blau-Weiß-Selektion durchgeführt. Dazu wurde 40µl X-Gal (20mg/ml) und 40 µl IPTG (20mg/ml) auf den Platten verteilt bevor die Bakterien plattiert und ü.N bei 37°C inkubiert wurden. Nach Farbintensivierung bei 4°C wurden nur die weißen Kolonien gepickt, da diese sowohl die vektoriell vermittelte Antibiotikaresistenz durch die Transformation erwarben, und der aufgenommene Vektor auch das Insert enthielt, welches das *lacZ*-Gen unterbrach.

#### 5.7.10.6 TA-KLONIERUNGEN

PCR-Produkte wurden meist TA-kloniert (Invitrogen, TOPO TA Cloning<sup>®</sup>, Kat.-Nr.: K-4600-40) . Der Methode liegt die terminale transferase Aktivität der *Taq*-Polymerase zugrunde, welche unabhängig vom *Template* ein einziges Desoxyadenosin an die 3' Enden von PCR-Produkten anhängt. Der im Kit enthaltene linearisierte Vektor hat ein überhängendes 3' Desoxythymidin. Die Ligation wird durch eine an den Vektor kovalent gebundene Topoisomerase vermittelt. Die Ligationsreaktion als auch die anschließende Transformation der im Kit enthaltenen One Shot<sup>®</sup> kompetenten *E. coli* TOP 10 Zellen wurden nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Alternativ wurde das *pGEM<sup>®</sup>-T Easy*-System von Promega (Kat.-Nr.: A1360) nach Herstellerangaben verwendet.

#### 5.7.11 PLASMIDISOLIERUNG AUS TRANSFORMIERTEN BAKTERIEN

Zur Isolation rekombinanter Plasmid DNA wurde der Qiagen<sup>®</sup> Plasmid Maxi Kit (Kat.-Nr.: 12162) und der Qiaprep<sup>®</sup>Spin Miniprep Kit (Kat.-Nr.: 27104) nach Herstellerprotokoll verwendet. Beide Methoden basieren auf der alkalischen Lyse von Bakterien (BIRNBOIM UND DOLY, 1979), der selektiven Bindung von Plasmid-DNA an eine Silica-Membran (Miniprep) oder an ein Anionen-Tauscher-Resin (Maxiprep) und der Elution unter jeweils bestimmten Salzkonzentrationen. Die eingesetzte Menge an Bakterien und die Ausbeute an Plasmid-DNA (Maxi / Mini ; 200ml / 2ml

Kulturvolumen ; maximal 500µg/20µg Plasmid-DNA) definiert sich über die Bindungskapazität der Säulen. DNA aus Minipräparationen wurde zur Kontrolle von Ligationsreaktionen einer Restriktionsanalyse unterzogen. Plasmide mit dem erwarteten Ergebnis wurden in größerem Maßstab und höherem Reinheitsgrad für die Lagerung sowie für weitere Anwendungen wie Sequenzierung und zur Herstellung von Sonden durch Restriktionsverdau isoliert.

### 5.7.12 ISOLIERUNG VON GENOMISCHEN KLONEN AUS EINER PHAGEN-BIBLIOTHEK

Zur Isolierung der genomischen *mPet-1* Sequenz wurde in Kollaboration mit Dr. Tobias Stöger (Ingenium AG) eine genomische  $\lambda$ -Phagenbibliothek abgesucht. Die Sequenz des mit der *mPet-1* 3'-UTR Probe identifizierten Phagenklons wurde mir zur Verfügung gestellt

### 5.7.13 REVERSE TRANSKRIPTION VON mRNA UND AMPLIFIKATION DER *MPET-1* CDS

Zur Reversen Transkription der mRNA wurde das SuperScript™ First-Strand Synthesis System for RT-PCR (GibcoBRL, Kat.Nr.:11904-018) verwendet. Die Erststrangsynthese wurde durch die SuperScript II RNase H<sup>-</sup> Reverse Transkriptase, einer rekombinanten Form der RNaseH<sup>+</sup> Reversen Transkriptase des Moloney-Mäuse-Leukämie-Virus, katalysiert um eine Degradierung der mRNA während der Erststrangsynthese möglichst zu vermeiden und um die Ausbeute an langen cDNA-Fragmenten zu steigern. Als *Primer* für die Reverse Transkriptase wurde Oligo(dT)<sub>12-18</sub> verwendet. Dieses Oligonukleotid bindet an den 3'-Poly(A)-Schwanz der mRNA und stellt nach der Synthese des cDNA-Erststrangs dessen 5'-Ende dar. Die cDNA Synthese wurde nach folgendem Protokoll durchgeführt.

#### RNA/*Primer* Mix:

Gesamt-RNA (2-4µg)	n	µl
dNTP-Mix (10mM)	1	µl
Oligo(dT) (0,5µg/µl)	1	µl
DEPC-Wasser	ad 10	µl

#### *Primerbindung*

65°C für 5 min., anschließend 4°C für 1 min.

10x RT-Puffer	2	µl
MgCl <sub>2</sub> (25mM)	4	µl
DTT (100mM)	2	µl
RNase-Inhibitor	1	µl

alle Komponenten zufügen, 42°C für 2 min.

Superscript™ II RT	1 µl (50U)	Reverse Transkription bei 42°C für 50 min. Stop-Reaktion bei 70°C für 15 min., abkühlen auf Eis
RNase H	1 µl (2U)	37°C für 20 min.

Während der Reversen Transkription entstehen cDNA:RNA Hybridmoleküle. Um die Sensitivität der sich anschließenden Polymerase-Kettenreaktion von der cDNA zu erhöhen wurde die RNA durch einen RNase H – Verdau aus dem Hybrid entfernt.

*Primer* und PCR-Ansatz sowie PCR-Bedingungen zur Amplifikation der *mPet-1* CDS sind aus folgenden Schemata zu entnehmen.

**TAB.: 3 OLIGONUKLEOTIDE ZUR AMPLIFIKATION DER CODIERENDEN *MPET-1* SEQUENZ**

Name	Sequenz 5'→ 3'	Tm[°C]
mPet-1 CDS for	CCAGTCCCCGGCAGCGATGAGAC <sub>(23)</sub>	>65
mPet-1 CDS rev	CCCGGCCGTCCCCGTCTAGTG <sub>(21)</sub>	>65

<i>Hot-Start</i> PCR-Konditionen:	Denaturierung:	95°C	5'
	Zugabe der Taq-Polym.	95°C	1'
-----			
	Denaturierung:	95°C	30"
	Annealing:	62°C	30"
	Extension:	72°C	40"
-----			
		36 Zyklen	
-----			
	finale Extension:	72°C	10'

Pipettierschema:	H2O	35,0	µl
	Puffer	5,0	µl
	MgCl <sub>2</sub>	3,0	µl
	dNTP's (10mM)	1,0	µl
	DMSO	1,5	µl
	mPet-1CDS for	2,0	µl
	mPet-1CDS rev	2,0	µl
	Taq Polymerase	0,5	µl
	-----		
	Gesamt	50,0	µl

#### 5.7.14 GENERIERUNG UND 5' TERMINALE MARKIERUNG VON OLIGONUCLEOTIDSONDEN MIT <sup>32</sup>P

Je 50 – 80 pmol synthetisch hergestellter (s. 5.4; TAB.: 4), genspezifischer Oligonucleotidsonden, einer Größe von 50 – 60 Basen wurden mit dem *5'-end labelling kit* (Amersham, Kat.-Nr.: RPN 1509) nach Herstellerangaben endmarkiert. Die T4-Polynukleotidkinase katalysiert den Transfer der endständigen Phosphatgruppe von [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATP (Amersham, Kat.-Nr.: AA0018) auf die 5' Hydroxylgruppe des Oligonucleotides sowie den Austausch eventuell vorhandener 5'-endständiger Phosphatgruppen. Die so radioaktiv markierten Proben wurden mit dem Qiaquick<sup>®</sup>Nucleotide Removal Kit (Qiagen, Kat.-Nr.: 28304) nach Herstellerangaben aufgereinigt, die Aktivität gemessen und zur Identifizierung von subklonierten DNA-Fragmenten, in einer Konzentration von  $1 \times 10^6$  cpm/ml Hybridisierungspuffer, bei der Koloniehybridisierung eingesetzt ( s. 5.7.5.4).

**TAB.: 4 OLIGONUCLEOTIDSONDEN ZUR 5'-KINASIERUNG**

<b>Name:</b> <i>mPet-1-Probe</i>	Hybridisierungstemperatur: 60 °C
<b>Sequenz:</b> 5'-GTCGGAGATGGTCTTTTTAAGGAAGGGAAGAGCCCGAGCTGGGG GCCGCTGAGCCCCGCGG-3'	
<b>Name:</b> <i>mPet-1-Probe 1.Exon</i>	Hybridisierungstemperatur: 60 °C
<b>Sequenz:</b> 5'-CAGAGCGGCACCTCCCAGCCCCTGCTGATCAACATGTACCTGC-3'	
<b>Name:</b> <i>tau-Probe</i>	Hybridisierungstemperatur: 60 °C
<b>Sequenz:</b> 5'- CCACCCGGATTCCAGCAAAAACCACTCCCACCCCGAAGACCTCG CCAG-3'	

#### 5.7.15 GENERIERUNG UND MARKIERUNG VON DS-cDNA-SONDEN MIT <sup>32</sup>P

ds-cDNA-Sonden werden hergestellt indem mRNA revers transkribiert wird (s. 5.7.13) und anschließend eine PCR mit genspezifischen Primern durchgeführt wird. So generierte ds-cDNA's wurden in geeignete DNA Vektoren kloniert, in diversen, apathogenen *E.coli*-Stämmen vermehrt (s. 5.7.10) und bis zur Verwendung als Glycerolstock oder in Form gereinigter Plasmid-DNA (s. 5.7.11) gelagert. In dieser Arbeit wurde zur *Northern-Blot*-Analyse und zum Absuchen einer

genomischen  $\lambda$ -Phagenbibliothek eine *mPet-1* 3'-UTR-Sonde mit einer Größe von 550 bp verwendet. Die *mPet-1* 3'-UTR ds-cDNA-Sonde wurde wie folgt hergestellt. Als mRNA-Quelle für die RT-PCR wurde die Gesamt-RNA aus Mittel-Hirnhirngewebe von Mäuseembryonen des Entwicklungsstadiums E12.5 isoliert. Da die Sequenz von *mPet-1* (*mouse PC12 Ets-domain-transcription-factor-1*) nicht bekannt war, wurden degenerierte *Primer* von der bekannten Rattensequenz abgeleitet (TAB.: 5). Das PCR-Produkt wurde TOPO-TA-kloniert (s. 5.7.10.6), anschließend sequenziert (s. 5.7.17) und durch Sequenzvergleich mit dem Rattenhomolog *Pet-1* und durch *in-situ* Hybridisierung (s. 5.8.5) verifiziert.

**TAB.: 5 PRIMER ZUR AMPLIFIKATION DER MPET-1 3'UTR DS-CDNA-SONDE**

Name	Sequenz 5' → 3'	Tm[°C]
Pet Stop/deg for	GGGGGNCATTAYCACTAGACG <sub>(21)</sub>	62
Pet 3'UTR 2 rev	TATACAGGCTGGGGTCCTTG <sub>(20)</sub>	62

PCR-Programm:

Denaturierung:	95°C	30"
Annealing:	62°C	30"
Extension:	72°C	40"
	36 Zyklen	

Zur Hybridisierung von auf Nylonmembranen immobilisierter RNA, wurde die ds-cDNA Probe mit dem Restriktionsenzym *EcoRI* aus dem pCR-II-TOPO<sup>®</sup> Plasmid isoliert und mit [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P] dCTP radioaktiv markiert. Hierzu wurde das Megaprime<sup>™</sup> DNA labelling system (Amersham, Kat.-Nr.: RPN 1604/5/6/7) verwendet. Je Markierungsreaktion wurden 50 – 80 ng doppelsträngige cDNA-Sonde in Anwesenheit von nonameren Oligonucleotiden mit zufälliger Sequenzabfolge bei 95°C für 5 min. denaturiert. Eine rasche Abkühlung auf Eis bedingte eine bevorzugte Bindung der Nonamere an die DNA-Einzelstränge. Die Replikation der DNA-Einzelstränge in Anwesenheit unmarkierter Nukleotide sowie die enzymatische Inkorporation von [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P] dCTP (50  $\mu$ Ci Aktivität) wurde durch das Klenow Fragment der DNA-Polymerase I aus *E. coli* katalysiert. Die Aufreinigung so hergestellter Sonden erfolgte über MicroSpin<sup>™</sup>S-300 HR Säulen (Amersham, Kat.-Nr.: 275130). Während der Zentrifugation (740xg, 2 min) wurden nicht inkorporierte Nukleotide und Nukleinsäurefragmente bis zu einer Größe von 200 bp an das Säulenmaterial Sephacryl<sup>®</sup> gebunden und somit von der markierten Probe abgetrennt. Die Inkorporationseffizienz von [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P] dCTP wurde durch die Messung der radioaktiven

Zerfälle pro Minute in einem  $\mu\text{l}$  Eluat bestimmt. Bei einer bis zu 60 %igen Inkorporation konnten in der Regel Werte von  $80 - 250 \cdot 10^3 \text{ cpm}/\mu\text{l}$  ermittelt werden.

### 5.7.16 GENOTYPISIERUNG TRANSGENER MÄUSE

Zur Genotypisierung transgener Mäuse wurden einerseits PCR-Strategien verfolgt und andererseits die *Southern-Blot*-Analyse eingesetzt. Für beide Methoden wurde genomische DNA verwendet die bei adulten Tieren aus Gewebe der Schwanzspitze oder bei Embryonen aus dem Dottersack isoliert und aufgereinigt wurde (s. 5.7.1.1).

#### 5.7.16.1 GENOTYPISIERUNG ÜBER LACZ-PCR

Da im Mutagenisierungs-konstrukt eine *lacZ*-Kassette als Reporter-gen verwendet wurde, erfolgte die Identifizierung des mutierten Allels heterozygoter Tiere (*En-1<sup>+/mPet-1</sup>*) mit der Amplifikation eines 630 bp großen *lacZ*-Fragmentes.

PCR-Programm:	Denaturierung:	95°C	30"
	Annealing:	60°C	30"
	Extension:	72°C	40"
		36 Zyklen	

TAB.: 6 PRIMER FÜR DIE LACZ-PCR

Name	Sequenz 5'→ 3'	Tm[°C]
lacZ for	GGTGGCGCTGGATGGTAA <sub>(18)</sub>	60
lacZ rev	CGCCATTTGACCACTACC <sub>(18)</sub>	60

PCR-Ansatz:	DNA (100-500ng):	1	$\mu\text{l}$
	10x <i>Taq</i> -Puffer:	2,5	$\mu\text{l}$
	MgCl <sub>2</sub> (25mM):	1,5	$\mu\text{l}$
	dNTP's (10mM):	1	$\mu\text{l}$
	sense Primer (10 $\mu\text{M}$ ):	1	$\mu\text{l}$
	antisense Primer (10 $\mu\text{M}$ ):	1	$\mu\text{l}$
	<i>Taq</i> -DNA-Polymerase (5U/ $\mu\text{l}$ ):	0,25	$\mu\text{l}$
	H <sub>2</sub> O	17,25	$\mu\text{l}$
	-----		
Gesamt	25	$\mu\text{l}$	

### 5.7.16.2 GENOTYPISIERUNG DURCH SOUTHERN-BLOT ANALYSE

Bei Tieren der F1-Generation die zur Etablierung der mutanten Linie dienen wurde das PCR-Resultat mit einer *Southern-Blot*-Analyse bestätigt. Weiterhin wurde diese Methode zur Identifizierung mutanter Es-Zell-Klone eingesetzt. Isolierte genomische DNA (s. 5.7.1) wurde mit *XbaI* für die 5' Sonde und mit *HindIII* für die 3' externe Sonde verdaut (TAB.: 7). DNA-Gel-Elektrophorese, DNA-Transfer und Immobilisierung auf einer Nylonmembran sowie die Hybridisierung mit <sup>32</sup>P markierten Sonden und Autoradiographie erfolgte wie in 5.7.4; 5.7.5.1; 5.7.6; 5.7.7 beschrieben.

### 5.7.16.3 IDENTIFIZIERUNG HOMOZYGOTER *EN-1*<sup>MPET-1/MPET-1</sup> EMBRYONEN

Da im *Knock-In* Experiment *mPet-1* unter dem *En-1* Promotor zur Expression gebracht wird, sind bei den homozygoten Embryonen (*En-1*<sup>*mPet-1/mPet-1*</sup>) beide *En-1* Allele zerstört. Somit zeigten diese Embryonen den *En-1* Phänotyp (WURST ET AL., 1994). Der Verlust der dorsalen Mittel-/Hinterhirnregion wurde als morphologisches Merkmal zur Identifizierung der *En-1*<sup>*mPet-1/mPet-1*</sup> Mutanten genutzt.

### 5.7.16.4 GENERIERUNG VON DSDNA-SONDEN ZUR GENOTYPISIERUNG

Die Vektoren welche die DNA-Sonden zur Detektion des wildtypischen und mutanten *En-1* Allels enthielten wurden mir freundlicherweise von Herrn Dr. Jordi Guimera und Herrn Prof. Wurst zur Verfügung gestellt. Zur <sup>32</sup>P-Markierung, wie in 5.7.15 beschrieben, wurden die Sonden aus den entsprechenden Vektoren (TAB.: 7) durch Restriktionsverdau und DNA-Gel-Elektrophorese isoliert (s. 5.7.4.1).

TAB.: 7 PLASMID DNA KLONE ZUR <sup>32</sup>P MARKIERUNG VON DNA-SONDEN

Gensonde	Insertgröße	DNA-Vektor / Enzym	Referenz
<i>En-1</i> 5' semiextern	1200bp	SC-1 / <i>SacI</i>	W. Wurst
<i>En-1</i> 3' extern	700bp	ESEN / <i>EcoRI</i> ; <i>HindIII</i>	J. Guimera

## 2.7.17 DNA-SEQUENZIERUNG

Alle Sequenzierungen dieser Arbeit wurden von der Firma Sequiserve mit einem ABI Prism 377 Sequenzierer durchgeführt. Die Auswertung und Editierung der Sequenzen erfolgte mit Hilfe der Computerprogramm Sequece-Navigator, Sequence-Analysis und VectorNTI™(Version 6).

## 5.8 HISTOLOGIE / MORPHOLOGIE

### 5.8.1 HERSTELLUNG VON GEWEBESCHNITTEN

#### 5.8.1.1 HERSTELLUNG VON PARAFFINSCHNITTEN

Paraffinschnitte wurden sowohl für die *in-situ* Hybridisierung als auch für immunhistochemische Färbungen und histochemische Färbungen verwendet. Um eine gute Gewebeerhaltung und eine vollständige Durchdringung des Gewebes mit Paraffin zu gewährleisten wurden ganze Embryonen, embryonale (ab E14,5) sowie adulte Gehirne bevor sie in Paraffin eingebettet wurden nach folgendem Schema fixiert und dehydriert.

**TAB.: 8 VORBEHANDLUNG DER PRÄPARATE ZUR PARAFFINEINBETTUNG**

	≤ E8,5-E9,5	E10,5-E11,5	E12,5-E13,5	E14,5-P0	adult
<b>4% PFA</b>	30 min	60 min	2 h	12 h	Perfusion
<b>70% Ethanol</b>	15 min	15 -30 min	30 min	60 min	4 h
<b>96% Ethanol</b>	5 min	10 min	30 min	30 min	1 h
<b>100% Ethanol</b>	5 min	10 min	30 min	30 min	1 h
<b>Xylol</b>	5 min	10 min	30 min	30 min	1 h
<b>Paraffin/Xylol 1:1</b>	None	None	None	None	1 h
<b>Paraffin</b>	12 h	12 h	12 h	12 h	12 h

Gewebe kann in 70% Ethanol gelagert werden. Die angegebenen Zeiten sind Empfehlungen für ganze Embryonen bis E13,5 und präparierte Gehirne ab E14,5. Das Gewebe sollte solange in Xylol bleiben bis eine Transparenz eintritt, auch wenn die empfohlenen Zeiten überschritten werden. Anschließend wurden die Präparate in

einer Metallschale im flüssigen Paraffin ausgerichtet, ein Kunststoff-Spannrähmchen aufgebracht und das Paraffin bei 4°C ausgehärtet. Von dem Paraffinpräparat wurden mit dem Mikrotom serielle Schnitte mit einer Dicke von 8µm angefertigt. Dazu wurden die Schnitte mit Pinsel und Präpariernadel getrennt und in ein 39°C warmes Wasserbad mit mehreren Kammern überführt. Die im Wasserbad ausgebreiteten Schnitte wurden der Reihe nach auf mehrere Superfrost®Plus Objektträger faltenfrei aufgezogen, auf einem Strecktisch getrocknet und bei 4°C bis zur Verwendung gelagert. Die so erhaltenen Serien konsekutiver Schnitte ermöglichte den direkten Vergleich diverser Marker bei Genexpressionsstudien und Immunfärbungen.

### **5.8.1.2 HERSTELLUNG VON KRYOSCHNITTEN**

Embryonen wurden, wie aus TAB.: 8 zu entnehmen, fixiert. Adulte Gehirne wurden perfundiert (s. 5.8.2). Anschließend wurde das Gewebe zur Kryoprotektion der Zellen und zum Zweck einer besseren Gewebeerhaltung für 12 h, bei 4°C, in einer Lösung von 25% Succrose in PBS bewegt. Danach wurden die Embryonen in Kryoprotektionslösung der 7,5 % Gelatine zugesetzt war ausgerichtet. Nach dem Erstarren erfolgte das Schockgerieren auf Trockeneis oder in Isopentan, welches mit flüssigen Stickstoff auf -50°C gekühlt wurde. Adulte Gehirne wurden nichteingebettet auf Trockeneis schockgefroren. Zum Schneiden wurden die eingebetteten Embryonen und die adulten Gehirne auf einem Pelletierelement mit Kryoeinbettmedium rasch, bei -50°C festgefroren um eine Schädigung des Gewebes durch auftauen zu vermeiden. Von den Embryonen wurden serielle Schnitte einer Dicke von 20µm im Kryostaten bei -15 bis -20°C angefertigt auf Objektträger aufgezogen, getrocknet und sofort zu Immunfärbungen verwendet oder bei -20°C gelagert. 40µm Schnitte von adulten Gehirnen wurden frei schwimmend einer X-Gal Färbung (s. 5.8.4.2) unterzogen und anschließend aufgezogen.

### **5.8.1.3 HERSTELLUNG VON VIBRATOMSCHNITTEN**

Vibratomschnitte einer Dicke von 50 - 500µm wurden bei der X-Gal Färbung (s. 5.8.4.2) an adulten Gehirnen verwendet. Die Gewebefixierung erfolgte wie im nächsten Abschnitt beschrieben durch Perfusion. Jedoch wurde *lacZ*-Fixans verwendet, von dem das Gewebe nach erfolgter Fixierung, mit *lacZ*-Wasch-Puffer freigespült wurde (s. 5.3.2.1.2). Die Gehirne wurden mit Sekundenkleber auf einer

Metallplatte befestigt und im Eisbad geschnitten. Die Schnitte wurden sofort verwendet.

## **5.8.2 INTRAKARDIALE PERFUSION**

Aufgrund der Größe adulter Gehirne wurde die intrakardiale Perfusion der Immersionsfixierung bevorzugt. Hierzu wurden adulte Tiere mit Halothan narkotisiert, der Thorax eröffnet und das Herz freigelegt. Die Herzspitze wurde seziert, eine Knopfkanüle über den linken Ventrikel bis in die Aorta vorgeschoben mit einer Klammer fixiert, und der rechte Vorhof eröffnet. Das Gefäßsystem wurde mit PBS von Blut freigespült. Der kontinuierliche Fluss von PBS und 4% PFA/PBS sowie der Transport ins Kapillarsystem wurde durch eine Schlauchpumpe gewährleistet. Die Perfusion war nach 3 – 10 min abgeschlossen und das Gehirn konnte präpariert werden. Das Gewebe wurde anschließend 2 – 3 h durch Immersion nachfixiert und nach TAB.: 8 für die Einbettung in Paraffin vorbereitet. Für die X-Gal Färbung erfolgte die Perfusion mit *LacZ*-Puffern.

## **5.8.3 IMMUNHISTOCHEMISCHE FÄRBUNGEN**

### **5.8.3.1 IMMUNFÄRBUNG MIT POLYKLONALEN ANTIKÖRPERN AUF SCHNITTEN**

Paraffinschnitte wurden zunächst 2 x 30 min in Xylol entwacht, in einer absteigenden Alkoholreihe rehydriert und in H<sub>2</sub>O überführt. Um durch die Paraffineinbettung entstandene Modifikationen am Protein zu beseitigen, wurden die Schnitte in 0,01 M Natriumcitrat (pH 6) in der Mikrowelle bei 600 Watt Leistung, 5 min gekocht. Nachdem die Schnitte abgekühlt waren, wurden sie 2 x 5 min in PBS gewaschen. Diese Vorbehandlung war bei Gefrierschnitten nicht erforderlich. Im weiteren Verlauf der Immunfärbung wurden Kryoschnitte und Paraffinschnitte identisch behandelt. Endogene Peroxidasen wurden durch Inkubation der Schnitte in 0,1% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> inaktiviert. Um unspezifische Bindungen des primären AK zu vermeiden wurden die Schnitte in 10% FCS und 0,01% Triton-X in PBS für eine Stunde bei RT geblockt. Die primären und sekundären AK wurden in 10% FCS/PBS verdünnt (TAB.: 9). Die Schnitte wurden ü.N. bei 4°C im primären AK und für 1h bei RT im sekundären AK inkubiert. Die Schnitte wurden für 30 min mit ABC-Reagenz (Avidin-Biotin-Complex) benetzt. Das Glycoprotein Avidin hat eine sehr hohe Affinität zu Biotin und darüber hinaus 4 Bindestellen für das Vitamin. Somit ist der Komplex sehr

stabil und durch die Konjugation der Merrettich-Peroxidase mit Biotin wird eine Potenzierung des zu erwartenden Signals erreicht. Zwischen allen Schritten wurde je 3 x 5 min mit PBS gewaschen und vor der DAB-Reaktion 5 min mit 0,05M Tris-HCL (ph 7,5). Bei der Entwicklung der Schnitte in DAB-Färbelösung wurde das Substrat Diaminobenzidin von der Merrettich-Peroxidase in Anwesenheit von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> zu einem braunen Präzipitat umgesetzt. Alternativ, wurde zur Detektion des Signals HistoGreen™ nach Herstellerangaben verwendet. Abschließend erfolgte die Dehydrierung in der aufsteigenden Alkoholreihe und das Eindeckeln der Schnitte in DPX-Einschlussmittel direkt aus Xylol.

**TAB.: 9 POLYKLONALE ANTIKÖRPER ZUR IMMUNFÄRBUNG**

<b>Primärer Antikörper α-mouse</b>	<b>Sekundärer Antikörper</b>	<b>ABC-Reagenz</b>
<b>Tyrosin-Hydroxylase</b> Rabbit α-TH IgG 1 : 5000 PelFeeze, Lot.: 14924 Kat.-Nr.:P40101	Biotinylated Goat α-Rabbit IgG 1 : 300 Vector Lab., Lot: N0306 Kat.-Nr.: BA 1000	1 : 300 Vector Lab., Kat.-Nr.. PK-6100
<b>5-Hydroxy-Tryptamin</b> Rabbit α-5-HT IgG 1 : 200 ICN, Lot.:7650E, Kat.-Nr.:11160	Biotinylated Goat α-Rabbit IgG 1 : 300	1 : 300
Goat α-FEV IgG 1:10 – 1:5000 Santa Cruz, Lot.:c-18 K030 Kat.-Nr.: sc6530	Biotinylated Rabbit α-Goat IgG 1 : 300 Jackson Immuno Res., Lot: 49092 Kat.-Nr.: 35-065-006	1 : 300

### **5.8.3.2 WHOLE MOUNT IMMUNFÄRBUNGEN MIT POLYKLONALEN ANTIKÖRPERN**

Embryos wurden am Tag 9 post coitum in PBS präpariert, in 4% PFA/PBS 20 min fixiert und in aufsteigender Methanolreihe dehydriert. Nach Bleichen und Inaktivierung endogener Peroxidasen in BI-Puffer wurden die Embryonen in absteigender Methanolreihe rehydriert, in PBS gewaschen und 3 x 2 Stunden in PBSMT geblockt. Die Inkubation im 1:100, PBSMT verdünnten, primären Goat α-FEV Antikörper und im 1 : 200 verdünnten, HR-Peroxidase konjugierten sekundären Rabbit α-Goat Antikörper (TAB.: 9) erfolgte jeweils über Nacht. Ungebundener

Antikörper wurde durch mehrmaliges Waschen in PBSMT, über einen Zeitraum von 48h, entfernt. Die Entwicklung wurde anschließend in DAB durchgeführt (s. 5.3.2.2).

### 5.8.3.3 IMMUNFÄRBUNGEN MIT MONOKLONALEN ANTIKÖRPERN

Die Immunfärbungen mit dem aus Hybridomazellen isolierten monoklonalen  $\alpha$ -TpH Antikörper wurde auf Paraffinschnitten durchgeführt. Werden diese primären Maus-Antikörper bei immunhistochemischen Techniken auf Mausgewebe eingesetzt entsteht das Problem, dass der sekundäre  $\alpha$ -Maus Antikörper nicht zwischen dem primären Antikörper und den endogenen Immunglobulinen unterscheiden kann. Somit würde eine starke Hintergrundfärbung entstehen, die ihrerseits das spezifische Signal überdecken würde. Diese unerwünschte Hintergrundfärbung konnte durch die Benutzung des Vector® M.O.M.™ Immunodetection Kit (Vector, Kat.-Nr.: PK-2200) nach Herstellerangaben (TAB.: 10), verhindert werden. Paraffinschnitte wurden wie in Abschnitt 5.8.3.1 beschrieben vorbehandelt und das Signal nach der Antikörperinkubation mit DAB oder HistoGreen™ detektiert.

**TAB.: 10 M.O.M.-KIT UND MONOKLONALE ANTIKÖRPER**

<b>M.O.M.-Kit Komponenten</b>	<b>Gebrausfertige Verdünnung</b>
Protein solution	1 : 12,5 in PBS
IgG Blocking Reagent	1 : 50 in PBS
$\alpha$ -mouse IgG	1 : 250 in Proteinlösung
ABC-Reagenz	Avidin / Biotin je 1 : 200 in PBS

<b>Primärer Antikörper</b>	<b>Gebrausfertige Verdünnung</b>
$\alpha$ -TpH IgG Sigma, Lot.: WH-03, Kat.-Nr.: T0678	1 : 1000 in Protein solution

$\alpha$ -TpH IgG erkennt beide TpH Isoformen TpH-1 und TpH-2

## **5.8.4 HISTOCHEMISCHE FÄRBUNGEN**

### **5.8.4.1 FÄRBUNG NACH NISSL (1899)**

Bei der Färbung nach Nissl werden Bestandteile des rauen endoplasmatischen Retikulums (Nissl-Schollen) mit Kresylviolett-Lösung angefärbt. In dieser Übersichtsfärbung werden somit die Zellsomata und die Zellkerne dargestellt. Verwendete Schnitte wurden rehydriert und bis zu 15 min in Kresylviolett-Lösung gefärbt. Nach dem Spülen in H<sub>2</sub>O und 70% Ethanol wurde die Färbung in 100 ml 96% Ethanol, der mit 1ml Eisessig angesäuert war, differenziert. Die Schnitte wurden anschließend in 100% Ethanol dehydriert und direkt aus Xylol mit DPX eingedeckt.

### **5.8.4.2 X-GAL FÄRBUNG**

Mit dieser enzymatischen Färbereaktion kann die Expression mutanter Allele in distinkten Geweben nachgewiesen werden, wenn die Mutagenisierungskonstrukte eine *lacZ*-Reporter-kassette enthalten. Diese bakterielle  $\beta$ -Galactosidase setzt X-Gal, ein Indolderivat, in Anwesenheit von Ferro- und Ferricyaniden zu dem blauen Farbstoff Indigo um. Zur Färbung adulter Gehirne wurden nach der Perfusion (s. 5.8.2) Vibratomschnitte und Kryoschnitte angefertigt. Embryonen im Alter von E9,5 bis E11,5 wurden maximal 60 min in *lacZ*-Fixans fixiert. Alle Präparate wurden 3 x für 15 min im *lacZ*-Wasch-Puffer schüttelnd gewaschen bevor Sie ü.N. in Färbelösung bei 37°C inkubiert wurden. Nach Abschluss der Färbung wurden die Präparate ü.N. in 4% PFA/PBS nachfixiert. Die Vibratomschnitte wurden unmittelbar vor mikroskopischen Aufnahmen mit Methylsalicylat geklärt. Embryonen wurden in PBS mikroskopiert und in 70% Ethanol gelagert. Die Gefrierschnitte wurden aus PBS aufgezogen, in der aufsteigenden Alkoholreihe dehydriert und in DPX eingedeckt.

### **5.8.4.3 EXPRESSION VON *MPET-1* / *EGFP* IM ZELLKERN UND F-ACTINFÄRBUNG DES ZYTOSKELETTS**

HEK-293 Zellen wurden auf Poly-Lysin beschichteten Deckgläschen kultiviert und zur Darstellung des Zellkerns mit einem DNA-Vektor, der ein Fusionsprotein aus Green Fluorescent Protein (Clontech; EgfpN1, Kat.-Nr.:6085-1) und dem Transkriptionsfaktor *mPet-1* codiert, transfiziert (s. 5.10.2). 24 h nach der Transfektion wurden zur Kontrastierung die F-Actin-Filamente des Cytoskeletts mit Alexa Fluor™ 546 phalloidin (Molecular Probes, Kat.-Nr.: A-22283) angefärbt. Diese mit einem

Fluoreszenzfarbstoff konjugierten Phalloidine sind Derivate des Phallotoxins aus *Amanita phalloides* und binden stöchiometrisch an F-Actin. Hierzu wurden die Zellen 10 min. in 4% PFA/PBS fixiert, in PBS gewaschen und 5 min. in Aceton entfettet. Zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen wurden die Zellen 20 min in 1% BSA/PBS inkubiert. Zur Färbung wurde 1U Phalloidin in 200 µl einer 1%igen BSA/PBS-Lösung eingesetzt. Die Präparate wurden in PBS gewaschen und in ProTaqstura™ eingedeckt. Die Resultate aus Transfektion und Färbung wurden mit einem konfokalen Mikroskop dokumentiert. Alexa Fluor® 546-Phalloidin wurde mit einem Laser bei 556 nm angeregt und emittierte rotes Fluoreszenzlicht (573 nm). Egfp wurde bei 488 nm angeregt und emittierte eine grüne Fluoreszenz (507 nm). Beide Fluoreszenzbilder wurden überlagert.

### **5.8.5 IN-SITU HYBRIDISIERUNG AUF PARAFFINSCHNITTEN**

Bei mRNA Expressionsstudien ermöglicht die *in-situ* Hybridisierung auf diversen Geweben die zweidimensionale Darstellung der Expressionsdomaine eines Gens. Auf Paraffinschnitten erreicht man eine Auflösung bis in die zelluläre Ebene. Somit ist die *in-situ* Hybridisierung eine der wichtigsten analytischen Methoden zur Aufklärung der Interaktion zwischen Genen während der Entwicklung eines komplexen Organismus. Die *in-situ* Hybridisierung erfolgte nach einer modifizierten Methode von DAGERLIND ET AL., 1992 UND WILKINSON ET AL., 1992.

#### **5.8.5.1 GENERIERUNG UND MARKIERUNG VON RIBOSONDEN MIT <sup>35</sup>S**

Radioaktiv markierte, antisense cRNA-Sonden (Ribosonden) dienen zur Detektion der mRNA-Expression in verschiedenen Geweben und repräsentieren oft die nicht konservierte 3'UTR eines Gens um bei der *in-situ* Hybridisierung eine spezifische Bindung an die mRNA zu gewährleisten. Um Ribosonden durch *in-vitro* Transkription herstellen zu können wurde zunächst mRNA aus verschiedenen Geweben revers transkribiert (s. 5.7.13). Bei der sich anschließenden PCR-Reaktion mit genspezifischen Oligonucleotiden wurden doppelsträngige DNA-Fragmente generiert, und in Transkriptionsvektoren die über flankierende Promotoren für die RNA-Polymerasen der Bakteriophagen T3, T7 und SP6 verfügen, TA-kloniert (s. 5.7.10.6) (DUNN UND STUDIER, 1983; KASSAVETIS, 1982).

**TAB.: 11 GENSPEZIFISCHE OLIGONUCLEOTIDE ZUR AMPLIFIKATION VON dsDNA-MATRIZEN ZUR *IN VITRO*-TRANSCRIPTION VON RIBOSONDEN**

Name	Sequenz 5'→ 3'	Tm[°C]
mPet-1 CDS for	CCAGTCCCCGGCAGCGATGAGAC <sub>(23)</sub>	>65
mPet-1 CDS rev	CCCGGCCGTCCCCGTCTAGTG <sub>(21)</sub>	>65
Pet-1 Stop/deg for	GGGGGNCATTAYCACTAGACG <sub>(21)</sub>	62
Pet-1 3'UTR 2 rev	TATACAGGCTGGGGTCCTTG <sub>(20)</sub>	62

Für die *in-situ* Hybridisierungen wurden antisense cRNA Sonden verwendet. Diese wurden von folgenden, tabellarisch aufgelisteten Plasmiden *in vitro* transkribiert.

**TAB.: 12 PLASMID-DNA-KLONE ZUR *IN VITRO*-TRANSKRIPTION VON cRNA-SONDEN**

Gen	DNA-Insergröße [bp]	DNA-Vektor, Restriktionsenzym und RNA-Polymerase für antisense RNA-Sonden	Referenz
<i>mPet-1</i> 3'UTR	550	pCR®II-TOPO®, <i>Bam</i> HI / T7	Pfaar et al., 2001
<i>mPet-1</i> CDS	714	pGEM T, <i>Sal</i> I / T7	Pfaar et al., 2001
<i>Sert</i> 3' UTR	525	pCR®II-TOPO®, <i>Hind</i> III / T7	Dr. Claude Brodski (persönliche Mitteilung)
<i>En-1</i>	1842	pBS II-SK, <i>Hind</i> III / T7	Prof. Klaus Schuhgart (persönliche Mitteilung)
<i>shh</i>	642	pBS II-SK, <i>Hind</i> III / T3	Prof. Douglas Epstein (persönliche Mitteilung)
<i>Lmx1B</i>	490	<i>Xho</i> I / Sp6	Dr. Claude Brodski (persönliche Mitteilung)
<i>Nkx 2.2</i>	2100	pBS II-SK, <i>Not</i> I / T7	Prof. John Rubenstein (persönliche Mitteilung)

Zur Generierung von "run off Transkripten" wurde i.d.R 5-10 µg Plasmid linearisiert und aufgereinigt (QIAquick PCR Purification Kit, Qiagen, Kat.-Nr.: 28104). Zur radioaktiven Markierung der Ribosonden wurde [ $\alpha$ -thio  $^{35}$ S]-UTP (Amersham, Kat.Nr.: SJ 40383) verwendet.

Der Standardansatz von 30 µl wurde nach folgendem Schema pipettiert:

Linearisierte Matrizen-DNA (1µg)	1,5 µl
10x Transkriptionspuffer	3 µl
NTP-mix (rATP,rCTP,rGTP; je10mM )	3 µl
DTT (0,5 M)	1 µl
RNase-Inhibitor (40U/µl)	1 µl
[ $\alpha$ -thio $^{35}$ S]-UTP (40 µCi/ µl)	3 µl
RNA-Polymerase (20U/µl)	1 µl
DEPC-Wasser	16,5 µl
-----	
Gesamt	30,0 µl

Der Reaktionsansatz wurde insgesamt 3h bei 37°C° inkubiert und nach einer Stunde wurden weitere 20U RNA-Polymerase hinzugegeben. Nach Abschluss der *in vitro*-Transkription wurde die Matrizen-DNA durch Zugabe von 2U RNase freier DNase1 enzymatisch für 15 min bei 37°C degradiert. Anschließend erfolgte die Aufreinigung der synthetischen RNA. Dazu wurde der RNeasy™ Mini Kit (Qiagen, Kat.Nr.: 74104) nach Herstellerangaben verwendet und die Probe mit 50 µl DEPC-Wasser von der Säule eluiert. Zur Bestimmung der Aktivität und somit der Qualität der Probe sowie zur Berechnung der erforderlichen Verdünnung zum Einsatz bei der *in-situ* Hybridisierung, wurde 1 µl der Probe in einem Szintillationszähler gemessen. Die Messwerte lagen bei  $1 - 2,5 \cdot 10^6$  cpm/ µl.

#### 5.8.5.2 VORBEHANDLUNG DER SCHNITTE

Ausgesuchte, konsekutive Schnitte von Embryonen, verschiedener Entwicklungsstadien und von adulten Gehirnen, wurden vor der *in-situ* Hybridisierung mit diversen *antisense* RNA-Sonden nach folgender Tabelle vorbehandelt.

**TAB.: 13**      **VORBEHANDLUNG DER SCHNITTE**

Entwachsen	2 x 15 min	Xylol
Rehydrieren	2 x 5 min	100 % Ethanol
Rehydrieren	5 min	70 % Ethanol
Rehydrieren	3 min	DEPC-H <sub>2</sub> O
Rehydrieren	3 min	PBS/DEPC
Postfixation	20 min	4 % PFA/PBS, auf Eis
Waschen	2 x 5 min	PBS/DEPC
Gewebeporosität erhöhen	7 min	20 µg/ml ProteinaseK in ProteinaseK-Puffer
Waschen	5 min	PBS/DEPC
Postfixation	20 min	4 % PFA/PBS, auf Eis
Waschen	5 min	PBS/DEPC
Acetylierung Neutralisation basischer Proteine, Absättigung unspezifischer Bindestellen	10 min	200 ml 0,1 M TEA (pH8) (Triethanolamine-HCl) 600 µl Acetanhydrid tropfenweise unter rühren zugeben
Waschen	2 x 5 min	2xSSC
Dehydrieren	1 min	60 % Ethanol/DEPC
Dehydrieren	1 min	70 % Ethanol/DEPC
Dehydrieren	1 min	95 % Ethanol/DEPC
Dehydrieren	1 min	100 % Ethanol
Trocknen	30 min	staubfrei

**5.8.5.3**      **HYBRIDISIERUNG DER SCHNITTE**

Die Schnitte wurden mit Hybridisierungspuffer benetzt und in einer feuchten Kammer, deren Boden mit einer Lösung aus 50% Formamid in 4 x SSC bedeckt war bei 65°C prähybridisiert. Nach 60 min wurde das Deckgläschen entfernt und die Schnitte mit 100µl Hybridisierungspuffer, der 70.000cpm/µl <sup>35</sup>S markierte, bei 95°C denaturierte Ribosonde enthielt, bedeckt und erneut mit einem Deckgläschen belegt. Die Hybridisierung der antisense RNA an die endogene mRNA erfolgte ü.N. bei 65°C in der feuchten Kammer.

#### 5.8.5.4 NACHBEHANDLUNG DER SCHNITTE

Die in folgender Tabelle beschriebene Nachbehandlung der hybridisierten Schnitte dient zur Entfernung unspezifisch gebundener (Oxidation der Disulfide mit DTT) und überschüssiger Riboprobe (RNaseA-Verdau) in Waschpuffern, deren Stringenz mit abnehmender SSC-Konzentration zunimmt, und zur Dehydrierung.

**TAB.: 14 NACHBEHANDLUNG DER SCHNITTE**

4 x 5 min	Rt	4xSSC
20 min	37 °C	NTE (20µg/ml RNaseA)
2 x 5 min	Rt	2 x SSC/1 mM DTT
10 min	Rt	1 x SSC/1 mM DTT
10 min	Rt	0,5 x SSC/1mM DTT
2 x 30 min	64 °C	0,1 x SSC/1 mM DTT
2 x 10 min	Rt	0,1 x SSC
1 min	Rt	30 % Ethanol in 300 mM NH <sub>4</sub> OAc
1 min	Rt	50 % Ethanol in 300 mM NH <sub>4</sub> OAc
1 min	Rt	70 % Ethanol in 300 mM NH <sub>4</sub> OAc
1 min	Rt	95 % Ethanol
2 x 1 min	Rt	100 % Ethanol
30 min	Rt	staubfrei trocknen

#### 5.8.5.5 BESCHICHTEN MIT FILMEMULSION UND ENTWICKELN DER OBJEKTTRÄGER

Ein Autoradiographiefilm (Kodak; Biomax, Kat.-Nr.: 870 1302) wurde mit den getrockneten Schnitten für 48 h exponiert und je nach Stärke des Signals die Expositionsdauer für die Photoemulsion bemessen. Die Objektträger wurden dünn mit Photoemulsion (Kodak; NTB-2, Kat.-Nr.: 165 4433) überzogen, ü.N. getrocknet und in einer Box mit Silica-Gelperlen im Dunkeln für 4 – 6 Wochen gelagert. Nach Ablauf dieser Expositionszeit wurden die Objektträger 3 – 4 min entwickelt (Kodak; Entwickler D19, Kat.-Nr.: Sigma P5670), 5 – 7 min. fixiert (Kodak; Fixierer, 197 1720), für 25 min. in Wasser gewaschen und getrocknet. Abschließend wurde die

Rückseite der Objektträger von der Photoemulsion gesäubert, die Schnitte nach Nissl (s. 5.8.4.1) gegengefärbt, dehydriert und aus Xylol in DPX eingedeckt.

### **5.8.6 DOKUMENTATION HISTOLOGISCHER ERGEBNISSE**

Hell- sowie Dunkelfeldmikroskopie an histologischen Schnitten auf Objektträgern und an Ganzkörperpräparaten wurden entweder mit dem Forschungsmikroskop: Zeiss, Axioplan 2 (Objektive 5x – 100x) und/oder mit dem Binokular-Mikroskop: Zeiss, Stemi SV 6 (Planobjektiv S 1,0 x) durchgeführt. Weiterhin wurde das invertierte Mikroskop: Zeiss, Axiovert 200M und das Konfokale Mikroskop: Zeiss, LSM 510 Meta in der Fluoreszenzmikroskopie eingesetzt. Unter der Verwendung der Digital-kameras AxioCam MRC / HRC, unterstützt durch das Computerprogramm Axiovision 3.1; 4.0, wurden die Aufnahmen dokumentiert und anschließend in AdobePhotoshop (Versionen 4.0 ; 7.0) phototechnisch überarbeitet. Die Identifizierung und Benennung anatomischer Strukturen an den Präparaten erfolgte nach den Angaben in den histologischen Atlanten von (KAUFMANN, 1992; DREWS, 1993; SCHAMBRA ET AL.,1992; ALTMANN UND BAYER,1995; ALVAREZ-BOLADO UND SWANSON,1996; FRANKLIN UND PAXINOS ,1997; JACOBOWITZ UND ABBOTT ,1998).

### **5.9 MANIPULATION DES MAUSEMBRYOS**

Um die Mausmutante zu generieren die *mPet-1* im *En-1* Locus ektopisch exprimiert wurde der in 3.4.2 beschriebene *Targeting*-Vektor benutzt.

Alle Zellkultur-Arbeiten und Manipulationen an Embryonen wurden nach in Fachbüchern zusammengefassten Protokollen von JOYNER (ED. 1993); HOGAN ET AL., 1994 durchgeführt.

#### **5.9.1 KULTIVIERUNG UND MANIPULATION EMBRYONALER STAMMZELLEN (ES-ZELLEN) DER MAUS**

Pluripotente ES-Zellen repräsentieren die innere Zellmasse von Blastocysten (MARTIN, 1981; EVANS UND KAUFMAN, 1981) und verfügen über die Fähigkeit sich sowohl in vitro als auch in vivo in divergente Zelltypen zu differenzieren. Es ist aber möglich ES-Zellen im undifferenzierten Stadium zu kultivieren. Damit die ES- Zellen ihre pluripotenten Eigenschaften beibehalten, werden sie in speziell konditionierten

Medien, die Buffalo-Rat-Liver (BRL)-Zellen (SMITH UND HOOPER, 1987) oder wie in dieser Arbeit verwendet, Leukämie-Inhibierungsfaktor (LIF) (WILLIAMS ET AL., 1988; SMITH ET AL., 1988) enthalten, auf sogenannten *Feederzellen* (s. folgenden Abschnitt), bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> und 100% Luftfeuchtigkeit kultiviert. Weiterhin wurden die ES-Zellen jeden zweiten Tag vereinzelt und verdünnt ausgesät um eine Differenzierung zu verhindern. Bringt man die genetisch manipulierten ES-Zellen durch Injektion in Blastocyten oder durch Aggregation mit Morulae zurück in den Embryo, so können sich diese Zellen an der Entwicklung aller Organe einschließlich der Gonaden beteiligen. Nachdem diese frühen Embryonen in den Uterus von scheinsschwangeren Ammenmüttern transferiert werden entstehen Chimären. Bei Keimbahnchimären werden auch Nachkommen geboren deren Genotyp dem Genotyp der genetisch veränderten ES-Zellen entspricht. In dieser Arbeit wurden zur Generierung der *mPet-1* Mutanten ES-Zellen der Linie TBV2, eine 129/Sv Sublinie, (ETABLIERT VON DR. V. BLANQUET) verwendet

### **5.9.2 PRÄPARATION UND KULTIVIERUNG VON FEEDERZELLEN**

*Feederzellen* sind mitotisch inaktivierte Fibroblasten (MARTIN, 1981; DOETSCHMANN, 1985). Primäre, Neomycin resistente Fibroblasten wurden von Mausembryonen der transgenen Linie C57BL/6J-TgN (pPGK Neo bpA) 3Ems (JACKSON LABORATORIES, SIMPSON EM.O.) im Alter E14,5 – E16,5 unter sterilen Bedingung präpariert, in Kultur gebracht und anschließend in 1ml Aliquots im flüssigen Stickstoff gelagert. Zur Herstellung von *Feederzellen* wurden die Fibroblasten schnell bei 37°C aufgetaut, in 10 ml DMEM aufgenommen und 5 min bei 1000 xg zentrifugiert um das Einfriermedium zu entfernen. Das Zellpellet wurde in 10 ml DMEM resuspendiert. Je 2 ml Zellsuspension wurde auf eine 13,2 cm Zellkulturschalen mit 25 ml Medium verteilt und bis zur Konfluenz kultiviert. Zur Teilungsinaktivierung wurden die Fibroblasten 2,5 h mit MitomycinC einer Konzentration von 1mg/ml Medium, behandelt. Anschließend wurden die kohärenten Zellen zweimal mit PBS gewaschen mit 7,5 ml Trypsin/EDTA vom Boden der Kulturschalen abgelöst, vereinzelt und in Waschmedium bei 1000 xg pelletiert. Nach der Resuspension der Zellen in Medium wurde die Zellzahl bestimmt. Je nach Bedarf wurden die *Feederzellen* in Schalen unterschiedlicher Größe in einer Konzentration von 2 – 2,5 · 10<sup>4</sup> / cm<sup>2</sup> ausplattiert. Die *Feederplatten* konnten am nächsten Tag verwendet werden und konnten bis zu 7 Tagen benutzt werden, wenn das Medium am vierten Tag erneuert wurde.

### 5.9.3 ELEKTROPORATION UND SELEKTION VON ES-ZELLEN

Die Elektroporation ist eine physikalische Methode zum Gentransfer. Durch kurze elektrische Impulse werden biologische Membranen oberhalb einer kritischen Feldstärke vorübergehend permeabilisiert ohne dass die Zellmembran und somit die Zelle zerstört wird. In dieser Phase erhöhter Permeabilität kann ein Stofftransport durch die Zellmembran stattfinden. ES-Zellen wurden nach Angaben von WURST UND JOYNER (1993) elektroporiert.

#### 5.9.3.1 VORBEREITUNG DER ES-ZELLEN ZUR ELEKTROPORATION

In Ampullen zu 1 ml und in flüssigen Stickstoff bei  $-170^{\circ}\text{C}$  aufbewahrte ES-Zellen wurden im Wasserbad bei  $37^{\circ}\text{C}$  aufgetaut. Das Einfriermedium wurde durch Zugabe von 9 ml Medium und Zentrifugation bei 1200 rpm für 5 min. entfernt. Das Zellpellet wurde in 5 ml ES-Zell-Medium resuspendiert und die ES-Zellen auf einer 6cm Feederplatte ausgesät. Nach 48 Stunden wurden die Zellen mit PBS gewaschen und 10 min. mit 1,5 ml Trypsin/EDTA bei  $37^{\circ}\text{C}$  vom Boden gelöst. Die Dissoziation der ES-Zellen erfolgte durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren in Trypsin/EDTA. Nachdem die Zellen gewaschen waren, wurden sie in ES-Zell-Medium resuspendiert und auf zwei 10 cm Feederplatten ausgesät (Verdünnung ca. 1 : 5). Nach weiteren 48 h Inkubation wurden die ES-Zellen geerntet, erneut dissoziiert, in PBS aufgenommen und ausgezählt.

#### 5.9.3.2 ELEKTROPORATION DES *MPET-1 TARGETING-KONSTRUKTES*

25  $\mu\text{g}$  *Targeting*-Vektor wurden mit 40 U des Restriktionsenzym *Sall* für 6h linearisiert. Das Restriktionsenzym wurde anschließend 15 min. bei  $70^{\circ}\text{C}$  zerstört, die DNA durch Ethanolpräzipitation aufgereinigt und in  $\text{H}_2\text{O}$  rehydriert. Zur Elektroporation wurden pro Küvette (BioRad, Kat.-Nr.: 165-2088) in einem Gesamtvolumen von 850  $\mu\text{l}$ , 20  $\mu\text{g}$  linearisierte Vektor-DNA und  $6 \cdot 10^7$  ES-Zellen eingesetzt. Das linearisierte *Targeting*-Konstrukt wurde bei 240 V und 500  $\mu\text{F}$  transfiziert. Die Werte für die Zeitkonstante betragen 7,9 – 9,2 ms und lagen somit im erwarteten Bereich. Nach der Elektroporation wurden die Zellen 15 min auf Eis gekühlt, vorsichtig in 40 ml Medium aufgenommen und auf vier Feederplatten verteilt.

### 5.9.3 SELEKTION MUTIERTER ES-ZELLKLONE

24 h nach der Elektroporation konnte mit der Positivselektion mutierter Klone durch Antibiotikabehandlung begonnen werden. Die Selektion mit dem Neomycin-Analogen Geneticin (G418) basiert auf der Expression des Neomycinresistenzgens nach erfolgter homologer Rekombination des *Targeting*-Vektors ins Genom. G418 wurde in einer Konzentration von 200 µg/ml Medium eingesetzt. Gangcyclovir (GANC) wurde erst 48 h nach der Elektroporation zur Negativselektion in einer Konzentration von 2 µM eingesetzt. Während der Selektionsphase von 10 Tagen wurde das Medium täglich gewechselt und Zelldebris entfernt. Überlebende Zellklone wurden unter dem Binokular-Mikroskop und in der Sterilbank mit einer Pipettenspitze in 96-Lochplatten, die pro Loch 30 µl PBS enthielten überführt.

### 5.9.4 KULTUR UND EXPANSION RESISTENTER ES-ZELLKLONE

Die so isolierten Zellklone wurden trypsiniert und in 96-Lochplatten, in 150 µl Medium auf *Feederzellen* ausgesät. Die ES-Zellen wurden alle 48 passagiert und je nach Zelldichte gar nicht, 1:2, 1:3 oder 1:4 verdünnt. Nachdem alle Klone ihres Wachstums entsprechend synchronisiert waren, wurden von jeder 96-Lochplatte 4 Replikplatten angelegt, indem die Zellen 1:4 auf zwei Feederplatten und zwei Gelatineplatte gesplittet wurden. 48 h nach der Passage wurden die auf Feederzellen kultivierten ES-Zellen in 30µl Trypsin/EDTA dissoziiert. Durch Zugabe von 70µl Kulturmedium wurde die Reaktion gestoppt und mit 100µl eiskaltem, 2 x Einfriermedium auf ein Gesamtvolumen von 200µl aufgefüllt. Diese Platten wurden in Zellstoff verpackt und somit langsam bei –80°C eingefroren.

### 5.9.5 ÜBERPRÜFUNG DER ES-ZELL-DNA AUF HOMOLOGE REKOMBINATION

Um genügend DNA für eine *Southern-Blot*-Analyse isolieren zu können, wurden die Gelatineplatten (s. vorigen Abschnitt) bis zur Konfluenz kultiviert. Nach zweimaligem Waschen mit PBS wurde 50 µl Lysispuffer, der 1mg/ml ProteinaseK enthielt, in jedes Loch gegeben. Danach wurden die Platten in einer feuchten Kammer ü.N. bei 55°C inkubiert. Die Isolierung der DNA erfolgte wie in 5.7.1.2 beschrieben. Homolog rekombinierte Klone wurden mit der externen 3'-Probe und der semiexternen 5'-Probe (TAB.: 7) identifiziert.

### 5.9.6 EXPANSION HOMOLOG REKOMBINierter ES-ZELLKLONE

Platten auf denen sich Zellklone befanden für die eine homologe Rekombination festgestellt wurde, wurden bei 37°C rasch aufgetaut und bei 1000 xg für 5 min zentrifugiert um das Einfriermedium zu entfernen. Mutierte Klone wurden auf eine frische 96-Loch-Feederplatte überführt. Die Duplikatplatte wurde weiterhin als Reserve bei -80 °C aufbewahrt. Jeder Klon wurde auf Feederplatten zunehmender Größe expandiert bis genügend Zellen für die Injektion in Blastocysten zur Verfügung standen, oder von einer 10cm Platte 4 Aliquots eingefroren werden konnten. Hierzu wurden die Zellklone in Trypsin/EDTA zu Aggregaten von 5-10 Zellen vereinzelt und abzentrifugiert. Die präzipitierten Zellen wurden in kaltem Kulturmedium resuspendiert und mit dem gleichen Volumenanteil an kaltem 2 x Einfriermedium gemischt. Je 1 ml dieser Suspension wurde in ein Kryoröhrchen abgefüllt. Danach wurden die Röhrchen in ein auf 4°C gekühltes mit Isopropanol gefülltes Gefäß gestellt und bei -80°C eingefroren. Das Isopropanol sollte gewährleisten, dass die Temperatur beim Einfrieren graduell um 1°C absank. Anschließend wurden die Röhrchen in Flüssig-Stickstofftank aufbewahrt.

### 5.9.7 BLASTOCYSTENINJEKTION UND EMBRYOTRANSFER

Für die Gewinnung von Blastocysten (E 3,5) wurden Weibchen des Stammes C57BL/6 hormonell superovuliert. Die Superovulation dient der Erhöhung der Anzahl an ovulierten Eizellen und erfolgt durch die Behandlung der Weibchen mit Analoga der gonadotropen Hormone follikelstimulierendes Hormon (FSH) und luteinisierendes Hormon (LH). Dadurch erhält man pro Tier mehr Eizellen, wodurch die Anzahl der verwendeten Spendertiere minimiert werden kann. Die Applikation der Hormone erfolgte durch intraperitoneale Injektion und begann stets um 12 Uhr mit einer Dosis von 7,5 I.E. *Pregnant Mare's Serum Gonadotropin* (PMSG, Intervet), um die Reifung der Follikel zu induzieren. 48 Stunden später, wurden die Spender-Weibchen mit 7,5 I.E. humanem Chorion Gonadotropin (hCG/Ovogest, Intervet) behandelt. Durch die Gabe von hCG sollte die Ovulation der Eizellen erreicht werden. Die mit PMSG und hCG behandelten Weibchen wurden einzeln mit einem Männchen des gleichen Stammes verpaart. Am nächsten Tag wurde geprüft, ob sich das Weibchen mit dem Männchen gepaart hat. Dies war anhand eines die Vagina verschließenden, festsitzenden weißlichen Pfropfes, einem geronnenem Sekret der beiden vorderen

Prostataloben, zu erkennen. Die Uteri schwangerer Weibchen wurden am Tag 3 post coitum präpariert und die Blastocysten mit M2-Medium herausgespült. Anschließend wurden die Blastocysten mit einer Kapillare des Mikromanipulators angesaugt und somit fixiert. Mit einer zweiten Kapillare wurden pro Blastocyste ca. 10-20 mutierte ES-Zellen in das Blastocoel injiziert. Von dort aus integrieren sie sich in die innere Zellmasse. Zum Embryotransfer wurden insgesamt zwei ES-Zellklone, in denen eine homologe Rekombination des *mPet-1 Targeting*-Vektors nachgewiesen werden konnte, in je 15 – 20 Blastocysten injiziert. Als Ammenmütter für den Embryotransfer dienten pseudoträchtige Weibchen des Stammes CD-1. Zur Einleitung einer Scheinschwangerschaft wurden diese Weibchen mit sterilen CD-1 Männchen, die nach HOGAN ET AL., (1994) vasktomiert wurden, verpaart. Für den Transfer wurde von lateral der Retroperitonealraum unter Narkose (nach Körpergewicht dosiert, i.d.R 0,25 ml einer Mischung aus 1 ml Ketamin 10%, 0,5 ml Rompun 2% und 8,5 ml isotonischer Kochsalzlösung) eröffnet und die Ovarien sowie der Uterus freigelegt. Die proximalen Schenkel des Uterus wurden mit einer dünnen Kanüle perforiert und die manipulierten Blastocysten mit einer Glaskapillare über diese Öffnung in den Uterus überführt. Die Operationswunde wurde schichtweise geschlossen und die Ammenmütter auf eine Wärmeplatte gelegt bis sie aus der Narkose aufwachten, um eine Unterkühlung zu verhindern. Um einer Austrocknung der Cornea und somit einer Erblindung der Maus vorzubeugen, wurden die Augen während der etwa 15 minütigen Operation mit NaCl 0,9% befeuchtet.

#### **5.9.8 AUFZUCHT DER *MPET-1* MUTANTEN**

Nach erfolgreicher Manipulation wurden 16 Tage nach dem Transfer Chimären geboren, die an ihrem braun-schwarz-gefleckten Fell zu erkennen waren. Zur Etablierung stabiler, heterozygot mutierter Mauslinien wurden die geschlechtsreifen männlichen Chimären im Alter von 8 Wochen mit C57BL/6 Weibchen verpaart. Keimbahntransmission war bei der *mPet-1* Mutanten an der braunen Fellfarbe zu erkennen weil bei den benutzten 129/SvJ ES-Zellen Agouti dominant vererbt wird. Jedoch musste die Transmission der Mutation in der F1-Generation durch Genotypisierung (s. 5.7.16) bestätigt werden, weil bei der Selektion der mutierten ES-Zellen eine Kontamination mit Wildtypzellen nicht zu 100% ausgeschlossen werden kann. Jungtiere wurden nach ca. 3 Wochen von dem Elternpaar nach Geschlecht getrennt und erhielten eine Kennnummer durch Ohrlochung. Zur Genotypisierung

wurde die DNA aus der Schwanzspitze der nummerierten Mäuse isoliert. Somit war jeder festgestellte Genotyp einer Maus zuzuordnen. Heterozygote Mäuse einer Generation wurden untereinander gekreuzt um homozygote Embryonen zu erhalten. Die phänotypische Analyse wurde sowohl an heterozygoten als auch an homozygoten Embryonen durchgeführt. Embryonen im gewünschten Stadium wurden der Mutter entnommen nachdem der Empfängniszeitpunkt durch die Kontrolle des Vaginalpfropfens festgelegt wurde. Für die Rückkreuzung auf einen reinen Hintergrund wurden Mäuse des Stammes C57BL/6 verwendet. Die weitere Haltung erfolgte wie unter 5.5 beschrieben.

## **5.10 KULTIVIERUNG UND TRANSFEKTION VON HEK-293 UND 3T3-ZELLEN**

Zu Transfektionsexperimenten wurden sowohl HEK-293-Zellen (GRAHAM ET AL., 1977) (ATCC-NR. CRL-1573), als auch die embryonale Fibroblastenlinie NIH/3T3 (JAINCHILL ET AL., 1969) verwendet. Die 293-Zelllinie ist eine permanente Linie primärer, humaner, embryonaler Nierenepithelzellen die mit Fragmenten des humanen Adenovirus Typ5 transformiert ist

### **5.10.1 KULTIVIERUNG DER ZELLEN**

Die im flüssigen Stickstoff gelagerten Zellen wurden bei 37°C aufgetaut in 5 ml Kulturmedium überführt und bei 1000 xg 5 min zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in Kulturmedium resuspendiert und die Zellen auf 3,5 cm Schalen ausgesät. Diese adhärent wachsenden Zelllinien wurden vor ihrer Konfluenz passagiert, indem sie erst mit PBS gewaschen und dann trypsiniert wurden. Nach 3 min wurde das doppelte Volumen an Medium hinzugegeben und somit die Dissoziation der Zellen gestoppt. Die Zellen wurden zentrifugiert, resuspendiert und in der gewünschten Konzentration ausgesät. Die Transfektion erfolgte am nächsten Tag.

### **5.10.2 CaCl<sub>2</sub> VERMITTELTE TRANSFEKTION VON HEK-293 ZELLEN**

Zur Transfektion der 293-Zellen wurde eine modifizierte Form der Kalziumphosphat-Transfektionsmethode (GRAHAM UND VAN DER EB, 1973) verwendet. Zellen die sich im Stadium exponentiellem Wachstums befanden wurden unmittelbar vor der Transfektion mit frischem Medium versorgt. Für eine 6 cm Kulturschale die etwa zu

40% konfluent war wurden 2 - 3 µg Plasmid-DNA eingesetzt. Die DNA wurde mit 439 µl Wasser und 61 µl einer 2,5 M CaCl<sub>2</sub>-Lösung kräftig durchmischt und tropfenweise zu 500 µl 2 x BBS gegeben. Nach vorsichtigem Schütteln und 30 sec Inkubation wurde der Ansatz gleichmäßig und flächendeckend in die Kulturschalen getropft und die Zellen für 24 h bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> und 100% Luftfeuchtigkeit inkubiert. Anschließend wurde am Fluoreszenzmikroskop festgestellt ob das mPet-1/Egfp Fusionsprotein im Zellkern sichtbar ist, und die F-Actin Gegenfärbung (s. 5.8.4.3) durchgeführt.

### **5.10.3 Transfektion von NIH/3T3-Zellen**

NIH/3T3-Zellen wurden mit Fugene6 (Roche, Kat.-N.:1814443) nach Herstellerangaben transient transfiziert. Am Vortag wurden  $3 \cdot 10^5$  Zellen auf einer 3,5 cm Kulturschale ausgesät. Zur Transfektion wurde 1 µg Plasmid DNA und 3 µl Fugene6 Reagenz eingesetzt. Nach 24 h wurde die Expression des mPet-1/Egfp Fusionsproteins dokumentiert, und die Zellen zur Proteinextraktion (s. 5.7.3) geerntet. Dieses Proteinextrakt wurde in der Western-Blot-Analyse (s. 5.7.5.3) als Positivkontrolle eingesetzt.

## 6 Anhang

---

### 6.1 ABKÜRZUNGEN

A	Adenin	DTT	Dithiotreitol
A	Ampere	dTTP	Desoxythymidin- triphosphat
Abb.	Abbildung	E	Embryonaltag
Ac	Acetat	EDTA	Etylendiamintetraacetat
Amp	Ampicillin	EGTA	Ethylenglykol-bis-(b- Aminoethylethet).N,N,N', N'-tertraacetat
ATP	Adenosintriphosphat	Ep	Elektroporation
Bp	Basenpaare	ES	Embryonale Stammzellen
Bq	Becquerel	et al	et alteres
BSA	<i>bovine serum albumin</i>	EtBr	Ethidiumbromid
bzw.	beziehungsweise	EtOH	Ethanol
C	Cytosin	F	Farad
°C	Grad Celsius	g	Erdbeschleunigung
cDNA	<i>copy DNA</i>	g	Gramm
Ci	Curie, 1 Ci = 3,7x10 <sup>10</sup> Bq	G	Guanin
Cpm	<i>counts per minute</i>	GOF	<i>gain of function</i>
d.h.	das heißt	gtt	guttas (Tropfen)
Da	Dalton	h	Stunde
dATP	Desoxyadenosin- triphosphat	i.d.R	in der Regel
dCTP	Desoxycytidin- triphosphat	I.E.	Internationale Einheiten
DEPC	Diethylpyrocarbonat	ISH	<i>in-situ</i> Hybridisierung
DGTP	Desoxyguanidin- triphosphat	Kbp	Kilobasenpaare
Dig	Digoxigenin	KDa	Kilodalton
DNA	Desoxyribonucleinsäure	ltr.	Liter
DNAse	Desoxyribonuklease	LB	Luria-Bertami Medium
dNTP	Desoxynukleosid- triphosphat	LIF	<i>Leukemia inhibiting factor</i>
		LOF	<i>loss of function</i>
		m	milli

μ	micro	RT	Raumtemperatur
M	Molarität	s.	<i>siehe</i>
MeOH	Methanol	SDS	Sodiumdodecylsulfat
MHO	<i>Mid-/Hindbrain Organizer</i>	sek	Sekunde
MHR	Mittel-/Hinterhirn-Region	sog.	sogenannt(e)
Min	<i>Minute</i>	T	Thymin
mRNA	<i>messenger-RNA</i>	Tab.	Tabelle
n	Probenanzahl	Tris	Trishydroxymethyl- aminoethan
n	nano		
Neo	Neomycin	tRNA	<i>transfer ribonucleic acid</i>
NP- 40	Nonidet-P 40	U	<i>unit(s)</i>
OD	Optische Dichte	UTR	<i>untranslated region</i>
p	pico	ü.N.	über Nacht
P	postnataler Tag	u.s.w.	und so weiter
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>	ü.T.	über Tag
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>	UV	Ultraviolett
		V	Volt
PEG	Polyethylenglykol	wt	Wildtyp
PFA	Paraformaldehyd	X-Gal	5-Brom-4-Chlor-3-indolyl- β-D-Galactopyranosid
pmol	picomol		
RACE	<i>rapid amplification of cDNA-ends</i>	z.B.	zum Beispiel
		z.T.	zum Teil
RNAse	Ribonuklease	ZNS	Zentrales Nervensystem
rpm	Umdrehungen pro Minute		
RT-PCR	Reverse Transkriptase PCR		
s.	<i>siehe</i>		
SDS	Sodiumdodecylsulfat		
sek	Sekunde		
sog.	sogenannt(e)		
T	Thymin		
Tab.	Tabelle		
Tris	Trishydroxymethyl- aminoethan		

## 6.2 SYMBOLE FÜR AMINOSÄUREN

<b>A</b>	Ala	Alanin	<b>M</b>	Met	Methionin
<b>C</b>	Cys	Cystein	<b>N</b>	Asn	Asparagin
<b>D</b>	Asp	Asparaginsäure	<b>P</b>	Pro	Prolin
<b>E</b>	Glu	Glutaminsäure	<b>Q</b>	Gln	Glutamin
<b>F</b>	Phe	Phenylalanin	<b>R</b>	Arg	Arginin
<b>G</b>	Gly	Glycin	<b>S</b>	Ser	Serin
<b>H</b>	His	Histidin	<b>T</b>	Thr	Threonin
<b>I</b>	Ile	Isoleucin	<b>V</b>	Val	Valin
<b>K</b>	Lys	Lysin	<b>W</b>	Trp	Tryptophan
<b>L</b>	Leu	Leucin	<b>Y</b>	Tyr	Tyrosin

Wissenschaftliche Fachbegriffe werden üblicherweise in kursiver Schrift dargestellt. In vielen Fällen haben englische Fachbegriffe die inzwischen unüblichen deutschen Begriffe aus der Fachliteratur verdrängt und werden daher in kursiver Schrift verwendet. Lateinische und griechische Termini des allgemeinen, wissenschaftlichen, deutschen Sprachgebrauchs sind in dieser Arbeit nicht besonders gekennzeichnet. *Gene* werden gemäß der Nomenklatur des *Human Genome Organization Gene Nomenclature Comitee* abgekürzt und kursiv geschrieben. Proteine werden ebenso wie die entsprechenden Gene abgekürzt aber nicht kursiv geschrieben. Die Aminosäuren werden im Einbuchstabencode angegeben. Chemische Elemente und Verbindungen sowie DNA modifizierende Enzyme (Restriktionsenzyme u.s.w.) werden mit ihren üblichen Symbolen abgekürzt.

## 7 DANKSAGUNGEN

---

An erster Stelle möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Wolfgang Wurst bedanken der mir mit der Aufnahme in seine Forschungsgruppe ermöglichte das faszinierende Gebiet der molekularen Neurogenetik und der Entwicklungsbiologie kennen zu lernen. Dankbar bin ich auch für die Überlassung dieses interessanten Themas seinen Ideenreichtum, seine Diskussionsbereitschaft und seine konstruktive Kritik, die mir immer wieder neue Perspektiven für die Durchführung dieser Arbeit aufgezeigt haben. Ebenso dankbar bin ich für die Freiräume in der Gestaltung und Durchführung der Forschungsarbeit die mein selbstständiges Denken und Handeln sowie meine Kreativität gefördert haben. Nicht zu vergessen wäre auch sein persönlicher Einsatz zu meiner finanziellen Unterstützung sowie die ausgezeichnete Ausstattung seiner Labore. Herrn Dr. J. Guimera i Vilaro danke ich für die gute Betreuung in allen molekularbiologischen Fragen. Frau Dr. D. Vogt Weisenhorn bin ich sehr dankbar für Ihre exzellente Betreuung in der morphologischen und histologischen Analyse und für zahlreiche, konstruktive Diskussionen die zur Schärfung meiner wissenschaftlichen Denkweise und Argumentationsfähigkeit wesentlich beigetragen haben. Darüber hinaus und vor allem danke ich Ihr für eine langjährige und außergewöhnlich gute Freundschaft. Mein Dank gilt auch Frau Prof. Dr. A. Schnieke und Herrn Prof. Dr. E. Grill für Ihre Bereitschaft meine Dissertation zu beurteilen und die Promotionsprüfung durchzuführen. Weiterhin gilt mein Dank Frau Dr. N. Prakash für das sorgfältige Korrekturlesen des Manuskriptes, Jens, Claude, Laure und Markus sowie allen anderen Wissenschaftlern in unserer Arbeitsgruppe für hilfreiche Diskussionen und Ratschläge. Den Technischen Assistentinnen, vor allem Susanne, Katja, Sava und Steffi möchte ich danken für die tatkräftige Unterstützung bei verschiedenen Experimenten. Bedanken möchte ich mich auch bei unseren Tierpflegerinnen Resi, Rosi und Monika für die gute Zusammenarbeit und für Ihre über das normale Maß hinausgehende Hilfsbereitschaft. Außerdem bedanke ich mich bei allen Mitgliedern unserer Arbeitsgruppe für die kollegiale und freundschaftliche Atmosphäre die ich nie als selbstverständlich betrachtet habe. Abschließend gilt mein Respekt und Dank all meinen Freunden, insbesondere Ernst und meinen Eltern, die mich während der Jahre Studiums und der Promotion uneingeschränkt unterstützt und bestärkt haben diesen Weg zu gehen.

## 8 LITERATUR

---

**ACAMPORA, D., MAZAN, S., LALLEMAND, Y., AVANTAGGIATO, V., MAURY, M., SIMEONE, A., AND BRULET, P. (1995):** Forebrain and midbrain regions are deleted in *Otx2*<sup>-/-</sup> mutants due to a defective anterior neuroectoderm specification during gastrulation. *Development* 121, 3279-3290.

**ACAMPORA D, AVANTAGGIATO V, TOURTOR F, SIMEONE A. (1997):** Genetic control of brain morphogenesis through OTX gene dosage requirement. *Development* 124, 3639-3650

**AITKEN A. R., TÖRK I. (1988):** Early development of serotonin-containing neurons and pathways as seen in wholemount preparations of the fetal rat brain. *J Comp Neurol.* 274, 32-47

**ALTMAN J., BAYER S. A (1995):** Atlas of prenatal rat brain development. *CRC Press, Inc.*, Boca Raton, Florida

**ALTMAN J., BAYER S. A (1997):** Development of the cerebellar system. *CRC Press, Inc.*, Boca Raton, Florida

**ALVAREZ-BOLADO G., SWANSON L. W. (1996):** Developmental brain maps: structure of embryonic rat brain. *Elsevier Science B. V.*, Amsterdam

**ANDERSON, S.A., EISENSTAT, D. D, SHI, L., RUBENSTEIN, J.L.R. (1997A):** Interneuron migration from basal forebrain to neocortex: dependence on *Dlx* genes. *Science* 278, 474-476.

**ANDERSON, S.A., QIU, M., BULFONE, A., EISENSTAT, D.D., MENESES J., PEDERSEN R., RUBENSTEIN J.L.R (1997B):** Mutations of the homeobox genes *Dlx-1* and *Dlx-2* disrupt the striatal subventricular zone and differentiation of late born striatal neurons. *Neuron* 19, 27-37.

**ANG, S. L., JIN, O., RHINN, M., DAIGLE, N., STEVENSON, L., AND ROSSANT, J. (1996):** A targeted mouse *Otx2* mutation leads to severe defects in gastrulation and formation of axial mesoderm and to deletion of rostral brain. *Development* 122, 243-252.

**BARTEL, F. O., HIGUCHI T., SPYROPOULOS D. D., (2000):** Mouse models in the study of ETS family of transcription factors. *Oncogene* 19, 6443-6454

**BILOVOCKY, N.A., ROMITO-DIGIACOMO, R.R., MURCIA, C.L., MARICICH, S.M. AND HERRUP, K. (2003):** Factors in the genetic background suppress the *engrailed-1* cerebellar phenotype. *J Neurosci.* 15; 23, 5105-5112.

**BIRNBOIM, H. C., DOLY, J. (1979):** A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucl. Acids Res.* 7, 1513-1523.

- BOADLE-BIBER, M., PHAN, T.H., (1987):** Involvement of calmodulin-dependent phosphorylation in the activation of brainstem tryptophan hydroxylase induced by depolarisation of slices or other treatments that raise intracellular free calcium levels. *Biochem. Pharmacol.* 36, 1174-1176
- BOUILLET, P., CHAZAUD, C., OULAD-ABDELGHANI, M., DOLLE, P., AND CHAMBON, P. (1995).** Sequence and expression pattern of the *Stra7* (*Gbx-2*) homeobox containing gene induced by retinoic acid in P19 embryonal carcinoma cells. *Dev. Dyn.* 204, 372-382.
- BRADLEY, A., HASTY, P., DAVIS A., RAMIREZ-SOLIS, R. (1992):** Modifying the mouse: design and desire. *Biotechnology* 10, 534-539.
- BRISCOE, J., SUSSEL, L., SERUP, P., HARTIGAN-O'CONNOR, D., JESSEL T. M., RUBENSTEIN J. L., ERICSON, J. (1999):** Homeobox gene *Nkx2.2* and specification of neuronal identity by graded *Sonic hedgehog* signalling. *Nature* 398, 622-627
- BROCCOLI, V., BONCINELLI, E., AND WURST, W. (1999):** The caudal limit of *Otx2* expression positions the isthmus organizer. *Nature* 401, 164-168.
- BRODSKI C., VOGT WEISENHORN D. M., SIGNORE M., SILLABER I., OESTERHELD M., BROCCOLI V., ACAMPORA D., WURST W., (2003):** Location and size of dopaminergic and serotonergic cell populations are controlled by the position of the midbrain-hindbrain organizer. *J. Neurosci.* 23, 4199-4207
- BURNETTE, W. N. (1981):** Western Blotting: Electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gels to unmodified nitocellulose and radiographic with antibody and radioiodinated protein. *A. Anal. Biochem.* 112, 195-203
- CALLAHAN C.A., THOMAS J. B., (1994):** Tau- $\beta$ -galactosidase, and axon targeted fusion protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 91, 5972-5976
- CARRERE, S., VERGER, A., FLOURENS, A., STEHELIN, D., DUTERQUE-COQUILLAUD, M. (1998):** Erg proteins, transcription factors of the Ets family, form homo, heterodimers and ternary complexes via two distinct domains. *Oncogene* 16, 3261-3268.
- CASAROSA, S., FODE, C., GUILLEMOT, F. (1999):** *Mash1* regulates neurogenesis in the ventral telencephalon. *Development* 126, 525-534.
- CASPARY, T., ANDERSON, K.V. (2003):** Patterning cell types in the dorsal spinal cord: what the mouse mutants say. *Nat Rev Neurosci* 4, 289-297.
- CHAKRABARTI, S.R. AND NUCIFORA, G. (1999):** The leukemia-associated gene TEL encodes a transcription repressor which associates with SMRT and mSin3A. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 264, 871-877.
- CHEN, H., LUN, Y., OVCHINNIKOV, D., KOKUBO, H., OBERG, K. C., PEPICELLI, C.V., GAN, L., LEE, B., JOHNSON, R.L., (1998):** Limb and kidney defects in *Lmx1b* mutant mice suggest an involvement of *Lmx1b* in human nail patella syndrome. *Nat. Genet.* 19, 51-55

**CHENG, L., CHEN, C., LUO, P., TAN, M., QUI, M., JOHNSON, R., MA, Q., (2003):** *Lmx1b*, *Pet-1*, and *Nkx2.2* coordinately specify serotonergic neurotransmitter phenotype. *J Neurosci.* 23, 9961-9967

**CHOMCZYNSKY P., SACCHI N. (1987):** Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate phenolchloroform extraction. *Anal. Biochem.* 162, 156-159.

**CHUNG C. T., NIEMELA S. L., MILER R. H. (1989):** One-step preparation of competent *Escherichia coli*: Transformation and storage of bacterial cells in the same solution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 86, 2172-2175.

**CRAVEN, S. E., LIM, K., ENGEL, J. D., DE SAUVAGE F., ROSENTHAL, A. (2003):** *Gata2* specifies serotonergic neurons downstream of sonic hedgehog. *Development* 131, 1165-1173

**CSABA. Z., CSERNUS, V., GERENDAI, I. (1998):** Intratesticular serotonin affects steroidogenesis in the rat testis. *J Neuroendocrinol.* 10, 371-376.

**DAGERLIND, A., FRIBERG, K., BEAN, A. J, HÖKFELD T.: (1992)** Sensitive mRNA detection using unfixed tissue: combined radioactive and non-radioactive in situ hybridization histochemistry. *Histochemistry* 98, 39-49

**DAHLSTRÖM, A., FUXE, K., (1964):** Evidence for the existence of monoamine-containing neurons in the central nervous system. I. Demonstration of monoamines in the cell bodies of brainstem neurons. *Acta Physiol. Scand.* 62 (Suppl. 232), 1-55

**DAVIDSON, R. J., PUTNAM K. M., LARSON, C. L., (2000):** Dysfunction in the neural circuitry of emotion regulation a possible prelude to violence. *Science* 289, 591-594

**DING, Y. Q., MARKLUND, U., YUAN, W., YIN, J., WEGMAN, L., ERICSON, J., DENERIS, E., JOHNSON, R. L., CHEN, Z. (2003):** *Lmx1b* is essential for the development of serotonergic neurons. *Nat. Neurosci.* 6, 933-938

**DITTMER, J., NORHHEIM, A. (1998):** Ets transcription factors and human disease. *J. Infect. Dis.,* 177, 1771-1772

**DOETSCHMAN, T. C., EISTETTER, H., KATZ, M., SCHMIDT, W., KEMLER, R. (1985):** The *in vitro* development of blastocyst-derived embryonic stem cell lines: formation of visceral yolk sac, blood islands and myocardium. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 87 27-45.

**DONALDSON, L. W., PETERSEN, J. M., GRAVES, B. J., MCINTOSH, L. P. (1994):** Secondary structure of the ETS domain places murine ETS-1 in the superfamily of winged helix turn helix DNA-binding proteins. *Biochemistry* 33, 13509-13516

**DONALDSON, L. W., PETERSEN, J. M., GRAVES, B. J., MCINTOSH, L. P. (1996):** Solution structure of the ETS domain from murine ETS-1: a winged-helix-turn-helix binding motif. *EMBO J.,* 15, 125-134

**DREWS, U. (1993):** Taschenatlas der Embryologie. *Georg Thieme Verlag, Stuttgart*

**DUNN, J. J., STUDIER, F. W. (1983):** Complete nucleotide sequence of bacteriophage T7 DNA and the locations of T7 genetic elements. *J. Mol. Biol.* 166 477-535.

**ERICKSON, J. D., EIDEN, L. E., HOFFMAN, B. J. (1992):** Expression, cloning of a reserpine-sensitive vesicular monoamin transporter. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 89, 10993-10997

**ERICSON, J., RASHBASS, P., SCHEDL, A., BRENNER-MORTON, S., KAWAKAMI, A., VAN HEYNINGEN, V., JESSELL, T.M., BRISCOE, J. (1997)** Pax6 controls progenitor cell identity and neuronal fate in response to graded Shh signaling. *Cell* 90,169-180.

**ERSPAMER, V. (1940):** Pharmacology of enteramin. I. Action of acetone extract of rabbit stomach mucosa on blood pressure and on surviving isolated organ. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Exp. Path. Pharmacol.*, 196, 343-365

**ERSPAMER, V., AND ASERO, B. (1952):** Identification of enteramin, the specific hormon of the enterochromaffine cell system, as 5-Hydroxytryptamin. *Nature* 169, 800-801

**ESSMANN, W. B. (1978):** Serotonin distribution in tissue and fluids. In: *Serotonin in Health and Disease, Vol.1 Availability, Localization, and Disposition* (W.B. Essman, Ed.), 421-447 Spectrum, New York

**EVANS, M. J., KAUFMANN, M. H. (1981):** Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos., *Nature* 292, 154-156

**FAVOR, J., SANDULACHE, R., NEUHAUSER-KLAUS, A., PRETSCH, W., CHATTERJEE, B., SENFT, E., WURST, W., BLANQUET, V., GRIMES, P., SPÖRLE, R., AND SCHUGHART, K. (1996):** The mouse *Pax2(1Neu)* mutation is identical to a human *PAX2* mutation in a family with renal-coloboma syndrome and results in developmental defects of the brain, ear, eye, and kidney. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, 93, 13870-13875.

**FLOSS, T., ARNOLD, H. H., AND BRAUN, T. (1996):** *Myf-5(m1)/Myf-6(m1)* compound heterozygous mouse mutants down-regulate *Myf-5* expression and exert rib defects: evidence for long-range cis effects on *Myf-5* transcription. *Dev. Biol.* 174, 140-147.

**FRANKLIN, K. B. J., PAXINOS, G:** The mouse brain in stereotactic coordinates. *Academic Press, Inc.*, San Diego (1997).

**FRUNGIERI, M.B., GONZALEZ-CALVAR, S.I., RUBIO, M., OZU, M., LUSTIG, L., CALANDRA R.S. (1999):** Serotonin in golden hamster testes: testicular levels, immunolocalization and role during sexual development and photoperiodic regression-recrudescence transition. *Neuroendocrinology.* 69, 299-308.

**FYODOROV, D., NELSON, T., AND DENERIS, E. (1998):** *Pet-1*, a novel ETS domain factor that can activate neuronal *nAChR* gene transcription. *J. Neurobiol.* 34, 151-163.

**GALLAGHER, S., R. (1999):** *Current Protocols in Molecular Biology.* 10.2A.1-34. John Wiley and Sons Inc.,

- GARDA, A. L., ECHEVARRIA, D., AND MARTINEZ, S. (2001):** Neuroepithelial co-expression of *Gbx2* and *Otx2* precedes *Fgf8* expression in the isthmic organizer. *Mech. Dev.* 101, 111-118.
- GHOSH, A., AND KOLODKIN, A. L., (1998):** Specification of neural connectivity: ETS marks the spot. *Cell*, 95, 303-306
- GHYSDAEL, J., AND BOUREUX, A. (1997):** The Ets family of transcriptional regulators. In: *Oncogenes and transcriptional regulators*, M. Yaniv and J. Ghysdael, (eds). Vol. 1 *Birkhauser Verlag, Basel, Switzerland*, pp. 29-88
- GORIDIS, C., ROHRER, H. (2002):** Specification of catecholaminergic and serotonergic neurons. *Nat Rev Neurosci* 3, 531–541.
- GRAHAM, F.L., SMILEY, J., RUSSEL, W. C., NAIM, R., (1977):** Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J. Gen. Virol.* 36, 59-74
- GRAHAM, F.L., AND VAN DER EB, A. J. (1973):** Transformation of rat cells by DNA of human adenovirus 5. *Virology* 54, 536-539
- GRAHAM, F.L., AND VAN DER EB, A. J. (1973):** A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5. *Virology* 52, 456-467
- HANAHAH, D. (1983):** Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* 166, 557-560.
- HANAHAH, D. (1985):** Techniques for transformation of *Escherichia coli*. In: DNA cloning a practical approach. Glover, D.M (Hrsg.) *IRL Press, Oxford-Washington D.C.*
- HANKS M., WURST W., ANSON-CARTWRIGHT L., AUERBACH A. B., JOYNER A. L. (1995):** Rescue of the *En-1* mutant phenotype by replacement of *En-1* with *En-2*. *Science* 269, 679-682.
- HANSSON, S.S., MEZEY, E., AND HOFFMAN, B. J. (1998):** Serotonin transporter messenger RNA in the developing rat brain: early expression in serotonergic neurons and transient expression in non-serotonergic neurons. *Neuroscience* 83, 1185–1201.
- HENDRICKS, T. J., FRANCIS, N., FYODOROV, D., DENERIS, E., S. (1999):** The ETS domain factor *Pet-1* is an early and precise marker of central serotonin neurons and interacts with a conserved element in serotonergic genes. *J Neurosci* 19, 10348–10356.
- HENDRICKS, T. J., FYODOROV, D. V., WEGMAN, L. J., LELUTIU, N. B., PEHEK, E. A., YAMAMOTO, B., SILVER, J., WEEBER, E. J., SWEATT, J. D., DENERIS, E. S. (2003):** *Pet-1* ETS gene plays a critical role in 5-HT neuron development and is required for normal anxiety-like and aggressive behavior. *Neuron* 37, 233–247.
- HENRY, J. P., GASNIER, B., ROISIN, M. P., ISAMBERT, M. F., SCHERMAN, D. (1987):** Molecular pharmacology of the monoamin transporter of the chromaffin granule membrane. *Ann N. Y. Acad. Sci.*, 493, 194-206

- HYNES, M., ROSENTHAL, A. (1999):** Specification of dopaminergic and serotonergic neurons in the vertebrate CNS. *Curr Opin Neurobiol* 9, 26–36.
- HOGAN, B., BEDDINGTON, R., CONSTANTINI, F., LACY, E. (1994):** Manipulating the mouse embryo. A laboratory manual. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, New York
- HORNUNG, J.P. (2003):** The human raphe nuclei and the serotonergic system. *J Chem Neuroanat.* 26, 331-343
- IANOTTI, C. A., INOUE, H., BERNAL, E., AOKI, M., LIU, L., DONIS-KELLER, H., GERMAN, M. S., PERMUTT, M. A. (1997):** Identification of a human *LMX1* (*LMX1.1*)-related gene, *LMX1.2*: tissue-specific expression and linkage mapping on chromosome 9. *Genomics* 46, 520-524
- JACOBOWITZ, D. M., ABBOTT L. C. (1998):** Chemoarchitectonic atlas of the developing mouse brain. *CRC Press, Inc.*, Boca Raton, Florida
- JACOBS, B. L., AZMITIA, E. C. (1992):** Structure and function of the brain serotonin system. *Physiol. Rev.* 72, 165-229
- JAINCHILL, J., AARONSON S. A., TODARO, G. J. (1969):** Murine sarcoma and leukemia viruses: assay using clonal lines of contact inhibited mouse cells. *J. Virol.*, 4, 549-553
- JESSELL, T.M. (2000):** Neuronal specification in the spinal cord: inductive signals and transcriptional codes. *Nat Rev Genet* 1, 20–29.
- JOHNSON, R.G. JR., (1988):** Accumulation of biological amines into chromaffin granules: a model for hormone and neurotransmitter transport. *Physiol Rev.* 68, 232-307.
- JOHNSON, R. L., TABIN, C. J. (1997):** Molecular models for vertebrate limb development. *Cell* 90, 979–990.
- JOYNER, A. L., LIU, A., AND MILLET, S. (2000):** *Otx2*, *Gbx2* and *Fgf8* interact to position and maintain a mid-hindbrain organizer. *Curr. Opin. Cell Biol.* 12, 736-741.
- JOYNER, A. L. ED.; JOYNER, A. L. (HRSG.) (1993):** Gene targeting. *Oxford University Press, Oxford*
- KANNER, B. I. UND SCHULDINER, S. (1987)** Mechanism of transport and storage of neurotransmitters. *CRC Crit Rev Biochem.* 22, 1-38. Review.
- KANNER, B. I. (1987):** Bioenergetics of Neurotransmitter transport. *Biochem. Biophys. Acta.* 726, 293-316
- KARIS, A., PATA, I., VAN DOORNINCK, J. H., GROSVELD, F., DE ZEEUW, C. I., DE CAPRONA, D., FRITZSCH, B. (2001):** Transcription factor *GATA-3* alters pathway selection of olivocochlear neurons and affects morphogenesis of the ear. *J Comp Neurol.* 22, 429, 615-30.

**KASSAVETIS, G. A., BUTLER, E. T., ROULLAND, D., CHAMBERLIN, M. J. (1982):** Bacteriophage SP6-specific RNA polymerase. *J. Biol. Chem.* 257 5779-5788.

**KAUFMAN, M. H. (1992):** The atlas of mouse development. *Academic Press Ltd.*, London

**KIM, D. G., KANG, H. M., JANG, S. K., SHIN, H. S. (1992):** Construction of a bifunctional mRNA in the mouse by using the internal ribosomal entry site of the encephalomyocarditis virus. *Mol Cell Biol.*, 12, 3636-43. *Erratum in: Mol Cell Bio*, 12, 4807.

**KIM, C.A., PHILLIPS, M.L., KIM, W., GINGERY, M., TRAN, H.H., ROBINSON, M.A., FAHAM, S., BOWIE, J.U. (2001):** Polymerization of the SAM domain of TEL in leukemogenesis and transcriptional repression. *EMBO J.* 20, 4173–4182.

**KLAMBT, C. (1993):** The *Drosophila* gene pointed encodes two ETS-like proteins which are involved in the development of the midline glial cells. *Development.*, 117, 163-176.

**KODANDAPANI, R., PIO, F., NI, C. Z., PICCIALI, G., KLEMSZ, M., MCKERCHER, S., MAKI, R. A., ELY, K. R., (1996):** A new pattern for helix-turn-helix recognition revealed by the PU.1 ETS-domain-DNA-complex. *Nature* 380, 456-460; *Erratum in Nature* (1998) 392, 630

**Krumlauf, R., Marshall, H., Studer, M., Nonchev, S., Sham, M. H., Lumsden, A. (1993):** Hox homeobox genes and regionalisation of the nervous system. *J Neurobiol.* 24, 1328-1340.

**KÜHN, D., M. AND LOVENBERG, M. (1982):** Role of calmodulin in the activation of tryptophan hydroxylase. *Fed. Proc.* 41, 2258-2264

**KÜHN, D., M. AND LOVENBERG, M. (1983):** Hydroxylases. In handbook of Neurochemistry (2nd Ed), Vol. 4, Enzymes in the nervous system (A. Lajtha, Ed.), 133-155, *Plenum Press, New York*

**LAEMMLI, U.K., (1970):** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685

**LAUDER, J.M., WALLACE, J.A., KREBS, H., PETRUSZ, P., MCCARTHY, K. (1982):** In vivo and in vitro development of serotonergic neurons. *Brain Res Bull.*, 9, 605-625.

**LAUDER, J. M., AND BLOOM, F., E. (1974):** Ontogeny of monoamine neurons in the locus coeruleus, Raphe nuclei and substantia nigra of the rat. I. Cell differentiation. *J Comp Neurol.*, 155, 469-81.

**LIANG,H., MAO, X., OLEJNICZAK, E. T., NETTESHEIM, D. G., YU, L., MEADOWS, R. P., THOMPSON, C. B., FESIK, S. W. (1994):** Solution structure of the Ets-domain of FLI-1 when bound to DNA. *Nat. Struct. Biol.*, 12, 871-875

- LIANG, H., OLEJNICZAK, E. T., MAO, X., NETTESHEIM, D. G., YU, L., THOMPSON, C. B., FESIK, S. W. (1994):** The secondary structure of the Ets-domain of human Fli-1 resembles that of the helix-turn-helix DNA-binding motif of *E. coli* catabolite activator protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 91, 11655-11659
- LEVITT, P., AND MOORE, R. Y. (1978):** Developmental organization of the raphe serotonin neuron groups in the rat. *Anat.Embryol. (Berl)*. 154, 241-251
- LOPEZ, R.G., CARRON, C., OURY, C., GARDELLIN, P., BERNARD, O. AND GHYSDAEL, J. (1999):** TEL is a sequence-specific transcriptional repressor. *J. Biol. Chem.*, 274, 30132–30138.
- LUCKI, I., (1998):.** The spectrum of behaviours influenced by serotonin. *Biol. Psychiatry* 44, 151-162
- LUMSDEN, A., KRUMLAUF, R. (1996):** Patterning the vertebrate neuraxis. *Science.*, 274, 1109-1115
- MAIRA, S.M., WURTZ, JM. AND WASYLYK, B. (1996):** Net (ERP/SAP2) one of the Ras-inducible TCFs, has a novel inhibitory domain with resemblance to the helix-loop-helix motif. *EMBO J.*, 15, 5849–5865.
- MANSOUR, S. L., THOMAS, K. R., CAPPECHI, M. R. (1988):** Disruption of the proto-oncogene *int-2* in mouse embryo-derived stem cells: a general strategy for targeting mutations into mice. *Nature*, 336 348-352.
- MARIN, O., ANDERSON, S.A., RUBENSTEIN, J.L.R. (2000):** Origin and molecular specification of striatal interneurons. *J Neurosci* 20, 6063–6076.
- MARCUSSON, J. O., ROSS, S., B. (1990):** Binding of some antidepressants to the 5-hydroxytryptamine transporter in brain and platelets. *Psychopharmacology (Berl).*;102, 145-155.
- MARIN, F. AND PUELLES, L. (1994):** Patterning of the embryonic avian midbrain after experimental inversions: a polarizing activity from the isthmus. *Dev. Biol.* 163, 19-37.
- MARTIN, G. R. (1981):** Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 78, 7634-7638.
- MARTINEZ, S., MARIN, F., NIETO, M. A., AND PUELLES, L. (1995):** Induction of ectopic engrailed expression and fate change in avian rhombomeres: intersegmental boundaries as barriers. *Mech. Dev.* 51, 289-303.
- MARTINEZ, S., WASSEF, M., AND ALVARADO-MALLART, R. M. (1991):** Induction of a mesencephalic phenotype in the 2-day-old chick prosencephalon is preceded by the early expression of the homeobox gene *En-1*. *Neuron* 6, 971-981.
- MARTINEZ, S. AND ALVARADO-MALLART, R. M. (1990):** Expression of the homeobox Chick-En-gene in chick/quail chimeras with inverted mes-metencephalic grafts. *Dev. Biol.* 139, 432-436.

- MARTINEZ, S., CROSSLEY, P. H., COBOS, I., RUBENSTEIN, J. L., UND MARTIN, G. R. (1999):** *Fgf-8* induces formation of an ectopic isthmic organizer and isthmo-cerebellar development via a repressive effect on *Otx2* expression. *Development* 126, 1189-1200.
- MAURER, P., T'SAS, F., COUTTE, L., CALLENS, N., BRENNER, C., VAN LINT, C., DE LAUNOIT, Y., BAERT, J., L. (2003):** FEV acts as a transcriptional repressor through its DNA-binding ETS domain and alanine-rich domain, *Oncogene* 22, 3319–3329.
- MAURER, P., RORIVE, S., DE KERCHOVE D'EXAERDE, A., SCHIFFMANN, S. N., SALMON, I., DE LAUNOIT, Y. (2004):** The Ets transcription factor *Fev* is specifically expressed in the human central serotonergic neurons. *Neurosci Lett.* 357, 215-218.
- McMAHON, A. P., JOYNER, A. L., BRADLEY, A., AND McMAHON, J. A. (1992):** The midbrain-hindbrain phenotype of *Wnt-1*<sup>-/-</sup> mice results from stepwise deletion of engrailed-expressing cells by 9.5 days postcoitum. *Cell* 69, 581-595.
- MEESSEN, H., OLSZEWSKY, J., (1949):** A Cytoarchitectonic Atlas of the rhombencephalon of the Rabbit. Karger, Basel, New York.
- MEYERS, E. N., LEWANDOSKI, M., AND MARTIN, G. R. (1998):** An *Fgf8* mutant allelic series generated by Cre-Flp-mediated recombination. *Nat. Genet.* 18, 136-141.
- MILLEN, K. J., WURST, W., HERRUP, K., JOYNER, A. L. (1994):** Abnormal embryonic cerebellar development and patterning of postnatal foliation in two mouse *Engrailed-2* mutants. *Development* 120, 695-706.
- MILLET, S., BLOCH-GALLEGO, E., SIMEONE, A., ALVARADO-MALLART, R.-M. (1996):** The caudal limit of *Otx2* gene expression as a marker of the midbrain/hindbrain boundary: a study using in situ hybridisation and chick / quail homotypic grafts. *Development* 122, 3785-3797.
- MILLET, S., CAMPBELL, K., EPSTEIN, D.J., LOSOS, K., HARRIS, E., JOYNER, A.L. (1999):** A role for *Gbx2* in repression of *Otx2* and positioning the mid/hindbrain organizer. *Nature* 401, 161-164.
- MIYOSHI, G., BESSHO, Y., YAMADA, S. AND KAGEYAMA, R. (2004):** Identification of a novel Basic Helix-Loop-Helix gene, *Heslike*, and its role in GABAergic neurogenesis. *J Neurosci* 7, 3672–3682
- NAKAMURA, H., TAKAGI, S., TOSHIKI, T., MATSUI, K. A., AND FUJISAWA, H. (1988):** The prosencephalon has the capacity to differentiate into the optic tectum: Analysis by chick-specific monoclonal antibodies in quail-chick chimeric brains. *Dev. Growth Differ.* 30, 717-725.
- NARDELLI, J., THIESSON, D., FUJIWARA, Y., TSAI, F. Y., ORKIN, S. H. (1999):** Expression and genetic interaction of transcription factors GATA-2 and GATA-3 during development of the mouse central nervous system. *Dev Biol.*, 210, 305-21
- NELSON, R. J., CHIAVEGATTO, S. (2001):** Molecular basis of aggression. *Trends Neurosci* 24, 713–719.

**NIEUWENHUYS, R. (1985):** Chemoarchitecture of the brain. *Springer Verlag, Berlin*

**NJUS, D., KELLEY, P. M., HARNADEK, G. J. (1986):** Bioenergetics of secretory vesicles. *Biochim Biophys Acta. 853, 237-65*

**OIKAWA, T., YAMATA, T. (2003):** Molecular biology of the ETS family of transcription factors. *Gene., 303, 11-34*

**OLSZEWSKI, J., BAXTER, D., (1954):** Cytoarchitecture of the Human Brain Stem. Karger, Basel.

**OLSON, E. N., ARNOLD, H. H., RIGBY, P. W., AND WOLD, B. J. (1996):** Know your neighbours: three phenotypes in null mutants of the myogenic bHLH gene *MRF4*. *Cell 85, 1-4.*

**O'NEILL, E.M., REBAY, I., TJIAN, R. AND RUBIN, G.M.: (1994):** The activities of two Ets-related transcription factors required for Drosophila eye development are modulated by the Ras/MAPK pathway. *Cell, 78, 137-147.*

**PANDOLFI, P. P., ROTH, M. E., KARIS, A., LEONARD, M. W., DZIERZAK, E., GROSVELD, F. G., ENGEL, J. D., LINDENBAUM, M. H. (1995):** Targeted disruption of the *GATA3* gene causes severe abnormalities in the nervous system and in fetal liver haematopoiesis, *Nat Genet., 11,40-44.*

**PAPAS, T. S., BHAT, N. K., SPYROPOULOS, D. D., MJAATVEDT, A. E., VOURNAKIS, J., SETH, A., WATSON, D. K., (1997):** Functional relationships among ETS gene family members. *Leukemia., 11 Suppl 3, 557-566*

**PATA, I., STUDER, M., VAN DOORNINCK, J. H., BRISCOE, J., KUUSE, S., ENGEL, J. D., GROSVELD, F., KARIS, A. (1999):** The transcription factor *GATA3* is a downstream effector of *Hoxb1* specification in rhombomere 4. *Development., 126, 5523-31*

**PATIENT, R. K., MCGEEH, J. D. (2002):** The *GATA* family (vertebrates and invertebrates) *Curr. Opin. Genet. Dev., 12, 416-422*

**PATTYN, A., SIMPLICI, N., VAN DOORNINCK, J.H., GORIDIS, C, GUILLEMOT, F., BRUNET, J.F. (2004):** *Ascl1/Mash1* is required for the development of central serotonergic neurons. *Nat Neurosci. 7, 589-595*

**PATTYN, A., VALLSTEDT, A., DIAS, J. M., SAMAD, O. A., KRUMLAUF, R., RIJLI, F. M., BRUNET J. F., ERICSON. J. (2003):** Coordinated temporal and spatial control of motor neuron and serotonergic neuron generation from a common pool of CNS progenitors. *Genes Dev 15, 729-737.*

**PETER, M., COUTURIER, J., PACQUEMENT, H., MICHON, J., THOMAS, G., MAGDELENAT, H., DELATTE, O. (1997):** A new member of the ETS family fused to EWS in Ewing tumors, *Oncogene 14, 1159-1164.*

**PFAAR, H., VON HOLST ,A., VOGT WEISENHORN, D. M., BRODSKI, C., GUIMERA, J., WURST, W.: (2002):** *mPet-1*, a mouse ETS-domain transcription factor, is expressed in central serotonergic neurons. *Dev. Genes. Evol. 212, 43-46.*

- PHAM, C. T., MACIVOR, D. M., HUG, B. A., HEUSEL, J. W., AND LEY, T. J. (1996):** Long range disruption of gene expression by a selectable marker cassette. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 93, 13090-13095.
- POTTER, M.D, BUIJS, A., KREIDER, B., VAN ROMPAEY, L., GROSVELD, G.C. (2000):** Identification and characterization of a new human ETS-family transcription factor, TEL2, that is expressed in hematopoietic tissues and can associate with TEL1/ETV6. *Blood* 95, 3341-3358.
- PRAKASH, N. UND WURST, W.: (2004):** Specification of midbrain territory. *Cell Tissue Res.*, 19 [in Druck]
- RAIBLE, F., AND BRAND, M. (2001):** Tight transcriptional control of the ETS domain factors Erm and Pea3 by Fgf signaling during early zebrafish development. *Mech Dev.* 107, 105-117
- RAO, V., OHNO, N.T., PRASAD, D.D., BHATTACHARYA, G., REDDY, E.S., (1993):** Analysis of the DNA-binding and transcriptional activation functions of human Fli-1 protein. *Oncogene* 8, 2167–2173.
- RAPPORT, M. M., GREEN, A. A., AND PAGE, I.H. (1948):** Crystallin serotonin. *Science* 108, 329-330
- RATTRAY, M., MICHAEL, G. J., LEE, J., WOTHERSPOON, G., BENDOTTI, C., PRIESTLEY, J. V. (1999):** Intraregional variation in expression of serotonin transporter mRNA by 5-hydroxytryptamin neurons. *Neuroscience* 21, 169-183
- RHINN, M. AND BRAND, M. (2001):** The midbrain / hindbrain boundary organizer. *Curr. Opin. Neurobiol.* 11, 34-42.
- RHINN, M., DIERICH, A., LE MEUR, M., AND ANG, S. (1999):** Cell autonomous and non-cell autonomous functions of *Otx2* in patterning the rostral brain. *Development* 126, 4295-4304.
- RIND, H. B., RUSSO, A. F., WHITTEMORE, S. R. (2000):** Developmental regulation of tryptophan hydroxylase mRNA expression and enzyme activity in the raphe and its target fields. *Neuroscience*, 101, 665-677
- RUBENSTEIN, J.L.R. (1998):** Development of serotonergic neurons and their projections. *Biol Psychiatry* 44,145-150
- RUGH, R. (1990):** The mouse. Its reproduction and development. *Oxford University Press*, Oxford
- SAMBROOK, J., FRITSCH, E. F., MANIATIS, T. (1989):** Molecular Cloning: A Laboratory Manual. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, 2nd Edition
- SASSE, J., GALLAGHER, S. R., (2000):** *Current Protocols in Molecular Biology* 10.6.1-13, John Wiley and Sons Inc.

**SAUER, B. (1993):** Manipulation of transgenes by site-specific recombination: use of Cre recombinase. *Methods Enzymol.* 225, 890-900.

**SCHAMBRA, U. B., LAUDER, J. M., SILVER, J. (1992):** Atlas of the prenatal mouse brain. *Academic Press, Inc.*, San Diego

**SGOURAS, D.N., ATHANASIOU, M.A., BEAL JR, G.J., FISHER, R.J., BLAIR, D.G. AND MAVROTHALASSITIS, G.J. (1995):** ERF: an ETS domain protein with strong transcriptional repressor activity, can suppress ets-associated tumorigenesis and is regulated by phosphorylation during cell cycle and mitogenic stimulation. *EMBO J.*, 14, 4781–4793.

**SHIMAMURA, K., HARTIGAN, D. J., MARTINEZ, S., PUELLES, L., RUBENSTEIN, J. L. R. (1995):** Longitudinal organization of the anterior neural plate and neural tube. *Development* 121, 3923-3933.

**SCHWARZ, M., ALVAREZ-BOLADO, G., URBANEK, P., BUSSLINGER, M., AND GRUSS, P. (1997):** Conserved biological function between *Pax-2* and *Pax-5* in midbrain and cerebellum development: evidence from targeted mutations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 94, 14518-14523.

**SCHWENK, F., BARON, U., AND RAJEWSKY, K. (1995):** A cre-transgenic mouse strain for the ubiquitous deletion of loxP-flanked gene segments including deletion in germ cells. *Nucleic Acids Res.* 23, 5080-5081.

**SETH, A., AND PAPAS, T. S. (1990):** The c-ets-1 protooncogene has oncogenic activity and is positively autoregulated. *Oncogene.*, 5, 1761-1767

**SHARROCKS, A.D., (2001):** The ETS-domain transcription factor family. *Nat. Rev. (Mol. Cell. Biol.)* 2, 827–837

**SHARROCKS, A.D., BROWN, A.L., LING, Y., YATES, P.R., (1997):** The ETS-domain transcription factor family. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 29, 1371–1387.

**SIMEONE, A. (2000):** Positioning the isthmus organizer where *Otx2* and *Gbx2* meet. *Trends Genet.* 16, 237-240.

**SIMEONE, A., ACAMPORA, D., MALLAMACI, A., STORNAIUOLO, A., D'APICE, M. R., NIGRO, V., AND BONCINELLI, E. (1993):** A vertebrate gene related to orthodenticle contains a homeodomain of the bicoid class and demarcates anterior neuroectoderm in the gastrulating mouse embryo. *EMBO J.* 12, 2735-2747.

**SMIDT, M. P., VAN SCHAIK, H. S., LANCTOT, C., TREMBLAY, J. J., COX, J. J., VAN DER KLEIJ, A. A., WOLTERINK, G., DROUIN, J., BURBACH, J. P. (1997):** A homeodomain gene *Pitx3* has highly restricted brain expression in mesencephalic dopaminergic neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 94, 13305-13310

**SMIDT, M. P., ASBREUK, C. H., COX, J. J., CHEN, H., JOHNSON, R. L., BURBACH, J. P. (2000):** A second independent pathway for development of mesencephalic dopaminergic neurons requires *Lmx1b*. *Nat Neurosci* 3, 337–341.

**SMITH, A. G., HOPER, M. L. (1987):** Buffalo rat liver cells produce a diffusible activity which inhibits the differentiation of murine embryonal carcinoma and embryonic stem cells. *Dev Biol.* 121, 1-9.

**SMITH, A. G., HEATH, J. K., DONALDSON, D. D., WONG, G. G., MOREAU, J., STAHL, M., ROGERS, D. (1988):** Inhibition of pluripotential embryonic stem cell differentiation by purified polypeptides. *Nature* 336, 688-690.

**SOUTHERN, E. M. (1975):** Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* 98, 503-517.

**STEINBUSCH, H. W. (1981):** Distribution of serotonin-immunoreactivity in the central nervous system of the rat-cell bodies and terminals. *Neuroscience* 6, 557-618.

**SUDA, Y., MATSUO, I., AIZAWA, S., (1997):** Cooperation between *Otx1* and *Otx2* genes in developmental patterning of rostral brain. *Mech. Dev.* 69, 125-141

**SUSSEL, L., MARIN, O., KIMURA, S., RUBENSTEIN, J.L.R. (1999):** Loss of *Nkx2.1* homeobox gene function results in a ventral to dorsal molecular respecification within the basal telencephalon: evidence for a transformation of the pallidum into the striatum. *Development* 126, 3359-3370.

**TABER, E., BRODAL, A., WALBERG, F., (1960):** The raphe nuclei of the brain stem in the cat. I. Normal topography and cytoarchitecture and general discussion. *J. Comp. Neurol.* 114, 161-187.

**TAMIR, H., AND GERSHON, M. D. (1990):** Serotonin-storing secretory vesicles. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 600, 53-67

**TANABE, Y., JESSELL, T. M (1996):** Diversity and pattern in the developing spinal cord. *Science* 274, 1115-1123.

**THEILER, K. (1989):** The house mouse. Atlas of embryonic development. *Springer Verlag*, New York

**TORK, I. (1990):** Anatomy of the serotonergic system. *Ann NY Acad Sci* 600, 9-34.

**TOWBIN, H., STAHELIN, T., GORDON, J., (1979):** Electrophoretic transfer form polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 76, 4350-4354

**TWAROG, B. M., AND PAGE, I. H. (1953):** Serotonin content of some mammalian tissues and urine and a method of its determination. *Am. J. Physiol.*, 175, 157-161

**VAAGE, S. (1969):** The segmentation of the neural tube in chick embryos (*Gallus domesticus*). A morphological, histochemical and autoradiographical investigation. *Ergeb. Anat. Entwicklungsgesch.* 41, 3-87

**VAN DOORNINCK, J.H., VAN DER WEES, J., KARIS A., GOEDKNEGT, E., ENGEL, J.D., COESMANS, M., RUTTEMAN, M., GROSVELD, F., DE ZEEUW, C.I. (1999):** GATA-3 is involved in the development of serotonergic neurons in the caudal raphe nuclei. *J Neurosci.* 19, RC12.

**WALTHER, D.J., BADER, M. (2003):** A unique central tryptophan hydroxylase isoform. *Biochem Pharmacol.* 66, 1673-1680.

**WALTHER, D.J., PETER, J.U., BASHAMMAKH, S., HORTNAGL, H., VOITS, M., FINK, H., BADER, M., (2003):** Synthesis of serotonin by a second tryptophan hydroxylase isoform. *Science.* 299, 76.

**WASSARMAN, K. M., LEWANDOSKI, M., CAMPBELL, K., JOYNER, A. L., RUBENSTEIN, J. L., MARTINEZ, S., AND MARTIN, G. R. (1997):** Specification of the anterior hindbrain and establishment of a normal mid/hindbrain organizer is dependent on *Gbx2* gene function. *Development* 124, 2923-2934.

**WASSEF, M., JOYNER, A. L. (1997):** Early mesencephalon/metencephalon patterning and development of the cerebellum. *Perspect Dev Neurobiol.* 5, 3-16.

**WASYLYK, B., HAGMAN, J., GUTIERREZ-HARTMANN, A., (1998):** Ets transcription factors: nuclear effectors of the Ras-MAP-kinase signaling pathway. *Trends Biochem. Sci.* 23, 213-216.

**WILLIAMS, R. L., HILTON, D. J., PEASE, S., WILLSON, T. A., STEWART, C. L., GEARING, D. P., WAGNER, E. F., METCALF, D., NICOLA, N. A., GOUGH, N. M. (1988):** Myeloid leukaemia inhibitory factor maintains the developmental potential of embryonic stem cells. *Nature* 336, 684-687.

**WILKINSON, J. W.: (1992)** Whole mount in situ hybridization of vertebrate embryos. In: Wilkinson DG (ed) In situ hybridization: a practical approach. IRL Press, Oxford, 75-83

**WURST, W., JOYNER A. L. (1993):** Production of targeted embryonic stem cell clones. In Gene Targeting. A practical approach. Joyner A. L. (Ed.) IRL Press, Oxford

**WURST W., AUERBACH A. B., JOYNER A. L. (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.

**WURST, W. AND BALLY-CUIF, L. (2001):** Neural plate patterning: upstream and downstream of the isthmic organizer. *Nat. Rev. Neurosci.* 2, 99-108.

**YE, W., SHIMAMURA, K., RUBENSTEIN, J. L., HYNES, M. A., ROSENTHAL, A. (1998):** *FGF*, *Shh* signals control dopaminergic and serotonergic cell fate in the anterior neural plate. *Cell* 93, 755-766.

**YEUNG, K. C., INOSTROZA J. A., MERMELSTEIN, F. H., REINBERG, D. (1994):** Structure-function analysis of the TBP-binding protein Dr1 reveals a mechanism for repression of class II gene transcription. *Genes Dev.* 8, 1033-1048

**ZHANG, X., BEAULIEU, J.M., SOTNIKOVA, T.D., GAINETDINOV, R.R., CARON, M.G. (2004):** Tryptophan hydroxylase-2 controls brain serotonin synthesis. *Science*. 305, 217.

**ZIGMOND, M. J., BLOOM, F. E., LANDIS, S. C., ROBERTS, J. L., SQUIRE, L. R. (1999):** Fundamental Neuroscience. *Academic Press, San Diego*

**ZIMMER, A: (1992):** Manipulating the genome by homologous recombination in embryonic stem cells. *Annu. Rev. Neurosci.* 15, 115-137.