

# Untersuchung der Expression und Funktion des Tac2 Gens in der Maus

## Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von

**Celia Ribeiro Duarte**

aus Neuss am Rhein

Bonn 2006

Angefertigt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen  
Fakultät der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn. Diese Disserta-  
tion ist auf dem Hochschulschriftenserver der ULB Bonn [http://hss.ulb.uni-  
bonn.de/diss\\_online](http://hss.ulb.uni-bonn.de/diss_online) elektronisch publiziert.

Erstgutachter: Prof. Dr. Andreas Zimmer

Zweitgutachter: Prof. Dr. Christa Müller

Tag der Promotion: 02.06.2007

Erscheinungsjahr 2007

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1	Das Nervensystem . . . . .	1
1.2	Neurotransmitter . . . . .	2
1.3	Neuropeptide . . . . .	2
1.3.1	Neuropeptidfamilien . . . . .	2
1.3.2	Synthese und Speicherung . . . . .	3
1.3.3	Cotransmission . . . . .	4
1.3.4	Inaktivierung . . . . .	4
1.4	Tachykinine . . . . .	5
1.4.1	Tachykininrezeptoren . . . . .	6
1.4.2	SP und NKA . . . . .	9
1.4.3	Neurokinin B . . . . .	10
1.5	Zielsetzung der Arbeit . . . . .	12
<b>2</b>	<b>Material</b>	<b>13</b>
2.1	Chemikalien . . . . .	13
2.2	Dialysemembran . . . . .	13
2.3	<i>E. coli</i> -Zellen . . . . .	13
2.4	Eindeckmedien . . . . .	14
2.5	Enzyme . . . . .	14
2.6	Kits . . . . .	14
2.7	Marker und Standards . . . . .	15

2.8	Tiere . . . . .	15
2.9	Objektträger . . . . .	15
2.10	Plasmide . . . . .	15
2.11	Sekundärantikörper . . . . .	16
2.12	Zellkulturmedien . . . . .	16
2.13	Sonstige Chemikalien . . . . .	17
<b>3</b>	<b>Methoden</b>	<b>19</b>
3.1	Molekularbiologische Grundtechniken . . . . .	19
3.2	Methoden im Umgang mit <i>E. coli</i> . . . . .	19
3.2.1	Kultivierung von <i>E. coli</i> . . . . .	19
3.2.2	Transformation von <i>E. coli</i> . . . . .	20
3.2.3	Vermehrung von Plasmid DNA in <i>E. coli</i> . . . . .	20
3.2.4	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i> . . . . .	20
3.3	Gelelektrophorese . . . . .	21
3.4	Gelextraktion von DNA-Fragmenten . . . . .	22
3.5	Sequenzierungen . . . . .	22
3.6	PCR . . . . .	22
3.7	RT-PCR . . . . .	24
3.8	Methoden im Umgang mit Primärantikörpern . . . . .	24
3.8.1	Lagerung des Kaninchen-Antiserum . . . . .	25
3.8.2	Ammoniumsulfat-Fällung zur Aufreinigung des IgY Antikörpers . . . . .	25
3.8.3	Photometrische Bestimmung der Proteinkonzentration . . . . .	26
3.8.4	Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) . . . . .	26
3.8.5	Gelfärbung mit Coomassie . . . . .	27
3.9	Entnahme und Aufbereitung von Gewebe . . . . .	28
3.9.1	Kryopräparate für die Immunhistochemie . . . . .	28
3.9.2	Paraffinpräparate für die Immunhistochemie . . . . .	29

3.10	Immunhistochemische Färbung . . . . .	30
3.10.1	Präadsorption . . . . .	33
3.11	<i>In situ</i> -Hybridisierung . . . . .	33
3.11.1	Klonierung von cDNA-Fragmenten . . . . .	33
3.11.2	Herstellung von Ribosonden für die <i>In situ</i> -Hybridisierung .	34
3.11.3	<i>In situ</i> -Hybridisierung mit DIG-markierten Sonden . . . . .	34
3.12	Zellkultur . . . . .	38
3.12.1	Gewinnung von embryonalen Maus-Fibroblasten . . . . .	39
3.12.2	Passagieren und Einfrieren von Maus-Fibroblasten . . . . .	40
3.12.3	Kultivierung von Maus-Fibroblasten . . . . .	40
3.12.4	Mitotische Inaktivierung von Maus-Fibroblasten . . . . .	41
3.12.5	Kultivierung von embryonalen Stammzellen . . . . .	41
3.12.6	Auftauen von ES-Zellen . . . . .	41
3.12.7	Elektroporation der ES-Zellen . . . . .	42
3.12.8	Isolierung rekombinanter ES-Zellklone . . . . .	43
3.12.9	DNA-Präparation aus rekombinanten Zellklonen . . . . .	43
3.13	<i>Southern blots</i> . . . . .	44
3.14	Karyotypbestimmung . . . . .	46
3.15	Generierung chimärer Mäuse . . . . .	47
<b>4</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>48</b>
4.1	Immunhistochemie und <i>In situ</i> -Hybridisierung zur Untersuchung der Expression von NKB im Gehirn von Ratten und Mäusen . . .	48
4.1.1	Auswahl der Primärantikörper und Überprüfung ihrer Spe- zifität . . . . .	48
4.1.2	Spezifität der <i>In situ</i> -Sonden . . . . .	57
4.1.3	Expressionsmuster von NKB und NK3 in Gehirnen von Mäusen . . . . .	59
4.1.4	Übereinstimmende Projektionssysteme in Mäusen und Ratten	61
4.1.5	Unterschiede in Projektionssystemen von Mäusen und Ratten	63

4.1.6	Vergleich der pep2-IR und des NK3-Genexpressionsmusters in Mäusen und Ratten . . . . .	65
4.2	Tac2- und NK3-Genexpression in peripheren Geweben von Mäusen	67
4.3	Deletion des Tac2 Gens in der Maus . . . . .	71
4.3.1	Konstruktion eines <i>Targeting</i> -Vektors . . . . .	72
4.3.2	Elektroporation und chimäre Tiere . . . . .	77
4.3.3	Karyotypbestimmung mit ES-Zellen . . . . .	81
<b>5</b>	<b>Diskussion</b>	<b>85</b>
5.1	Primärantikörper . . . . .	85
5.2	Expressionsmuster von NKB und NK3 in Gehirnen von Ratten und Mäusen . . . . .	88
5.3	Tac2- und NK3-Genexpression in peripheren Geweben von Mäusen	93
5.4	Deletion des murinen Tac2 Gens . . . . .	97
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>100</b>
<b>7</b>	<b>Anhang</b>	<b>108</b>
7.1	Abkürzungsverzeichnis . . . . .	108
7.2	Aminosäurecode . . . . .	110

# Kapitel 1

## Einleitung

### 1.1 Das Nervensystem

Höher entwickelte Lebewesen benötigen übergeordnete, leistungsfähige Informations-, Koordinations- und Steuersysteme zur Aufnahme umweltbedingter oder im Körper entstehender Reize. Im tierischen bzw. menschlichen Organismus werden diese Aufgaben vom Nervensystem und vom hormonalen System übernommen. Das Nervensystem wandelt Reize in nervöse Erregungen um, leitet diese weiter und verarbeitet sie. Es koordiniert und steuert Körperfunktionen durch Impulse, die vom Zentrum zur Peripherie abgegeben werden und beeinflusst geistige und psychische Vorgänge (Mutschler, 1996). Nach anatomischen und funktionellen Gesichtspunkten unterscheidet man zwischen dem Zentralnervensystem (ZNS), zu dem Gehirn und Rückenmark gezählt werden, und dem peripheren Nervensystem, das die Leitungsbahnen von der Peripherie zum ZNS (afferente, sensorische Bahnen) und vom ZNS zur Peripherie (efferente, motorische Bahnen) umfasst. Eine weitere Gliederung ist die Unterteilung in das autonome (vegetative) und das somatische (willkürliche) Nervensystem mit jeweils einem zentralen und einem peripheren Teil. Das Nervengewebe, aus dem sich das Nervensystem zusammensetzt, besteht aus Nervenzellen (Neuronen) und Neuroglia. Die Informationsaufnahme, -verarbeitung und -übermittlung wird hauptsächlich von den Nervenzellen übernommen. Physiologische Rezeptoren

wandeln physikalische und chemische Reize in Aktionspotentiale um und leiten sie in Form einer Abnahme des Membranpotentials entlang des Axons weiter zur Synapse, dem eigentlichen Ort der Informationsübertragung (Mutschler, 1996). An der Synapse einlaufende Aktionspotentiale lösen an der präsynaptischen Membran die Freisetzung von chemischen Überträgerstoffen (Neurotransmitter) aus Vesikeln aus.

## 1.2 Neurotransmitter

Neurotransmitter werden in Neuronen synthetisiert. Sie liegen präsynaptisch vor und werden in genügend grosser Menge freigesetzt, um eine bestimmte Wirkung am postsynaptischen Neuron oder am Effektororgan hervorzurufen. Wird die Substanz in entsprechender Konzentration exogen verabreicht, ahmt sie die Wirkung eines endogen freigesetzten Neurotransmitters exakt nach (das heißt sie aktiviert in der postsynaptischen Zelle die gleichen Ionenkanäle oder *second messenger*-Systeme). Neurotransmitter werden durch einen spezifischen Mechanismus (zum Beispiel enzymatischer Abbau und/oder Wiederaufnahme) aus dem synaptischen Spalt entfernt (Kandel *et al.*, 1995).

Zu den Neurotransmittern gehören Acetylcholin, biogene Amine (Dopamin, Noradrenalin, Adrenalin, Serotonin und Histamin), Aminosäuren (Glutaminsäure, Asparaginsäure, Gamma-Aminobuttersäure (GABA), Glycin), Neuropeptide (Opioide, Peptide der Neurohypophyse, Tachykinine, Sekretine, Insuline, Somatostatine, Gastrine), Adenosintriphosphat (ATP) und Adenosin (Mutschler, 1996).

## 1.3 Neuropeptide

### 1.3.1 Neuropeptidfamilien

Viele kurzkettige Peptide sind in Nervenzellen pharmakologisch aktiv. Dabei sind die Wirkungsmechanismen sehr unterschiedlich. Neuropeptide wirken hemmend oder erregend oder können am Zielorgan auch beide Wirkungen auslösen.



Manche Peptide, wie zum Beispiel Oxytocin, Vasopressin, Somatostatin oder das luteinisierende Hormon, wurden bereits früher als Hormone mit bekannten Zielen ausserhalb des Gehirns oder als Produkt neuroendokriner Sekretion identifiziert (Burbach *et al.*, 2001; Lohmeier, 2003; Guillemin, 2005). Zusätzlich zu ihrer Wirkung als Hormon fungieren Neuropeptide wie die Tachykinine auch als Neurotransmitter (Pennefather *et al.*, 2004; Maggi, 2000, Kandel *et al.*, 1995). Neuropeptide werden auch als Neuromodulatoren bezeichnet, wenn sie ihre Wirkung indirekt durch die Aktivierung von *second messenger*-Systemen erzielen und nicht wie die klassischen niedermolekularen Transmitter durch Wechselwirkung mit Ligand-gesteuerten Ionenkanälen (Sossin *et al.*, 1989).

Typisch für Neuropeptide ist eine Gruppierung in Familien. Die Mitglieder der einzelnen Familien enthalten jeweils Bereiche mit ähnlicher Aminosäuresequenz. Zu den Hauptfamilien zählen zum Beispiel Opiode ( $\beta$ -Endorphin, Enkephaline, Dynorphine), Peptide der Neurohypophyse (Vasopressin, Oxytocin) und Tachykinine (Substanz P, Neurokinin A, Neurokinin B) (Akil *et al.*, 1998; Kesteren *et al.*, 1992; Hoyle 1998).

### 1.3.2 Synthese und Speicherung

Niedermolekulare Neurotransmitter werden in Neuronen synthetisiert, gespeichert und bei Bedarf freigesetzt (Mutschler, 1996; Kandel *et al.*, 1995). Die Neuropeptide dagegen werden durch Transkription der entsprechenden genomischen DNA-Sequenz in mRNA und durch anschliessende Translation an den Ribosomen hergestellt. Das entstehende Prä-Pro-Peptid trägt eine Signalsequenz, die bereits im Lumen des endoplasmatischen Retikulums abgespalten wird (Pennefather *et al.*, 2004). Die weitere Prozessierung des so entstandenen Pro-Proteins findet dann im Golgi-Apparat statt. Angriffspunkte für endoproteolytische Spaltung sind dabei häufig Lys-Arg- oder Arg-Arg-Sequenzen (Sossin *et al.*, 1989). Im Trans-Golgi-Bereich werden Neuropeptide in große elektronenoptisch dichte Vesikel verpackt und axonal zur Synapse transportiert (Sossin *et al.*, 1989). Für viele Neuropepti-

de, wie zum Beispiel auch für die Tachykinine, ist noch nicht geklärt, ob sie als Pro-Peptid in Vesikeln gespeichert und dort bei Bedarf zum eigentlichen Neuropeptid umgewandelt werden, oder ob das eigentliche Peptid hergestellt wird und es erst danach in Vesikeln gespeichert und axonal zur Synapse transportiert wird (Munekata, 1991, Sossin *et al.*, 1989).

### 1.3.3 Cotransmission

In einem Neuron können gleichzeitig mehrere Neuropeptide oder Neuropeptide und niedermolekulare Neurotransmitter vorliegen. Bei gleichzeitiger Freisetzung können sich die Wirkungen der einzelnen Neurotransmitter verstärken oder aufheben (Kandel *et al.*, 1995).

So liegt das Neuropeptid CGRP (*calcitonin gene related peptide*) in spinalen Motoneuronen zusammen mit Acetylcholin vor (Laufert und Changeux, 1989). Acetylcholin aktiviert in diesem Fall nicotinische Acetylcholinrezeptoren der Skelettmuskulatur. CGRP hingegen aktiviert nach der Bindung an den CRLR/RAMP-Komplex die Adenylatcyclase, wodurch der cAMP-Spiegel und die cAMP-abhängige Proteinphosphorylierung steigen (Conner *et al.*, 2004; Cueille und Garel, 2004). Eine erhöhte Proteinphosphorylierung im Muskel führt wiederum zur Steigerung der Kontraktionskraft (Rossi *et al.*, 2003).

### 1.3.4 Inaktivierung

Die rechtzeitige Entfernung des Neurotransmitters aus dem synaptischen Spalt ist für die synaptische Übertragung von großer Bedeutung. Mögliche Mechanismen der Inaktivierung sind Diffusion, enzymatischer Abbau und Wiederaufnahme. Soweit es bisher bekannt ist, werden Neuropeptide hauptsächlich durch enzymatischen Abbau inaktiviert (Sossin *et al.*, 1989; Pennefather *et al.*, 2004). So ist für das Tachykinin Substanz P bekannt, dass es von drei Enzymen abgebaut wird: Dipeptidyl-Amino Peptidase, Post-Prolin-Endopeptidase und Cathepsin D (Severini *et al.*, 2002).

## 1.4 Tachykinine

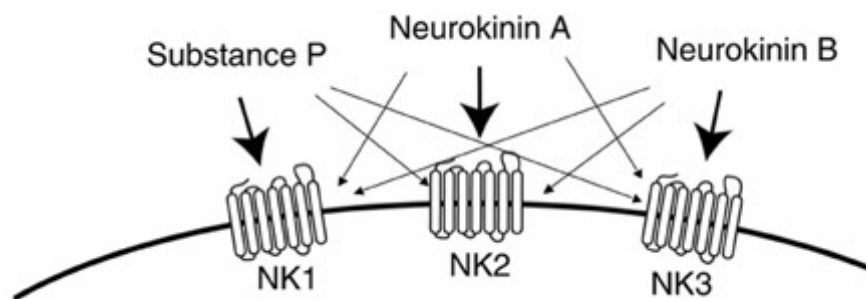
Von den Familien der Neuropeptide ist die der Tachykinine eine der größten. Bisher wurden bereits mehr als 40 Tachykinine aus Geweben von Invertebraten, Protochordaten und Vertebraten (Haut, Gastrointestinaltrakt, peripheres und zentrales Nervensystem) isoliert (Severini *et al.*, 2002, Pennefather *et al.*, 2004). Aus Geweben von Säugern konnten bis vor kurzem jedoch nur drei Tachykinine isoliert werden: Substanz P (SP), Neurokinin A (NKA) und Neurokinin B (NKB) (Beaujouan *et al.*, 2004). Das Gen *Tac1* codiert SP und NKA. NKB wird in Nagetieren wie Ratten oder Mäusen von *Tac2* und im Menschen von *Tac3* codiert (Page, 2004). Aufgrund ihres Vorkommens im Nervengewebe werden SP, NKA und NKB als Neurokinine bezeichnet (Page, 2004; Pennefather *et al.*, 2004). Sie zeichnen sich durch eine Kettenlänge von 10-11 Aminosäuren und die konservierte C-terminale Sequenz FXGLM-NH<sub>2</sub> aus. X steht dabei für eine hydrophobe Aminosäure, die entweder aromatisch oder in  $\beta$ -Position aliphatisch substituiert ist (Munekata 1991).

Substanz P	Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-Phe-Phe-Gly-Leu-Met-NH <sub>2</sub>
Neurokinin A	His-Lys-Thr-Asp-Ser-Phe-Val-Gly-Leu-Met-NH <sub>2</sub>
Neurokinin B	Asp-Met-His-Asp-Phe-Phe-Val-Gly-Leu-Met-NH <sub>2</sub>

Tabelle 1.1: **Vergleich der Sequenzen verschiedener Tachykinine**  
Darstellung nach Munekata, 1991

Diese hydrophobe Region ist von zentraler Bedeutung für die Aktivierung der drei Tachykininrezeptoren NK1 (Neurokinin 1 Rezeptor), NK2 (Neurokinin 2 Rezeptor) und NK3 (Neurokinin 3 Rezeptor). Außerdem tragen alle natürlich vorkommenden Tachykinine am C-terminalen Ende eine Amid-Gruppe, die ebenfalls wichtig für die biologische Aktivität zu sein scheint (Severini *et al.*, 2002). Daraus folgt, dass SP, NKA und NKB an allen Tachykininrezeptoren als

Agonisten wirken. Es bestehen jedoch Präferenzen, die wahrscheinlich durch die verschiedenen hydrophilen N-terminalen Sequenzen vermittelt werden. SP weist die höchste Rezeptorspezifität zu NK1, NKA zu NK2 und NKB zu NK3 auf (Hökfelt *et al.*, 2001; Page, 2004; Pennefather *et al.*, 2004; Maggi, 2000).



**Abb. 1.1: Schematische Darstellung des Tachykinin-Systems** Jedes Tachykinin weist hohe Affinität zu einem der Tachykininrezeptoren auf. Bei höheren Konzentrationen können sie aber auch andere Tachykininrezeptoren aktivieren

Erst im Jahr 2000 wurde eine neue Gruppe von Tachykininen und tachykininähnlichen Peptiden in Geweben von Ratte, Maus und Mensch entdeckt. Sie werden von Tac4 codiert und als Hemokinin und Endokinin bezeichnet. Im Gegensatz zu den Neurokininen werden diese Peptide vor allem in peripheren Geweben und Zellen des Immunsystems exprimiert (Page, 2004; Pennefather *et al.*, 2004).

#### 1.4.1 Tachykininrezeptoren

Die Tachykininrezeptoren gehören zu den membranständigen G-Protein gekoppelten Rezeptoren (Gether, 2000). Zu dieser Gruppe gehören zum Beispiel die Rezeptoren für Noradrenalin und Adrenalin, Dopamin-Rezeptoren, Histamin-Rezeptoren, Opioid-Rezeptoren und Prostaglandin-Rezeptoren (Flower, 1999; Fredriksson *et al.*, 2003). Nach der Einteilung von Attwood und Findlay (1994) und Kolakowski (1994) gehören Tachykininrezeptoren zur Klasse A (*rhodopsin-*

*like*) der G-Protein gekoppelten Rezeptoren (Attwood und Findlay, 1994; Kolakowski, 1994; <http://www.gpcrdb.org>). Sieben Transmembrandomänen formen eine von außen zugängliche Tasche, in der sich die Bindungsstelle für den Überträgerstoff befindet (Hökfelt *et al.*, 2001). Extrazelluläre Schleifen übernehmen bei den Tachykininrezeptoren vermutlich die Aufgabe der Selektion des Liganden, wohingegen erst die Interaktion des Liganden mit den Transmembrandomänen zur Rezeptoraktivierung, also zur Anlagerung des G-Proteins, führt (Severini *et al.*, 2002). Nach Anlagerung des heterogenen Trimers Guanyl-nucleotid-bindendes Protein (G-Protein) wird GDP von der  $\beta$ -Untereinheit des G-Proteins abgespalten und GTP gebunden. Daraufhin trennt sich diese Untereinheit von dem  $\beta\gamma$ -Dimer und tritt mit einem membranständigen Effektorprotein in Kontakt (Gether, 2000). Im Fall von Tachykininrezeptoren ist dies zunächst die membranständige Phospholipase C. Erst bei höheren Tachykininkonzentrationen wird auch die Adenylatcyclase aktiviert (Nakajima *et al.*, 1992).

Phospholipase C kann aus Phosphatidylinositol den intrazellulären Botenstoff (*second messenger*) das Inositol(1,4,5)triphosphat (IP3) freisetzen. Es bewirkt eine Freisetzung von Calcium-Ionen aus dem endoplasmatischen Retikulum und löst so zum Beispiel eine Drüsensekretion oder eine Tonuserhöhung an glatter Muskulatur aus. Nach der Abspaltung von IP3 bleibt das Diacylglycerin zurück, das ebenfalls über Phosphorylierung von Proteinen die Zellfunktion beeinflusst (Kandel *et al.*, 1995). Die Adenylatcyclase katalysiert die Bildung von cyclischem Adenosinmonophosphat (cAMP) das ebenfalls ein *second messenger* ist. Steigt die cAMP-Konzentration, so wird unter Einwirkung dieses *second messenger* eine regulatorische Untereinheit im Enzym Proteinase A abgespalten. Das Enzym überträgt dann Phosphatreste auf andere Enzyme und verändert damit ihre Aktivität (Kandel *et al.*, 1995).

Welche physiologische Funktion die Aktivierung der Tachykininrezeptoren hat, wird zurzeit noch in pharmakologischen und genetischen Studien untersucht. Obwohl viele Studien zeigen, dass Tachykininrezeptoren an Schmerzempfindung

(Cao *et al.*, 1998), Entzündungsreaktionen (Campos und Calixto, 2000; Myers *et al.*, 2005) und psychischen Reaktionen (Stress) (Bilkei-Gorzo *et al.*, 2002; Santarelli *et al.*, 2003) beteiligt sein können, hat sich bisher nur ein Wirkstoff auf dem Markt durchgesetzt. Aprepitant (Emend<sup>®</sup>), ein selektiver, ZNS-gängiger NK1 Rezeptor-Antagonist, hat seit 2004 eine Zulassung als Antiemetikum (Hellwig, 2004). Es wird in Kombination mit 5-HT<sub>3</sub>-Antagonisten und Dexamethason bei akuter und verzögerter Übelkeit und Erbrechen nach einer Chemotherapie eingesetzt (Hesketh *et al.*, 2003). Der genaue Wirkmechanismus ist noch nicht vollständig aufgeklärt. Aber ein Kriterium für die antiemetische Wirkung der NK1 Antagonisten ist die Überwindung der Blut-Hirn-Schranke (Sanger, 2004). Auch in NK1 *Knockout*-Mäusen wurde eine reduzierte Reaktion auf toxische Stoffe (wie zum Beispiel Capsaicin) nachgewiesen, wodurch eine Beteiligung der NK1 Rezeptoren an der emetischen Reaktion ebenfalls bestätigt wurde (Höckelt *et al.*, 2001). Osanetant, ein NK3-Antagonist, der bei Schizophrenie eingesetzt werden sollte, erreichte nur die Phase IIa der klinischen Studien (Kamali, 2001). Tachykininrezeptoren werden heterogen in verschiedenen Geweben exprimiert (Pinto *et al.*, 2004; Patak *et al.*, 2002). Zusätzlich scheint es speziesbedingte Unterschiede in der Expression der Tachykininrezeptoren zu geben. Ergebnisse, die aus Studien mit einer Spezies gewonnen wurden, sollten darum nicht auf andere Spezies extrapoliert werden (Pinto *et al.*, 2004; Patak *et al.*, 2002). Bisher konnten zwei der Neurokininrezeptoren durch gezielte Deletion ausgeschaltet werden. Mäuse, bei denen das NK1 Gen fehlt, zeigen in Verhaltenstests im Vergleich zu Wildtyptieren eine verminderte Stressreaktion (De Felipe *et al.*, 1998; Rupniak *et al.*, 2001; Santarelli *et al.*, 2000). Studien mit allergischen Mäusen zeigten, dass entzündliche Reaktionen der Bronchien nach der Inhalation eines NK3 Rezeptor Antagonisten (SR 142801) positiv beeinflusst werden konnten (Nenan *et al.*, 2001). Nach einer Deletion des NK3 Gens zeigten Mäuse wider Erwarten keine Veränderung in pulmonaren allergischen Reaktionen (Kung *et al.*, 2004).

### 1.4.2 SP und NKA

Tac1 codiert, wie bereits erwähnt, die Tachykinine SP und NKA. Durch alternatives Spleissen wird eine Vorläufer-RNA so prozessiert, dass vier mRNAs ( $\alpha$ Tac1,  $\beta$ Tac1,  $\gamma$ Tac1,  $\delta$ Tac1) entstehen, aus denen vier Prä-Pro-Peptide synthetisiert werden. Alle vier Vorläuferpeptide codieren SP.  $\beta$ - und  $\gamma$ -Tac1 codieren zusätzlich NKA, Neuropeptid K und Neuropeptid  $\gamma$ , wobei die beiden letztgenannten zwei verlängerte Formen von NKA darstellen (Severinin *et al.*, 2002; Hökfelt *et al.*, 2001).

Am häufigsten sind die  $\gamma$ - und  $\beta$ -Form der mRNAs, also die Formen, die SP und NKA gleichzeitig codieren. Das bedeutet aber auch, dass SP und NKA in den meisten Fällen gleichzeitig synthetisiert und freigesetzt werden (Pennefather *et al.*, 2004). Bei dieser tachykininergen Cotransmission handelt es sich also um eine Sonderform der Cotransmission von Neuropeptiden, bei der die Neurotransmitter nicht nur gleichzeitig freigesetzt sondern auch gleichzeitig synthetisiert werden. Die Effekte können sich bei gleichzeitiger Freisetzung von SP und NKA je nach Verteilung und Funktion der NK1 und NK2 Rezeptoren im Gewebe auf verschieden Art (Summierung der Effekte, Cooperation, Spezialisierung) verstärken (Maggi 2000).

SP wurde im Nervengewebe vieler Säugetiere unter anderem auch im menschlichen Gehirn (Chawla *et al.*, 1997) und im Rückenmark (Covenas *et al.*, 2003) nachgewiesen. Hohe Konzentrationen traten dabei im *Mesencephalon*, im *Hypothalamus* und in der *Area preoptica* auf. SP konnte aber auch im peripheren Nervensystem (zum Beispiel in Spinal- und Trigeminalganglien und im Vagusnerv), im Auge und im Magen-Darm-Trakt nachgewiesen werden (Pernow, 1983). Die Funktion von SP und NKA wurde unter anderem am murinen *Knock-out*-Modell untersucht. Tac1<sup>-/-</sup>-Mäuse zeigen in Verhaltenstests ein weniger ängstliches Verhalten als Wildtyp-Mäuse. Daraus konnte geschlossen werden, dass depressives und ängstliches Verhalten maßgeblich durch die Tachykinine SP und NKA beeinflusst wird (Bilkei-Gorzo *et al.*, 2002). Mäuse mit einer Deletion des Tac1 Gen zeigen außerdem noch ein geringeres Schmerzempfinden

im *Hotplate*- und im Formalin-Test. Daraus lässt sich eine Beteiligung von Tac1 und den Tachykininen SP und NKA an Schmerz- und Entzündungsreaktionen ableiten (Zimmer *et al.*, 1998). Eine Besonderheit des Tac1<sup>-/-</sup>-*Knockout*-Modells liegt jedoch darin, dass durch die Deletion eines Gens nicht nur ein Tachykinin sondern gleich zwei Tachykinine (SP und NKA) ausgeschaltet wurden.

### 1.4.3 Neurokinin B

Über das murine Tac2 Gen und das humane Tac3 Gen und das von diesen Genen codierte Peptid NKB ist im Vergleich zu SP nur wenig bekannt. Bis zum Jahr 2001 war lediglich die Verteilung von NKB im zentralen Nervensystem von Ratten beschrieben worden (Warden und Young, 1988; Marksteiner *et al.*, 1992) und es gab nur wenig Information über die Verteilung von NKB im menschlichen Gehirn (Chawla *et al.*, 1997, Koutcherov *et al.*, 2000). In peripheren Geweben konnte NKB lange nicht nachgewiesen werden (Moussaoui *et al.*, 1992). Es war nicht möglich, dem Peptid aufgrund vorhandener Daten eine bestimmte physiologische Funktion zuzuordnen.

Mittlerweile wurde NKB auch in peripheren menschlichen Geweben nachgewiesen. Tac3 Transkripte, die NKB im menschlichen Organismus codieren, wurden ausser im Gehirn auch in der Plazenta, in den Hoden, in den Nieren, in der Prostata, im Knochenmark, in der Speicheldrüse, in Skelettmuskeln, im Thymus, in der Nebenniere und in der Lunge detektiert. Im Cerebellum, der Leber und der Milz wird Tac3 nicht exprimiert (Pinto *et al.*, 2004). Tac3 Transkripte sind in peripheren Geweben hauptsächlich in Zellen enthalten, die nicht zum Nervengewebe gehören, wobei nicht ausgeschlossen werden kann, dass auch periphere Ganglien oder Nervenenden NKB freisetzen (Pinto *et al.*, 2004). Vergleichbar umfangreiche Studien für Mäuse oder Ratten gibt es bisher nicht. Da diese Tiere aber häufig in pharmakologischen und genetischen Studien eingesetzt werden, wäre es notwendig die NKB Expression auch in Mäusen und Ratten zu untersuchen und mit vorhandenen Daten zu vergleichen. Erst dann wird klar, ob Ergebnisse aus Tierversuchen



auf den Menschen übertragen werden können.

Pathophysiologische Bedeutung gewann NKB als ein Zusammenhang zwischen hohen NKB-Konzentrationen während des letzten Trimenons der Schwangerschaft und Präeklampsie nachgewiesen werden konnte (Page *et al.*, 2001; Page *et al.*, 2000). Präeklampsie betrifft 5-10% der Erstschwangerschaften. Dabei auftretende Symptome sind erhöhter Blutdruck, Proteinurie, Störungen der Blutgerinnung und periphere und cerebrale Ödeme. In besonders schweren Fällen können auch zentralnervöse Krämpfe auftreten (Eklampsie) (Cross, 2003). NKB wird in der Schwangerschaft von Syncytiotrophoblasten freigesetzt und gelangt in den mütterlichen Blutkreislauf. Hohe NKB-Konzentration führen zu einer Aktivierung von NK3 Rezeptoren, was zu erhöhtem Blutdruck führen kann (Page *et al.*, 2000). Wodurch die erhöhte Freisetzung von NKB verursacht wird, ist bislang jedoch noch nicht geklärt.

Über die Funktion von NKB im zentralen Nervensystem ist noch weniger bekannt. Es konnte bisher nur nachgewiesen werden, dass die Expression von NKB im *Nucleus arcuatus* durch den Östrogenrezeptor  $\alpha$  reguliert wird (Dellovade und Merchantaler, 2004). Außerdem konnte in Versuchen mit Ratten gezeigt werden, dass sich die Genexpression von NKB und NK3 nach zentralen Krämpfen in Abhängigkeit von der Zeit verändert (Schwarzer *et al.*, 1996). NK3 Rezeptoren im Rückenmark scheinen auch an der Modulation von Schmerzen im gastrointestinalen Bereich beteiligt zu sein (Sanger *et al.*, 2004). Obwohl NKB in fast allen Bereichen des Gehirns exprimiert wird, konnten noch keine weiteren Funktionen zugeordnet werden.

## 1.5 Zielsetzung der Arbeit

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die endogene Expression von NKB und der NK3 Rezeptoren und die physiologische Funktion von NKB in Mäusen zu beschreiben.

Dazu wurde zunächst die Expression von NKB und der NK3 Rezeptoren mittels immunhistochemischer Methoden, nichtradioaktiver *in situ*-Hybridisierung und RT-PCR untersucht werden. Der Schwerpunkt lag dabei auf einer vergleichenden Analyse der Expression und Verteilung von NKB und der NK3 Rezeptoren im zentralen Nervensystem von Mäusen und Ratten. Gleichzeitig sollte eine *Tac2 Knockout*-Mauslinie hergestellt und untersucht werden. Zur gezielten Deletion des murinen *Tac2* Gens wurde ein *Targeting*-Vektor hergestellt und in murine ES-Zellen injiziert. Daraus hervorgegangene ES-Zellklone, in denen eine homologe Rekombination stattgefunden hatte, wurden in Blastozysten injiziert und mit Morulae aggregiert. Homozygote *Knockout*-Tiere sollten anschliessend aus Verpaarungen der chimären Tieren erhalten werden.

# Kapitel 2

## Material

### 2.1 Chemikalien

Soweit nichts anderes erwähnt wird, wurden alle benutzten Chemikalien von den Firmen Sigma-Aldrich, Fluka oder Applichem bezogen.

### 2.2 Dialysemembran

Zur Aufreinigung des Antikörpers aus Eigelb wurde eine Dialyse-Membran (Spectra/Por<sup>®</sup>Float-A-Lyzer<sup>®</sup>) von Spectrum Laboratories Inc., USA verwendet.

### 2.3 *E. coli*-Zellen

Zur Vermehrung von Plasmid-DNA wurden TOP 10 Zellen von Invitrogen verwendet.

## 2.4 Eindeckmedien

Folgende Eindeckmedien wurden verwendet:

Roti <sup>®</sup> -Histokitt	Carl Roth GmbH und Co KG Braunschweig
Aquatex <sup>®</sup>	Merck KGaA, Darmstadt

## 2.5 Enzyme

Polymerasen wurden von Sigma-Aldrich, Roche und Invitrogen bezogen. Für Restriktionsanalysen wurden Endonukleasen von New England Biolabs verwendet.

## 2.6 Kits

Folgende Kits wurden verwendet:

Qiaprep Mini-/Midi-/Maxi-Kit	Qiagen, Hilden
Qiaquick	Qiagen, Hilden
RNeasy mini/midi Kit	Qiagen, Hilden
Omniscript RT Kit	Qiagen, Hilden
PCR DIG Labeling Mix	Roche Diagnostics, Mannheim
DIG RNA Labeling Kit (SP6/T7)	Roche Diagnostics, Mannheim
DNA free	Ambion
Vectastain <sup>®</sup> Elite <sup>®</sup> ABC Kit standard	Vector Laboratories Inc., Burlingame USA

## 2.7 Marker und Standards

Folgende Marker und Standards wurden verwendet:

RNA-Marker:	RNA Ladder (high range) MBI Fermentas
Proteinmarker:	prestained SDS-PAGE, Broad Range, Biorad
DNA Ladder:	100bp- und 1kb-Ladder, Invitrogen Karlsruhe

## 2.8 Tiere

CD1-, C57BL/6-Mäuse und Wistar Ratten wurden bei Charles River Laboratories in Sulzfeld bestellt.

## 2.9 Objektträger

Für die immunhistochemischen Untersuchungen und die *in situ*-Hybridisierung wurden Objektträger der Marke SuperFrost<sup>®</sup>Plus von Menzel Gläser, Menzel GmbH Co KG, Braunschweig, Deutschland verwendet.

## 2.10 Plasmide

Folgende Plasmide wurden verwendet:

pCRII-TOPO	Invitrogen, Karlsruhe
pPNT-M1	aus hauseigener Plasmidbank
PAC-Klon (RZPD-clone ID: RPCIP711F19133Q2)	Deutsches Ressourcenzentrum für Genomforschung gGmbH, Berlin

## 2.11 Sekundärantikörper

Folgende Sekundärantikörper wurden verwendet:

Zur Detektion des pep2-Antikörpers:

Biotin-SP-conjugated AffiniPure

F(ab')<sub>2</sub> fragment

Donkey Anti-Rabbit IgG (H+L) Jackson ImmunoResearch, USA

Zur Detektion des Antikörpers aus Hühnereigelb:

Biotin-SP-conjugated AffiniPure

F(ab')<sub>2</sub> fragment

Donkey Anti-Chicken IgG (H+L) Jackson ImmunoResearch, USA

## 2.12 Zellkulturmedien

folgende Medien wurden für die Zellkultur verwendet:

DMEM (high glucose)

Gibco, Invitrogen corporation

FCS (ES-Zell getestet)

Hyclone,

Perbio Science Deutschland, Bonn

MEM, nicht essentielle Aminosäuren

Gibco, Invitrogen corporation

Penicillin-Streptomycin-Mix

Gibco, Invitrogen corporation

Natriumpyruvat-Lösung

Gibco, Invitrogen corporation

$\beta$ -Mercaptoethanol	Gibco, Invitrogen corporation
LIF	Gibco, Invitrogen corporation
G418 (Genitcin)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
FIAU (Gancyclovir)	Moravec Biochemicals Inc, Brea, USA
DMSO	Fluka, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
SDS	Fluka, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Proteinase K	Sigma-Aldrich, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Trypsin EDTA	Gibco, Invitrogen corporation
HBSS	Gibco, Invitrogen corporation
Demecolcine in HBSS	Gibco, Invitrogen corporation
PMS	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
HCG	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim

## 2.13 Sonstige Chemikalien

Ausserdem wurden folgende Chemikalien verwendet:

Isofluran	Forene <sup>®</sup> Abbott GmbH Co KG, Wiesbaden, Deutschland
PBS tablets	Gibco Invitrogen corporation
30% Acrylamid/0,8% Bisacrylamid	BioRad
TEMED	Gibco, Invitrogen corporation
Tissue-Tek <sup>®</sup> OCT <sup>™</sup> Compound	Sakura Finetek
Leupeptin	Roche Diagnostics Mannheim
Aprotinin	Roche Diagnostics Mannheim
Complete Mini	Roche Diagnostics Mannheim

Anti-DIG-AP-Fab-Fragmente	Roche Diagnostics Mannheim
NBT/BCIP	Roche Diagnostics Mannheim
Magermilch	Reforma
RNase Inhibitor	Invitrogen, Karlsruhe
tRNA	Invitrogen, Karlsruhe
Salmon Sperm DNA	Invitrogen, Karlsruhe
Random Hexamer Primer	Invitrogen, Karlsruhe
Blockierungreagenz	Roche Diagnostics Mannheim



# Kapitel 3

## Methoden

### 3.1 Molekularbiologische Grundtechniken

Die Durchführung molekularbiologischer Standardmethoden wie zum Beispiel Restriktionsverdau, Ethanol-fällung, photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren, Gelelektrophorese und Präparation von Plasmid-DNA aus *E. coli* erfolgte nach den Vorschriften von Sambrook *et al* (Sambrook *et al.*, 1989).

### 3.2 Methoden im Umgang mit *E. coli*

#### 3.2.1 Kultivierung von *E. coli*

verwendete Medien:

LB-Medium: 2% LB Broth gelöst in demineralisiertem Wasser

LB-Agar: 3,5% LB Agar in demineralisiertem Wasser

*E. coli*-Zellen wurden in Flüssigkulturen und auf Agarplatten bei 37°C kultiviert. Um einen optimalen Gasaustausch zu gewährleisten, wurden Flüssigkulturen

während der Inkubation mit 220 UpM geschüttelt. Bei Bedarf wurde den Medien Antibiotika in der vom Hersteller vorgegebenen Konzentration zugesetzt.

### **3.2.2 Transformation von *E. coli***

Die Transformation von *E. coli* mit Plasmid-DNA erfolgte nach Angaben des Herstellers mittels Hitzeschock. Dazu wurde Plasmid-DNA zu chemisch kompetenten *E. coli*-Zellen gegeben. Dieser Ansatz wurde zunächst 5 bis 30 Minuten auf Eis inkubiert. Anschliessend wurden die Zellen einem Hitzeschock (30 Sekunden bei 42°C im Wasserbad) ausgesetzt und sofort wieder auf Eis gesetzt. Nach der Transformation wurden die Bakterien eine Stunde in SOC-Medium bei 37°C und 220 UpM kultiviert. Ein Teil der Suspension wurde auf Agarplatten mit dem entsprechenden Antibiotikum ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Bei Bedarf wurden die Platten für maximal eine Woche bei 4°C gelagert.

### **3.2.3 Vermehrung von Plasmid DNA in *E. coli***

Von Ausstrichen auf Agarplatten wurden einzelne Kolonien gepickt und über Nacht in 5 ml Flüssigkultur (mit Antibiotika) bei 37°C und 220 UpM kultiviert. Ca. 1 ml dieser Kultur wurde mit 87% Glycerol im Verhältnis 1:1 versetzt, gut gemischt und bei -20°C gelagert. Aus diesem Glycerolstock konnten später Kulturen in größerem Maßstab angesetzt werden. Dabei wurde 1 µl aus dem Glycerolstock in 1 ml Flüssigkultur verdünnt. Die restlichen 4 ml Suspension wurden zur Präparation von DNA verwendet.

### **3.2.4 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli***

Zur Isolierung von DNA aus *E. coli* standen mehrere Methoden zur Verfügung. Teilweise wurden Mini-/Midi-/Maxi-Prep Kits von Qiagen benutzt. Standen diese nicht zur Verfügung wurden DNA-Präparationen nach Vorschriften aus Sambrook *et al.* durchgeführt (Sambrook *et al.*, 1989).

### 3.3 Gelelektrophorese

verwendete Lösungen:

1x TAE-Puffer:	40 mM Tris-Acetat 1 mM EDTA
Ethidiumbromidlösung:	100 $\mu$ l Ethidiumbromid (10 mg/ml) in 1500 ml 1x TAE-Puffer
6x Ladepuffer:	60% (v/v) Glycerin (wasserfrei) 0,25% (m/v) Orange G gelöst in 1x TAE

DNA-Fragmente wurden mittels Agarosegelelektrophoretisch aufgetrennt. Dazu wurden die Proben mit 6x Ladepuffer im Verhältnis 6:1 (Probenvolumen: Ladepuffer) versetzt und auf 0,7%-ige bis 2%-ige Agarosegelele aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte in 1x TAE-Puffer bei 60-130 V. Anschließend wurde das Gel in der Ethidiumbromidlösung angefärbt und die aufgetrennten Fragmente wurden mit Hilfe eines UV-Transilluminators detektiert. Unter Verwendung einer PC-gesteuerten CCD-Kamera wurde das Bild digital dokumentiert. Zur Größenbestimmung von DNA-Fragmenten wurden entsprechende Marker benutzt. Mit Gesamt-RNA wurde nach der Isolierung aus Geweben wie mit DNA-Fragmenten verfahren, wobei der TAE-Puffer mit DEPC-behandeltem Wasser angesetzt wurde. Proben und Marker (MBI Fermentas) wurden mit mitgeliefertem Ladepuffer versetzt und nach Angaben des Herstellers denaturiert.

### 3.4 Gelextraktion von DNA-Fragmenten

Zur Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen wurde die betreffende Bande nach der elektrophoretischen Auftrennung ausgeschnitten. Die im Gelstück enthaltene DNA wurde dann mit Hilfe eines Gelextraktionskits der Firma Qiagen nach Angaben des Herstellers extrahiert und aufgereinigt.

### 3.5 Sequenzierungen

Die Sequenzierung von Plasmid-DNA wurde von den Firmen MWG Biotech, Ebersberg; Qiagen, Hilden und Macrogen Inc. in Korea durchgeführt.

### 3.6 PCR

Die Methode der PCR (*polymerase chain reaction*) wurde eingesetzt, um DNA Fragmente zu amplifizieren oder zu mutieren. Dabei wurde der Reaktionsansatz und das Temperaturschema den verwendeten Primern und der Template-DNA empirisch angepasst.

Bei Verwendung von *Taq*-Polymerase von Invitrogen wurde nach Angaben des Herstellers folgender Ansatz mit vorgegebenem Temperaturschema kombiniert:

Ansatz:

Reagenz	Eingesetztes Volumen	Endkonzentration
dNTPs (10 mM)	1,5 $\mu$ l	0,5 mM
10x Puffer	3,0 $\mu$ l	1x
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	1,5 $\mu$ l	1,25 mM
Taq (Invitrogen)	0,5 $\mu$ l	5 units/Ansatz
Demineralisiertes Wasser	23,0 $\mu$ l	
Primer F (50 pmol/ $\mu$ l)	0,5 $\mu$ l	0,8 pmol/ $\mu$ l
Primer R (50 pmol/ $\mu$ l)	0,5 $\mu$ l	0,8 pmol/ $\mu$ l
DNA	1,0 $\mu$ l	
Gesamtvolumen 30 $\mu$ l		

Reaktionsschema:

1x	95°C	4 min	Initiale Denaturierung
35x	94°C	45 s	Denaturierung
	68°C	45 s	Anlagerung der Primer
	72°C	1 min	Verlängerung der Primer
1x	72°C	7 min	Finale Verlängerung

Bei Verwendung von Accutag von Sigma-Aldrich Chemie wurden nach Angaben des Herstellers folgende Bedingungen eingesetzt:

Ansatz:

Reagenz	Eingesetztes Volumen	Endkonzentration
dNTPs (10 mM)	1,5 $\mu$ l	0,5 mM
10x Puffer (mit MgCl <sub>2</sub> )	3,0 $\mu$ l	1x
Accutag (5 units/ $\mu$ l)	0,5 $\mu$ l	2,5 units/Ansatz
Demineralisiertes Wasser	23,0 $\mu$ l	
Primer Xba1.1 (50 pmol/ $\mu$ l)	0,5 $\mu$ l	0,8 pmol/ $\mu$ l
Primer EcoR1.1 (50 pmol/ $\mu$ l)	0,5 $\mu$ l	0,8 pmol/ $\mu$ l
DNA (200 ng/ $\mu$ l)	1,0 $\mu$ l	
Gesamtvolumen 30 $\mu$ l		

Reaktionsschema:

1x	96°C	30 s	Initiale Denaturierung
35x	94°C	15 s	Denaturierung
	68°C	30 s	Anlagerung der Primer
	68°C	4 min	Verlängerung der Primer
1x	68°C	10 min	Finale Verlängerung

Bei Bedarf wurden weitere Anpassungen vorgenommen (zum Beispiel Anpassung der Temperatur zur Primer-Anlagerung und finalen Verlängerung, Anpassung der MgCl<sub>2</sub>-Konzentration). Diese werden im entsprechenden Ergebnis-Kapitel

zusammen mit den verwendeten Primer-Paaren genannt.

Die Länge der entstandenen PCR-Produkte wurde durch elektrophoretische Auftrennung auf Agarosegelen (0,7% bis 2,0%) überprüft.

### 3.7 RT-PCR

Drei nicht trächtige weibliche Mäuse, drei trächtige weibliche Mäuse (ausschließlich zur Präparation von Plazentagewebe) und drei männliche C57BL/6-Mäuse wurden mit einer Überdosis Isofluran getötet. Die zuvor ausgewählten Organe wurden entnommen, nach Angaben des Herstellers in RNALater überführt und über Nacht bei 4°C gelagert. Die Gesamt-RNA wurde je nach Größe der Organe mit einem RNeasy mini oder midi Kit isoliert. Aus jeder Probe wurde 1 µg der RNA mit DNase aus dem DNA-free kit unter Zusatz eines RNase Inhibitors verdaut, um genomische DNA zu entfernen. Die so erhaltenen mRNA wurde mit einem Omniscript Kit unter Zusatz von Random Hexamer Primers und eines RNase Inhibitors in cDNA umgeschrieben, die als Template für die folgende PCR genutzt wurde. Die PCR wurde mit *Taq*-Polymerase nach dem in Abschnitt 3.6 beschriebenen Schema durchgeführt. Die Produkte wurden auf einem 1%-igem Agarosegel in 1x TAE-Puffer elektrophoretisch aufgetrennt.

### 3.8 Methoden im Umgang mit Primärantikörpern

Für die Immunhistochemie standen zwei polyklonale Antikörper zur Verfügung. Ein Antikörper (NKB-IgY) wurde aus Hühnereigelb isoliert und ist gegen das murine NKB Peptid gerichtet, wohingegen der pep2-Antikörper nach Hyperimmunisierung von Kaninchen gegen das Vorläuferprotein aus Serum gewonnen wurde.

### 3.8.1 Lagerung des Kaninchen-Antiserum

Das Kaninchen-Antiserum wurde freundlicherweise von Dr. James Krause, Neurogen Corporation, Banford, Connecticut, USA überlassen. Das Antiserum ist gegen eine Sequenz des Ratten-Vorläuferproteins gerichtet, die bereits zuvor als pep2 beschrieben worden ist (Marksteiner *et al.*, 1992). Das Kaninchen-Antiserum wurde als Lyophilisat erhalten und nach Anweisung mit demineralisiertem Wasser rekonstituiert. Um eine längere Haltbarkeit des Serums zu ermöglichen, wurde dieses nach dem Lösen mit 87%-igem Glycerol im Verhältnis 1:1 versetzt, gut gemischt und bei -20°C gelagert.

### 3.8.2 Ammoniumsulfat-Fällung zur Aufreinigung des IgY Antikörpers

50 Gramm der Eigelbmasse wurden aufgetaut und 1:10 (m/v) mit demineralisiertem Wasser verdünnt und homogenisiert. Das Homogenisat wurde 45 Minuten bei 4°C und 2500x g zentrifugiert. Der Überstand wurde filtriert (Porendurchmesser: 0,8  $\mu\text{m}$ ) und das Lipidpellet verworfen. Zum Überstand wurde nun unter Rühren festes Ammoniumsulfat zugegeben bis eine 25%-ige Sättigung erreicht war. Diese Suspension wurde bei Raumtemperatur weitere 20 Minuten gerührt und anschliessend 30 Minuten bei 4°C und 2500x g zentrifugiert. Das Pellet wurde abermals verworfen. Zum Überstand wurde unter Rühren erneut festes Ammoniumsulfat zugesetzt bis eine 45%-ige Sättigung erreicht war. Die Suspension wurde weitere 20 Minuten bei Raumtemperatur gerührt und anschließend für 30 Minuten bei 4°C und 2500x g zentrifugiert. Nach dieser Zentrifugation wurde der Überstand verworfen und das Pellet in einem geeigneten Volumen PBS gelöst. Die Lösung wurde über Nacht unter Rühren gegen PBS dialysiert. Anschließend wurde die Lösung aliquotiert und bei -20°C gelagert.

### 3.8.3 Photometrische Bestimmung der Proteinkonzentration

(Harlow and Lane, 1988)

Die Konzentration von Antikörpern wurde nach der Dialyse photometrisch bestimmt. Dazu wurde die Absorption bei einer Wellenlänge von 280 nm in einer Quarzküvette mit der Schichtdicke von 1 cm gegen den Probenpuffer gemessen.

Die Konzentrationsbestimmung erfolgte dann nach der Formel:

$$1,35 \text{ O.D. (280nm)} = 1 \text{ mg Protein/ml}$$

### 3.8.4 Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

verwendete Lösungen:

Trenngel:

- 3,4 ml demineralisiertes Wasser
- 4,0 ml 30% Acrylamid/0,8% Bisacrylamid
- 2,5 ml 1,5 M Tris-HCl, pH 8,8
- 0,1 ml 10% (m/v) SDS
- 50  $\mu$ l 10% APS
- 5  $\mu$ l TEMED
- Gesamtvolumen: 10 ml

Sammelgel:

- 5,4 ml demineralisiertes Wasser
- 2,0 ml 30% Acrylamid/0,8% Bisacrylamid
- 2,5 ml 0,5 M Tris-HCl, pH 6,8
- 0,1 ml 10% (m/v) SDS
- 50  $\mu$ l 10% APS
- 10  $\mu$ l TEMED
- Gesamtvolumen: 10 ml



2x Probenpuffer:            3,55 ml demineralisiertes Wasser  
                                  1,25 ml 0,5 M Tris-HCl, pH 6,8  
                                  2,0 ml 10% (m/v) SDS  
                                  2,5 ml 87% Glycerol  
                                  0,2 ml 0,5% Bromphenolblau  
                                  Gesamtvolumen: 9,5 ml

5x Laufpuffer, pH 8,3:    15,0 g Tris Base  
                                  72,0 g Glycin  
                                  5,0 g SDS(s)  
                                  in 1000 ml demineralisiertem Wasser  
                                  Die fertige Lösung wird bei 4°C gelagert.

Zur Überprüfung der Reinheit des Antikörpers aus Hühnereigelb wurde das nach der Dialyse erhaltene Proteingemisch durch Gelelektrophorese auf einem 12%-igem Polyacrylamidgel unter denaturierenden Bedingungen (Zugabe von SDS, Aufkochen der Proben vor dem Auftragen auf das Gel) aufgetrennt. Es wurden konstant 200 Volt für 45-60 Minuten angelegt. Zur Bestimmung der Molekularmasse wurde ein vorgefärbter Marker von Biorad verwendet.

### 3.8.5 Gelfärbung mit Coomassie

Verwendete Lösungen:

Coomassie Blau Lösung: 0,5 g Coomassie Brilliant Blau  
                                  250 ml Ethanol  
                                  50 ml Essigsäure  
                                  mit demineralisiertem Wasser auf 500 ml auffüllen

Entfärber:                    350 ml Ethanol  
                                  50 ml Essigsäure  
                                  mit demineralisiertem Wasser auf 1 Liter auffüllen

Das Gel wurde nach der SDS-PAGE zur Detektion der Proteine für 1,5 Stunden mit Coomassie Blau Lösung in einem Schüttelbad gefärbt und anschließend mit einer Entfärber-Lösung für ca. zwei Stunden ebenfalls unter Schütteln wieder entfärbt.

## **3.9 Entnahme und Aufbereitung von Gewebe**

### **3.9.1 Kryopräparate für die Immunhistochemie**

Verwendete Lösungen:

Fixierlösung:    4% Paraformaldehyd in 1x PBS

Sucroselösung:   20% Sucrose gelöst in demineralisiertem Wasser

Tiere, aus denen Gewebe entnommen werden sollte, wurden mit einer Überdosis Kohlendioxid oder Isofluran getötet. Die Organe wurden freipräpariert, entnommen und in einer Lösung aus 4% Paraformaldehyd in PBS Puffer für mehrere Tage fixiert. Anschliessend wurden die Präparate in Sucroselösung überführt, um das Gewebe vor Schäden während des Einfrierens zu schützen. Nach 3-5 Tagen wurden die Gewebe bei -80°C eingefroren und gelagert. Die Präparate wurden vor dem Anschneiden für mindestens eine Stunde auf -20°C bis -22°C

erwärmt und in Tissue Tek eingebettet. Nach dem Aushärten des Blockes wurden an einem Kryostaten 12  $\mu\text{m}$  dünne Schnitte hergestellt. Die Schnitte wurden auf SuperFrost Plus-Objektträger aufgezogen und bis zum Gebrauch bei  $-80^\circ\text{C}$  gelagert.

### 3.9.2 Paraffinpräparate für die Immunhistochemie

Verwendete Lösungen:

Bouin-Hollande: 6% Pikrinsäure  
2,5% Kupfer(II)acetatmonohydrat  
3,7% Formaldehyd  
1% Essigsäure  
gelöst in demineralisiertem Wasser

Die Organentnahme erfolgte wie bereits oben beschrieben. Fixiert wurden die Gewebe durch drei Tage Inkubation in Bouin Hollande-Lösung. Anschließend wurde über mehrere Tage unter mehrmaligem Wechsel der Lösung überschüssige Fixierlösung mit 70% Isopropanol heraus gewaschen. Anschließend wurden die Präparate in einem Entwässerungsautomaten dehydriert und in Paraplast eingebettet. Nach Aushärten des Paraffinblockes wurden an einem Microtom 7  $\mu\text{m}$  dünne Schnitte angefertigt, auf Superfrost Plus Objektträger aufgezogen, über Nacht bei  $37^\circ\text{C}$  in einem Schrank getrocknet und anschließend bis zur endgültigen Verwendung in Objektträgerkästen bei Raumtemperatur gelagert.

### 3.10 Immunhistochemische Färbung

Verwendete Lösungen:

Peroxidase-Blockierung: 0,3% Wasserstoffperoxid in Methanol

Antikörperdemaskierung: 0,01 M Natriumcitrat-Puffer, pH 6,0

Färbelösung: 125  $\mu\text{g}/\text{ml}$  DAB  
0,08% Ammoniumnickel(II)sulfat  
in 50 mM Tris-HCl (pH 7,4)

Paraffinschnitte wurden, wie in der nachfolgenden Tabelle dargestellt, erst entparaffiniert und anschließend in einer Alkoholreihe rehydriert. Da der spätere Nachweis über einen Avidin-Biotin-Peroxidasekomplex erfolgt, wurden gewebeeigene Peroxidasen durch 20 Minuten Inkubation in 0,3% Wasserstoffperoxid/Methanol blockiert. Durch Kochen der Schnitte in Citratpuffer wurden Antigene demaskiert. Mögliche unspezifische Bindungen des Primärantikörpers wurden durch eine Vorinkubation der Schnitte in 5% BSA in PBS blockiert. Danach wurden die Schnitte mit dem Primärantikörper in feuchten Kammern über Nacht bei 4°C und anschließend zwei Stunden bei 37°C inkubiert. Nach einem Wasch- und einem Äquilibrierungsschritt wurde der Sekundärantikörper (Esel-anti-Huhn oder Esel-anti-Kaninchen) aufgetragen und für 45 Minuten bei 37°C inkubiert. Nach einem weiteren Waschschrift mit PBS und einem Äquilibrierungsschritten mit 5% BSA in PBS wurden die Schnitte mit einem Avidin-Biotin-Peroxidasekomplex-Reagenz versetzt. Anschließend wurden die Schnitte zunächst fünf Minuten im Dunkeln in der Färbelösung und nach Zugabe von 14  $\mu\text{l}$  30%-igem Wasserstoffperoxid zu 100 ml Färbelösung weitere 10 Minuten inkubiert. Die Detektion erfolgte über einen DAB/Ammoniumnickelsulfat-Nachweis, wobei Signale als dunkelblauer Niederschlag sichtbar wurden. Abschließend wurden die Schnitte wieder entwässert und

durch Eindecken mit Roti<sup>®</sup>-Histokitt versiegelt und haltbar gemacht. Das Ergebnis der Färbung wurde mikroskopisch ausgewertet und mit Hilfe einer CCD-Kamera in Form von digitalen Bildern dokumentiert.

Bei Kryoschnitten entfiel die absteigende Alkoholreihe. Die bei -80°C gelagerten Objektträger mit Schnitten von unfixierten Geweben wurden für mindestens eine Stunde bei 37°C auf einer Heizplatte aufgetaut und getrocknet. Dann wurden die Schnitte für 30 min in 4% Paraformaldehyd-haltigem 1x PBS fixiert. Anschließend wurden endogene Peroxidasen durch Inkubation in Wasserstoffperoxid/Methanol blockiert. Eine Antigendemaskierung ist bei Kryoschnitten nicht nötig. Nach einem Waschschrift mit PBS und einer Vorinkubation in 5% BSA in PBS wurde der Sekundärantikörper aufgetragen und wie bei den Paraffinschnitten über Nacht bei 4°C und anschließend für zwei Stunden bei 37°C inkubiert. Alle weiteren Inkubationen wurden durchgeführt, wie es bereits für die Paraffinschnitte beschrieben wurde. In der nachfolgenden Tabelle werden alle Arbeitsschritte nochmals aufgelistet.

Inkubationsschritt	Dauer in Minuten	Temperatur
Xylol 1	10	RT
Xylol 2	10	RT
100% Isopropanol	15	RT
100% Isopropanol	5	RT
80% Isopropanol	5	RT
Blockierung endogener Peroxidaseaktivität	20	RT
80% Isopropanol	5	RT
70% Isopropanol	5	RT
Demineralisiertes Wasser	5	RT
Antikörperdemaskierung	10	95°C
Demineralisiertes Wasser	5	RT
5% BSA/PBS	60	RT
Primärantikörper in 1% BSA/PBS	Über Nacht	4°C
	120	37°C
PBS	3x10	RT
0,5% BSA/PBS	5	RT
Sekundärantikörper in 1% BSA/PBS	45	37°C
PBS	3x10	RT
0,5% BSA/PBS	5	RT
ABC-Reagenz in 1% BSA/PBS	45	37°C
PBS	3x10	RT
50 mM Tris-HCl	10	RT
Färbereaktion	15	RT
Demineralisiertes Wasser	2x5	RT
70% Isopropanol	5	RT
80% Isopropanol	5	RT
100% Isopropanol	5	RT
100% Isopropanol	5	RT
Xylol	5	RT
Xylol	5	RT
Eindecken	-	-

### 3.10.1 Präadsorption

Verwendete Lösungen:

2x Lysispuffer: 120 mM NaCl  
5 mM EDTA  
0,5% NP40  
10  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  Leupeptin  
10  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  Aprotinin  
10  $\mu\text{l}$  Proteinaseinhibitor  
in 50 mM Tris-HCl pH 8,0

Das pep2-Antiserum wurde 1:20.000 und 1:50.000 in 5% Magermilch/PBS unter Zusatz von 5  $\mu\text{l}/\text{ml}$  Tween 20 verdünnt. Das pep2-Protein wurde in 2x Lysispuffer gelöst (Endkonzentration: 100mM). Diese Proteinlösung wurde zur Antikörperverdünnung zugegeben, so dass eine Proteinendkonzentration von 10  $\mu\text{M}$  bis 100  $\mu\text{M}$  eingestellt wurden. Diese Lösung wurde 48 Stunden bei 4°C inkubiert. Als Kontrolle wurde ein Aliquot des Antikörper nur mit 2x Lysispuffer (ohne Protein) inkubiert. Anschließend wurden Paraffinschnitte mit diesen Lösungen wie in Abschnitt 3.10 beschrieben behandelt und unter dem Mikroskop ausgewertet und fotografiert.

## 3.11 *In situ*-Hybridisierung

### 3.11.1 Klonierung von cDNA-Fragmenten

Das Rückenmark einer zwei Monate alten CD1 Maus wurde entnommen und in mitgeliefertem Lysispuffer mit Ultraschall homogenisiert. Die Gesamt-RNA wurde mit einem RNeasy mini Kit nach Angaben des Herstellers isoliert. Durch reverse Transkription mit einem Omniscript RT Kit wurde unter Zugabe eines RNase Inhibitors cDNA synthetisiert. Mit dieser cDNA als Template wurde

eine bestimmte Sequenz durch PCR wie in Abschnitt 3.6 beschrieben mit *Taq*-Polymerase von Invitrogen amplifiziert. Die PCR-Produkte wurden in den pCRII-TOPO Vektor ligiert. Die klonierten Fragmente wurden anschliessend durch eine Restriktionsanalyse identifiziert und die Orientierung wurde durch Sequenzierung des Plasmids bestimmt.

### 3.11.2 Herstellung von Ribosonden für die *In situ*-Hybridisierung

Die cDNA enthaltenden Plasmide wurden mit den Restriktionsenzymen *Bam*HI oder *Eco*RV linearisiert und durch Phenol/Chloroform-Extraktion mit anschließender Ethanol-Fällung gereinigt. DIG-markierte Sense- und Antisense-Ribosonden wurden durch *in vitro* Transkription mit dem DIG RNA Labeling Kit hergestellt und anschließend durch eine Fällung mit Ethanol und 0,8 M Lithiumchlorid gereinigt. Abschließend wurden die Sonden mit DEPC-behandeltem und demineralisiertem Wasser gelöst und bei -80 °C gelagert.

### 3.11.3 *In situ*-Hybridisierung mit DIG-markierten Sonden

Verwendete Lösungen:

Fixierung:	4% PFA in PBS
Acetylierung:	0,1 M Triethanolamin mit 0,25% Acetanhydrid
Prähybridisierungspuffer:	50% deionisiertes Formamid in 4x SSC (v/v)
20x SSC (pH 8):	3 M NaCl 300 mM Natriumcitrat-Dihydrat



---

Hybridisierungspuffer:	40% Formamid 10% Dextransulfat 1x Denhardts Lösung 4x SSC 0,01 M DTT 1 mg/ml tRNA 1 mg/ml ssDNA 10 ng Sense oder Antisense-Sonde/Schnitt
100x Denhardts Lösung:	10 g Ficoll (Typ 400) 10 g Polyvinylpyrrolidon 10 g BSA in 500 ml demineralisiertem Wasser
Puffer 1:	10 mM Tris-HCl pH 7,5 150 mM Natriumchlorid
Puffer 2:	100 mM Tris-HCl pH 9,5 100 mM Natriumchlorid 50 mM Magnesiumchlorid
Puffer 3:	10 mM Tris-HCl pH 8,1 1 mM EDTA
Blockierungslösung:	5% BSA in Puffer 1 mit 0,1% Triton X 100
Antikörperlösung:	Anti-DIG-AP Fab Fragmente 1:5.000 in Blockierungslösung verdünnt

Färbelösung:                    175  $\mu\text{g/ml}$  BCIP (gelöst in 70%-igem DMF (v/v))  
   337,5  $\mu\text{g/ml}$  NBT (gelöst in 70%-igem DMF (v/v))  
   100  $\mu\text{M}$  Levamisol  
   in Puffer 2

Mäuse und Ratten wurden durch eine Überdosis Kohlendioxid oder Isofluran getötet. Das freipräparierte Gehirn der Tiere wurde entnommen und sofort in Isopentan bei  $-40^{\circ}\text{C}$  eingefroren. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Gewebe bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert. Für die *in situ*-Hybridisierung wurden an einem Kryostaten 20  $\mu\text{m}$  dünne Querschnitte der Gewebe angefertigt. Die Schnitte wurden auf Superfrost Plus Objektträger aufgezogen und bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert.

Die *in situ*-Hybridisierung und die nachfolgende immunologische Detektion wurden nach folgendem Schema durchgeführt: Die Schnitte wurden in 4% PFA/PBS fixiert. Unspezifische Signale wurden durch Acetylierung verhindert. Nach der Prähybridisierung der Schnitte in 4x SSC/50% Formamid wurden 100  $\mu\text{l}$  Hybridisierungspuffer pro Objektträger aufgetragen. Die Schnitte wurden mit Deckplättchen aus Parafilm vor dem Austrocknen geschützt und über Nacht bei  $58^{\circ}\text{C}$  inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Schnitte in 2x SSC gewaschen. Dabei wurden auch die Deckplättchen vorsichtig entfernt. Nach dem stringenten Waschen der Schnitte, um überschüssige Sonde zu entfernen, wurden unspezifische Bindungen des Antikörpers durch Inkubation in Blockierungslösung unterbunden. Anschließend wurde der Antikörper aufgetragen und über Nacht bei  $4^{\circ}\text{C}$  inkubiert. Nach weiteren Wasch- und Äquilibrierungsschritten wurde die Färbelösung aufgetragen. Die Schnitte wurden im Dunkeln inkubiert und das Fortschreiten der Farbreaktion wurde in regelmäßigen Zeitabständen kontrolliert. Abschließend wurde die Farbreaktion mit EDTA-haltigem Puffer 3 gestoppt. Die Objektträger wurden in demineralisiertem Wasser gespült und eingedeckt. Die Färbung wurde unter dem Mikroskop beurteilt und durch digitale Fotografie dokumentiert.

Arbeitsschritt	Dauer	Temperatur
Fixierung	60 min	RT
PBS	2x 5 min	RT
Acetylierung	2x 5 min	RT
PBS	2x 5 min	RT
Prähybridisierung	120 min	37°C
Hybridisierung	Über Nacht	58°C
2x SSC	10 min	RT
Stringentes Waschen		
2x SSC/50% Formamid	2x 15 min	52°C
1x SSC	2x 15 min	52°C
0,1x SSC	2x 30 min	52°C
Immunologische Detektion		
Puffer 1	2x 10 min	RT
Blockierung	30 min	RT
Anti-DIG-AP Fab-Fragmente	Über Nacht	4°C
Puffer 1	2x 10 min	RT
Puffer 2	10 min	RT
Färbelösung	Nach Bedarf	RT
Puffer 3	10 min	RT
Demineralisiertes Wasser	Mehrfach eintauchen	RT
Eindecken		

### 3.12 Zellkultur

Verwendete Lösungen und Medien:

ES-Zellmedium: DMEM (high glucose)  
26% FCS (ES-Zell getestet)  
1,2% nicht essentielle Aminosäuren  
3 U/L Penicillin  
3 U/L Streptomycin  
0,6% Natrium-pyruvat Lösung  
0,2%  $\beta$ -Mercaptoethanol  
2 ng/ml LIF

Fibroblasten-Medium: DMEM (high glucose)  
10% FCS (ES-Zell getestet)  
3 U/L Penicillin  
3 U/L Streptomycin  
0,5% Natriumpyruvat-Lösung

Selektionsmedium: DMEM (high glucose)  
26% FCS (ES-Zell getestet)  
1,2% nicht essentielle Aminosäuren  
0,6% Penicillin-Streptomycin-Mix  
0,6% Natriumpyruvat-Lösung  
0,2%  $\beta$ -Mercaptoethanol  
2 ng/ml LIF  
170 ng/ml G418  
130 nM FIAU

---

Einfriermedium.	DMEM 50% FCS 10% DMSO
Lysispuffer:	20mM Tris-HCl, pH 8,0 10mM NaCl 10mM EDTA 0,5% SDS 1 mg/ml Proteinase K

### 3.12.1 Gewinnung von embryonalen Maus-Fibroblasten

Murine, embryonale Fibroblasten (MEF) wurden bei der Kultivierung von murinen embryonalen Stammzellen (ES-Zellen) als *Feeder*-Zellen eingesetzt. Da auch die Selektion der elektroporierten ES-Zellen auf einer *Feeder*-Zellschicht erfolgte, musste bereits bei der Gewinnung von MEF darauf geachtet werden, dass sie gegen Neomycin resistent sind. Dafür wurden zunächst CD1 Weibchen mit transgenen Männchen (Genotyp NEO<sup>+/+</sup>) verpaart. Eine erfolgte Paarung konnte innerhalb eines Zeitraumes von 10 Stunden nach der Paarung anhand von Vaginalpfropfen erkannt werden. 12-14 Tage später wurden die trächtigen Weibchen durch zervikale Dislokation oder durch eine Überdosis CO<sub>2</sub> getötet. Der Uterus wurde unter aseptischen Bedingungen freipräpariert und gespült. Anschließend wurden die Embryonen entnommen, die Plazenta wurde abgetrennt und bereits vorhandene Organanlagen wie Herz, Leber, Nieren aber auch der Kopf wurden entfernt. Das restliche Gewebe wurde grob zerkleinert und bei 37°C für 15-20 Minuten in 30 ml Trypsin/EDTA inkubiert. In Abständen von 2-3 Minuten wurde die Suspension kräftig geschüttelt um den Grad der Zerkleinerung zu erhöhen. Danach wurde die Suspension für 2 Minuten bei 1.200 UpM zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet wurde

in einem geeignetem Volumen Fibroblastenmedium resuspendiert und auf 15 cm Zellkulturschalen mit Fibroblastenmedium (ca. eine Schale pro Embryo) aufgeteilt. Die Zellen wurden im Inkubator bei gleichbleibenden Bedingungen (37°C, 5% CO<sub>2</sub> und 95% Luftfeuchtigkeit) kultiviert. Die Einhaltung dieser Standardbedingungen wurde durch regelmässiges Ablesen der Anzeigen am Inkubator überprüft. Nach 2-3 Tagen wurden die Zellen passagiert und nach weiteren 2-3 Tagen eingefroren und in Flüssigstickstoff gelagert.

### **3.12.2 Passagieren und Einfrieren von Maus-Fibroblasten**

Zum Einfrieren von Maus-Fibroblasten wurde das Nährmedium einer 15 cm Zellkulturschale vollständig entfernt und durch 8 ml Trypsin/EDTA ersetzt. Sobald sich der Zellrasen ablösen ließ, wurde das Trypsin durch Zugabe von 8 ml Fibroblasten-Medium inaktiviert. Die Zell-Suspension wurde aufgenommen, 2 Minuten bei 1.200 UpM zentrifugiert, in Einfriermedium resuspendiert und auf Kryoröhrchen verteilt. Die Zellen können kurzfristig bei -20°C und langfristig bei -80°C gelagert werden.

### **3.12.3 Kultivierung von Maus-Fibroblasten**

Eingefrorene Maus-Fibroblasten wurden möglichst schnell bei 37°C aufgetaut und in 15 cm Zellkulturschalen mit 25 ml Fibroblastenmedium überführt. Nach einer Inkubation von maximal 24 Stunden wurde das Medium gewechselt. Nach weiteren 2-5 Tagen wurden Zellen subkultiviert oder inaktiviert.

### 3.12.4 Mitotische Inaktivierung von Maus-Fibroblasten

Mit MEF dicht bewachsene 15 cm Zellkulturschalen wurden mit 8 ml mitomycinhaltigem (10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) Fibroblastenmedium versetzt und für zwei Stunden inkubiert. Der Zellrasen wurde anschliessend zweimal mit 10 ml HBSS gespült und mit 25 ml ES-Zellmedium überschichtet. Nach 2-3 Stunden konnten ES-Zellen dazugegeben werden.

### 3.12.5 Kultivierung von embryonalen Stammzellen

Für die Herstellung von *Knockout*-Mäusen wurden murine embryonale Stammzellen (ES-Zellen) von 129 SV-Mäusen verwendet. ES-Zellen werden aus der inneren Zellmasse (ICM) von späten Blastozysten (Tag 3,5 der Embryonalentwicklung) gewonnen. Um den undifferenzierten Phänotyp dieser pluripotenten Zellen aufrecht zu erhalten, wurden die Bedingungen, unter denen die Zellen kultiviert wurden, der Zelllinie angepasst. Das bedeutet, dass die ES-Zellen auf mitotisch inaktivierten *Feeder*-Zellen kultiviert wurden; das Nährmedium wurde alle 24 Stunden gewechselt und alle 48 Stunden wurden die Zellen passagiert und auf eine neue inaktivierte *Feeder*-Zellschicht gesetzt. Der Zusatz von *myeloid Leukemia Inhibitory Factor* (LIF) zum Medium verhinderte ebenfalls eine Differenzierung der ES-Zellen.

### 3.12.6 Auftauen von ES-Zellen

ES-Zellen wurden möglichst schnell bei 37°C aufgetaut und in Zentrifugenröhrchen mit ES-Zellmedium überführt. Die Suspension wurde 2 Minuten bei 1200 UpM zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet wurde in ES-Zellmedium resuspendiert. Die Zellen wurden anschliessend auf Schalen mit inaktivierten MEF und ES-Zellmedium verteilt.

### 3.12.7 Elektroporation der ES-Zellen

Vor dem Einbringen des Targeting-Vektors in ES-Zellen, musste dieser mit *NotI* linearisiert werden. Das Plasmid wurde dabei mit 5 Units Enzym/1  $\mu\text{g}$  DNA über Nacht bei 37°C verdaut. Anschließend wurde der Ansatz ohne weitere Aufreinigung in ES-Zellen elektroporiert.

Für eine Elektroporation wurden pro Ansatz  $2 \times 10^7$  ES-Zellen benötigt. Dafür wurde bei relativ dicht bewachsenen 15 cm Zellkulturschalen 1-2 Stunden vor der Elektroporation das Medium erneuert. Die Zellen wurden dann unmittelbar vor der Elektroporation trypsiniert, gut vereinzelt und mit Hilfe eines Hemocytometers ausgezählt. Das Volumen, das die benötigte Anzahl Zellen enthielt, wurde 2 Minuten bei 1.200 UpM zentrifugiert. Das Pellet wurde mit HBSS gewaschen und in 0,6 ml HBSS resuspendiert. Die Suspension wurde mit 20  $\mu\text{l}$  (1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) linearisierten Plasmid-DNA versetzt und in eine Elektroporationsküvette gegeben. Die Elektroporation wurde bei 250 V und 500  $\mu\text{F}$  durchgeführt. Unmittelbar nach der Elektroporation wurde die Küvette für 10 Minuten bei 4°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit ES-Zellmedium aus der Küvette gespült und auf 15 cm Zellkulturschalen mit inaktivierten MEF und ES-Zellmedium überführt. Nach 24 Stunden wurde das ES-Zellmedium durch Selektionsmedium ersetzt. Während der weiteren Selektionszeit von 9-10 Tagen wurde täglich das Medium gewechselt. Die im Medium enthaltenen Wirkstoffe Neomycin (positive Selektion) und FIAU (negative Selektion) führten zum Absterben der meisten nicht homolog rekombinierten Zellen. Nur Zellen und Zellklone, die das Gen für Neomycinresistenz aber nicht die HSV-TK-Kassette aufgenommen hatten, überlebten. Darunter befanden sich auch Zellen, bei denen eine homologe Rekombination stattgefunden hatte.



### 3.12.8 Isolierung rekombinanter ES-Zellklone

Nach 9-10 Tagen Selektion wurde das Medium von den ES-Zellkulturschalen entfernt und durch HBSS ersetzt. Überlebende Klone wurden mit einer Glaskapillare gepickt und einzeln in eine Vertiefung einer 24-Well-Zellkulturplatte überführt, in der sich bereits ein Tropfen Trypsin/EDTA befand. Die Zellen wurden mit 1 ml ES-Zellmedium vereinzelt. Nach Zugabe von *Feeder*-Zellen wurden die gepickten Klone unter Standardbedingungen inkubiert. Nach 24 Stunden wurde das Medium erneuert und nach weiteren 2-3 Tagen wurden die Zellen trypsiniert und in 1 ml Einfriermedium aufgenommen. Davon wurden 750  $\mu$ l eingefroren und bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert. Die restlichen 250  $\mu$ l wurden für weitere 7-10 Tage auf den 24-Well-Platten inkubiert, bis sie groß genug waren für eine DNA-Präparation.

### 3.12.9 DNA-Präparation aus rekombinanten Zellklonen

Für die Isolierung der DNA aus Zellklonen wurde zunächst das Medium entfernt und durch 0,6 ml Lysis-Puffer ersetzt. Nach einer Inkubationszeit von wenigen Minuten bei Raumtemperatur lösten sich die Zellen von Plattenboden. Die Suspension wurde in sterile 2 ml Gefäße überführt und 2-24h bei  $55^{\circ}\text{C}$  inkubiert. Anschließend wurde die DNA durch Zugabe von Natriumchlorid und Ethanol gefällt und gereinigt. Die Vorgehensweise entspricht dabei der Vorschrift aus Sambrook *et al.* (Sambrook *et al.*, 1989)

### 3.13 *Southern blots*

Verwendete Lösungen:

Depurinierung:	0,25 M HCl
Denaturierung:	0,5 M NaOH 1,5 M NaCl
Neutralisation:	0,5 M Tris-HCl 1,5 M NaCl
20x SSC (pH 8):	3 M NaCl 300 mM Natriumcitrat-Dihydrat
Maleinsäurepuffer (pH 7,5):	10 mM Maleinsäure 150 mM Natriumchlorid
10x Blockierungspuffer:	10% Blockierungsreagenz in Maleinsäurepuffer
Hybridisierungspuffer:	0,2% (w/v) SDS 5x SSC 10% 10x Blockierungslösung 1% (w/v) N-Lauroylsarcosin
Waschpuffer:	0,3% Tween 20 in Maleinsäurepuffer

---

Detektionspuffer:	100 mM Tris-HCl
	50 mM NaCl
	25 mM MgCl <sub>2</sub> (pH 9,5)

Die nicht-radioaktive Sonde wurde durch PCR auf PAC-Klon DNA nach dem im Abschnitt mit 3.6 beschriebenen Schema nach Angaben des Herstellers mit DIG-markierten Primern hergestellt. Die aus rekombinanten Zellklonen isolierte und aufgereinigte DNA wurde über Nacht mit *EcoRI* verdaut und anschließend auf einem 0,8% Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Anschließend wurde der Blot nach folgendem Schema vorbereitet: Das Gel wurde zunächst 10 Minuten im Depurinierungspuffer und anschließend für 30 Minuten in Denaturierungspuffer inkubiert. Anschließend wurde das Gel 30 Minuten in Neutralisationspuffer gewaschen. Nach einem Äquilibrationsschritt in 10x SSC wurde die DNA mittels Vakuumblot (1,5 Stunden bei 5 bar) oder Kapillarblot (über Nacht) auf eine Nylonmembran transferiert. Durch UV-Kreuzvernetzung wurde die DNA auf der Membran immobilisiert. Unspezifische Bindungen der Sonde wurden durch eine Inkubation in Hybridisierungspuffer ohne Sonde für eine Stunde bei 72°C blockiert. Die anschließende Hybridisierung mit der denaturierten Sonde erfolgte über Nacht bei 72°C. Am nächsten Morgen wurde die Membran einmal für 20 Minuten bei Raumtemperatur in 2x SSC/1% SDS und anschließend sechs Mal für 10 Minuten bei 72°C in 0,2x SSC/0,1% SDS stringent gewaschen. Nach einem kurzen Äquilibrationsschritt bei Raumtemperatur in Maleinsäurepuffer wurden unspezifische Bindungen des Antikörpers durch eine Stunde Inkubation in Blockierungslösung blockiert. Nach Zugabe des Antikörpers wurde die Membran eine weitere Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Die Membran wurde danach dreimal für 20 Minuten in Waschpuffer gewaschen und anschließend kurz in Detektionspuffer äquilibriert. Nach einer Inkubation von fünf Minuten mit verdünntem CDP-Star (1:100 in Detektionspuffer) wurde die entstehende Chemilumineszenz durch Auflegen eines Hyperfilms detektiert und dokumentiert.

### 3.14 Karyotypbestimmung

Verwendete Lösungen:

Demecolcine-haltige Lösung: 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Demecolcine  
in HBSS

Fixierlösung: 3 Teile Methanol  
1 Teil Essigsäure  
frisch ansetzen und auf  $-20^\circ\text{C}$  kühlen

Um die Anzahl störender *Feeder*-Zellen möglichst gering zu halten, wurden die ES-Zellen hierfür auf Zellkulturschalen kultiviert, die zuvor mit Gelatine beschichtet worden waren. Bei ausreichend hoher Zelldichte wurden die Zellen für 45 min in Demecolcine-haltigem Medium inkubiert. Da Demecolcine wie ein Spindelgift wirkt, wird durch diese Behandlung die mitotische Teilung der Zellen in der Metaphase angehalten. Die Zellen wurden anschließend mit HBSS gespült, trypsiniert und abzentrifugiert (2 min, 1.200 UpM). Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet wurde in hypotoner (0,56%) Kaliumchlorid-Lösung resuspendiert. Nach 10 Minuten wurde die Suspension erneut zentrifugiert (2 min, 1.200 UpM). Die Zellen wurden danach in 2-3 ml Fixierlösung resuspendiert. Nach einer Inkubationszeit von fünf Minuten und erneuter Zentrifugation wurde dieser Schritt noch 2-3 Mal wiederholt. Danach wurde das Pellet in 1 ml Fixierlösung resuspendiert, mit einer Pasteurpipette aus Glas aufgenommen und aus 20 cm Höhe auf unbeschichtete Objektträger getropft. Dadurch sollten Zellkernmembranen platzen und die Chromosomen punktuell als Spread auf dem Objektträger freigesetzt werden. Nach dem Verdampfen der Fixierlösung bei Raumtemperatur wurden die Objektträger für eine Minute in Giemsa-Lösung getaucht und anschließend mit Leitungswasser entfärbt. Die abschließende Zählung der Chromosomen erfolgte mikroskopisch.

### 3.15 Generierung chimärer Mäuse

Zur Generierung chimärer Mäuse wurden ES-Zellen durch Mikroinjektion in Blastocysten von CD1 oder C57Bl/6J Mäusen eingebracht oder es wurden ES Zellen mit Morulae der oben genannten Tiere im 4-8 Zellstadium aggregiert. In beiden Fällen wurden die benötigten Embryonen aus superovulierten Weibchen entnommen. Dazu wurde vier bis sechs Wochen alten CD1 oder C57BL/6J Weibchen intraperitoneal PMS (Pregnant Mares Serum) (CD1 10 Units pro Tier, C57BL/6J 5 Units pro Tier) gespritzt. 47 Stunden später wurde ihnen ebenfalls intraperitoneal HCG (Humanes Choriongonadotropin) (CD1 10 Units pro Tier, C57BL/6J 5 Units pro Tier) verabreicht. Die Tiere wurden anschließend verpaart. Ein bis zwei Tage später wurden die Embryonen entnommen und der gewählten Methode entsprechend weiter verarbeitet. Morulae und Blastocysten wurden in den Uterus von CD1 Weibchen retransferiert, bei denen durch Verpaarung mit vasktomierten Männchen eine Scheinträchtigkeit induziert worden war. Die Mikroinjektion und der Retransfer erfolgten in Kooperation mit Jürgen Schmidt und Charlotte Schick aus dem Haus für Experimentelle Therapie in Bonn. Die Aggregation der Zellen und deren Retransfer wurden von Anne Zimmer aus der Molekularen Neurobiologie der Uni Bonn durchgeführt.

# Kapitel 4

## Ergebnisse

### 4.1 Immunhistochemie und *In situ*-Hybridisierung zur Untersuchung der Expression von NKB im Gehirn von Ratten und Mäusen

#### 4.1.1 Auswahl der Primärantikörper und Überprüfung ihrer Spezifität

Ein Ziel dieser Arbeit war es, die Expression und Verteilung des Tachykinins NKB in Mäusen zu untersuchen. Da zunächst eine Lokalisierung des Peptids im Vordergrund stand, musste ein geeigneter Antikörper und die dazu passende immunhistochemische Methode sowie die geeignete Fixierung des Gewebes ausgewählt werden.

Es standen zwei Primärantikörper zur Verfügung. Einer dieser Primärantikörper (NKB-IgY) war gegen das Tachykinin NKB gerichtet und wurde aus Hühnereigelb isoliert. Der andere Primärantikörper (pep2), wurde aus dem Serum von Kaninchen gewonnen und war gegen einen Teil des Tachykinin-Vorläuferproteins gerichtet (Abb. 4.4). Der pep2-Antikörper wurde freundlicherweise von Dr. James Krause, Neurogen Corporation, Banford, Conneticut, USA zur Verfügung gestellt.

Im folgenden Abschnitt wird zunächst das Ergebnis der Aufreinigung des

Hühnerantikörpers mittels Ammoniumsulfatfällung beschrieben. Anschliessend wird anhand von Ergebnissen mit verschiedenen immunhistochemischen Methoden ein Antikörper für die folgenden Untersuchungen ausgewählt und seine Spezifität überprüft.

### **Aufbereitung des Primärantikörpers aus Hühnereigelb**

Zu Beginn dieser Arbeit war kein kommerzieller Antikörper gegen NKB in murinem Gewebe erhältlich. Daher wurde die Firma Eurogentec beauftragt einen geeigneten Primärantikörper herzustellen. Dazu wurden von der Firma zwei Hennen hyperimmunisiert. Das Antigen, das dazu verwendet wurde, enthielt die synthetisch hergestellte Sequenz des murinen NKB Peptids.

Hyperimmunisierungsschritt	Datum
Impfung	03.12.2001
<i>Boost 1</i>	24.12.2001
<i>Boost 2</i>	21.01.2002
<i>Boost 3</i>	18.02.2002

Tabelle 4.1: **Zeitliche Abfolge der Impfung und Boosts** Drei Wochen nach der ersten Impfung wurden drei weitere *Boosts* im Abstand von vier Wochen durchgeführt.

Die Eier der immunisierten Tiere wurden täglich eingesammelt und das daraus gewonnene Eigelb in Fraktionen eingefroren. Bis zu diesem Punkt wurden alle Schritte von der Firma Eurogentec durchgeführt. Die Aufreinigung der Antikörperfraktion erfolgte anschliessend im Labor der Molekularen Neurobiologie in Bonn.

Zeitraum	Bezeichnung des Huhns	Bezeichnung der Fraktion	IgY Konzentration in $\mu\text{g}/\mu\text{l}$
12.2001 - 25.01.2002	146	1.1	5,28
26.01.2002 – 08.02.2002	146	1.2	3,60
09.02.2002 – 22.02.2002	146	1.3	13,76
23.02.2002 – 08.03.2002	146	1.4	25,12
09.03.2002 – 22.03.2002	146	1.5	17,28
23.03.2002 – 05.04.2002	146	1.6	25,20
12.2001 - 25.01.2002	147	2.1	3,60
26.01.2002 – 08.02.2002	147	2.2	2,40
09.02.2002 – 22.02.2002	147	2.3	14,24
23.02.2002 – 08.03.2002	147	2.4	26,64
09.03.2002 – 22.03.2002	147	2.5	17,20
23.03.2002 – 05.04.2002	147	2.6	15,28

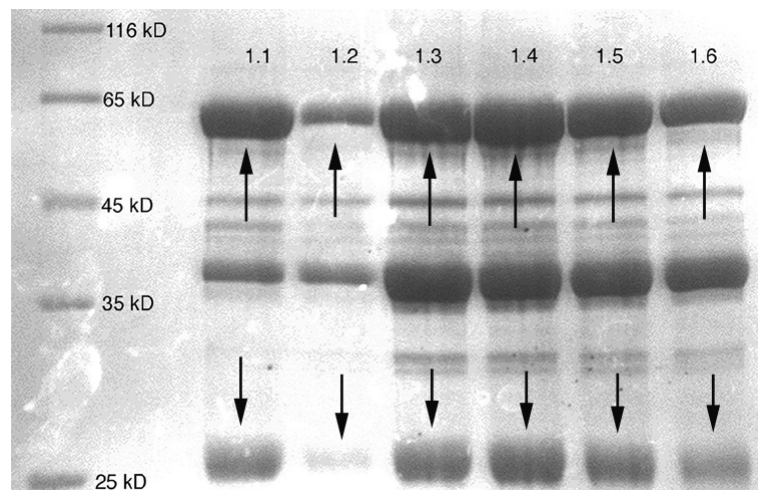
Tabelle 4.2: **Übersicht über die verwendeten Eigelbfraktionen**  
Neben dem Zeitraum, in dem das Eigelb gesammelt wurde, werden auch die Bezeichnung und die Konzentration an IgY in den einzelnen Fraktionen aufgelistet.

Aus dem Eigelb der immunisierten Hennen wurden Antikörper durch Fällung mit Ammoniumsulfat und anschließender Dialyse (Abschnitt 3.8.2) isoliert. Nach der Dialyse wurde die Proteinkonzentration photometrisch bestimmt. Da aber durch eine photometrische Bestimmung die Gesamtkonzentration an Proteinen erfasst wird, war aus diesen Ergebnissen noch keine Aussage über die Reinheit ableitbar. Daher wurden die aufgereinigten Fraktionen durch diskontinuierliche SDS-PAGE aufgetrennt.

Unter denaturierenden Bedingungen zerfallen Immunglobuline, zu denen auch die Antikörper aus Hühnereigelb (IgY) gehören, in eine leichte und in eine schwere Kette. Daher ist auf dem Polyacrylamidgel (Abb. 4.1), das nach der Aufreinigung



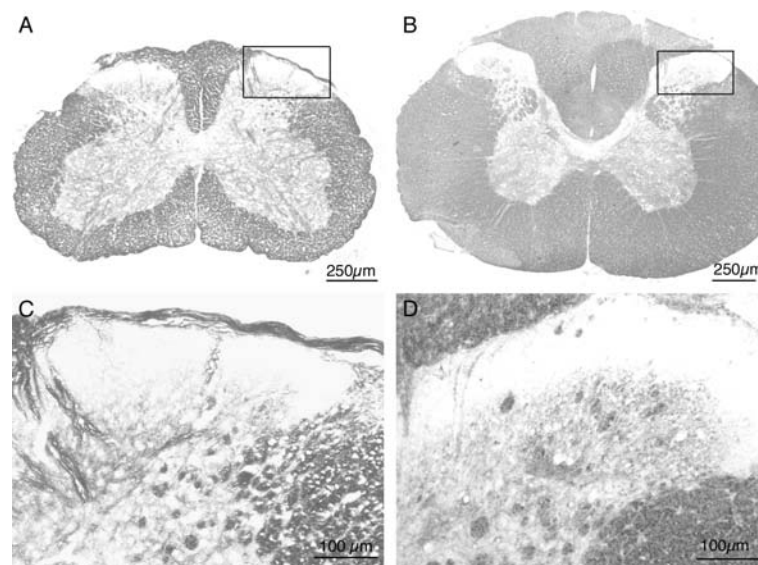
gemacht wurde, auch keine Bande bei 180 kD für das native Antikörperprotein zu sehen, sondern eine Bande bei 64 kD für die schwere Kette und eine Bande bei 25 kD für die leichte Kette. Wie auf dem Gel zu erkennen ist, stellen diese beiden Banden die Hauptbestandteile der aufgereinigten Fraktion dar. Die Bande bei 35 kD ist auf eine Verunreinigung durch Proteine aus dem Eigelb zurückzuführen, die sich nicht durch eine Ammoniumsulfatfällung abtrennen lassen. Um welche Proteine es sich dabei handelt, ist in der Literatur bisher noch nicht beschrieben worden.



**Abb. 4.1: Polyacrylamidgel nach der IgY-Aufreinigung** Die Banden bei 65 kD und 25 kD entsprechen der schweren und der leichten Kette des Proteins

### Immunhistochemie mit dem NKB-IgY Antikörper an Schnitten aus dem Rückenmark von Mäusen

Rückenmark von Mäusen wurde wie im Abschnitt 3.9.1 und 3.10 beschrieben entnommen, fixiert und gefärbt. Die Färbung wurde mit allen Fraktionen der aufgereinigten Antikörpern durchgeführt. In anderen immunocytochemischen Untersuchungen war bereits NKB in *Lamina II* des Rattenrückmarks nachgewiesen worden (McLeod *et al.*, 2000). Im Gegensatz dazu konnten mit dem Antikörper aus Hühnereigelb in dieser Region keine spezifischen Signale gezeigt werden (Abb. 4.2), obwohl die Affinität des Antikörpers zuvor von Eurogentec durch einen ELISA-Test bestätigt worden war. Es gab sowohl bei Kryoschnitten also auch bei den Paraffinschnitten Schwierigkeiten mit unspezifischer Hintergrundfärbung in der weissen Substanz. Die Spezifität der Bindung ließ sich trotz verschiedener Optimierungsversuche (Anpassung der Konzentration des Primärantikörpers, Verlängerungen der Inkubationszeiten) nicht erhöhen.



**Abb. 4.2: Immunhistochemie mit NKB-IgY an Querschnitten aus dem Rückenmark von Mäusen** Der Antikörper aus Hühnereigelb zeigt eine starke Hintergrundfärbung auf Paraffinschnitten (A+C) und Kryoschnitten (B+D); C und D zeigen Ausschnitte aus dem Hinterhorn des Rückenmarks bei höherer Vergrößerung.

### Immunhistochemie mit dem pep2-Antikörper an Paraffinschnitten aus dem Rückenmark von Mäusen

Querschnitte aus dem Rückenmark von Mäusen wurden wie in Abschnitt 3.9.2 und 3.10 beschrieben hergestellt und nach der Inkubation mit dem pep2-Antikörper gefärbt. Spezifische Signale konnten wie erwartet (McLeod *et al.*, 2000) in der *Lamina II* des dorsalen Horns im Rückenmark nachgewiesen werden (Abb. 4.3). Die unspezifische Hintergrundfärbung war gering. Da dieser Antikörper also geeigneter war als der Antikörper aus Hühnereigelb, wurde er in allen folgenden immunhistochemischen Untersuchungen verwendet.

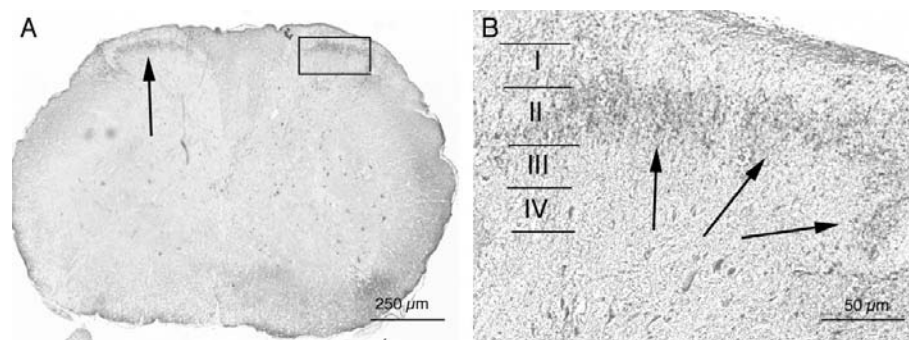


Abb. 4.3: **Immunhistochemie mit pep2-Antikörper an Querschnitten aus dem Rückenmark von Mäusen** A: Der Antikörper zeigt kaum Hintergrundfärbung. B: Bei höherer Vergrößerung des markierten Ausschnittes aus A ist die spezifische Färbung der *Lamina II* des dorsalen Horns noch deutlich erkennbar. Die verschiedenen *Laminae* sind mit I-IV gekennzeichnet.

### Überprüfung der Spezifität des pep2-Antikörpers

Der pep2-Antikörper wurde, wie bereits erwähnt, aus Kaninchenserum isoliert. Zur Hyperimmunisierung der Kaninchen wurde ein Teil des NKB-Vorläuferproteins aus der Ratte benutzt, der bereits zuvor von Marksteiner *et al.* als pep2 bezeichnet worden war (Marksteiner *et al.*, 1992). Die Homologie des Rattenpeptids zum entsprechenden Teil des murinen Vorläuferproteins ist mit 93% zwar sehr hoch (Abb. 4.4), da aber die Sequenz der Proteine nicht vollständig

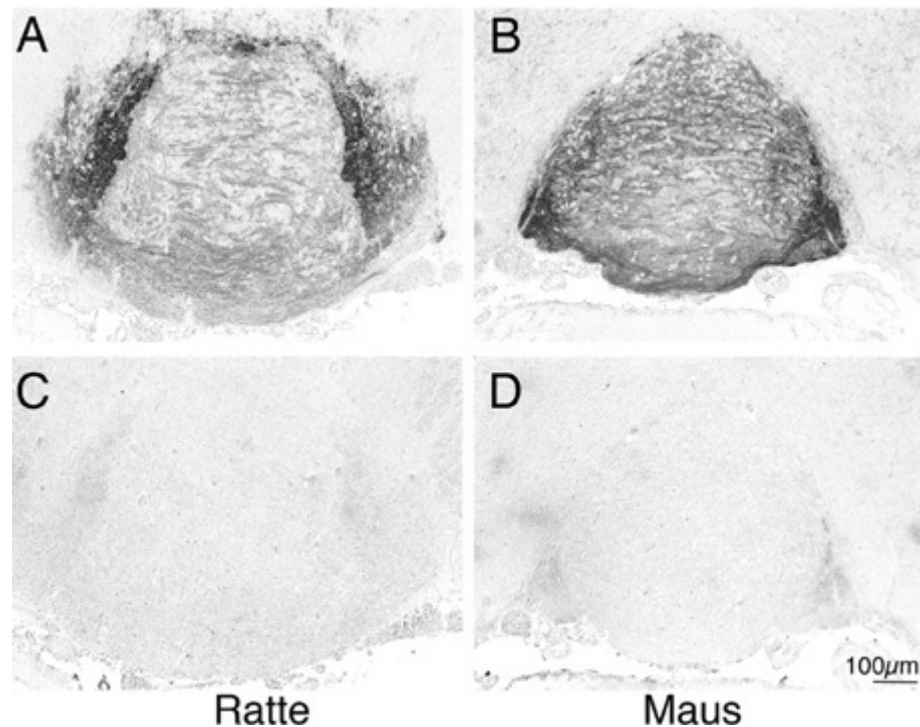
übereinstimmt, können bei der Anwendung auf murinen Gewebeschnitten unspezifische Färbungen auftreten oder spezifische Reaktionen ausbleiben.



**Abb. 4.4: Vergleich der Aminosäuresequenz des Präprotachykinin B von Ratten und Mäusen** Zwischen der Aminosäuresequenz des Präprotachykinins von Ratten und Mäusen besteht eine hohe Homologie. Im Bereich der pep2-Sequenz, der Zielsequenz für den Antikörper aus Kaninchenserum, weichen zwei Basen ab. Die NKB-Sequenz dagegen (Zielsequenz für Antikörper aus Eigelb) stimmt bei Ratten und Mäusen vollständig überein.

Um die Spezifität des pep2-Antikörpers auf murinen Schnitten zu testen, wurde das pep2-Antiserum mit verschiedenen Konzentrationen an Rattenpeptid, wie im Abschnitt 3.10.1 beschrieben, präadsorbiert. Dabei wird der pep2-Antikörper konzentrationsabhängig mit Protein gesättigt, bis schließlich kein immunhistochemisches Signal mehr zu erkennen ist. Die Färbung wurde auf Schnitten aus Ratten- und Mausgehirn, wie im Abschnitt 3.10 beschrieben, durchgeführt. Als Testgewebe wurde der *Nucleus interpeduncularis* beider Spezies ausgewählt, da hier mit diesem Antikörper bei Ratten bereits ein intensives Signal in Nervenfasern beschrieben worden war (Marksteiner *et al.*, 1992). Wie in Abb. 4.5 A und B zu sehen ist, war bei Ratten und Mäusen NKB im *Nucleus interpeduncularis* mit dem pep2-Antikörper immunhistochemisch nachweisbar. Nach der Präadsorption wurde, wie erwartet, eine konzentrationsabhängige Intensitätsabnahme des Signals beobachtet. Ab einer Proteinkonzentration von  $100\mu\text{M}$  wurde mit diesem Antikörper in beiden Geweben kein Signal mehr detektiert (Abb. 4.5 C und D),

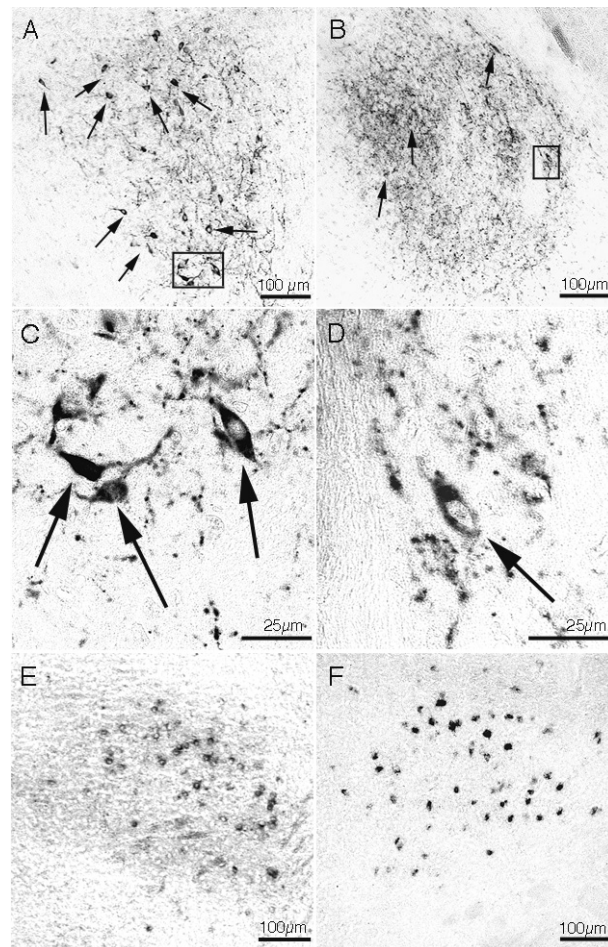
weil der Antikörper ab dieser Konzentration vollständig mit dem Protein gesättigt war. Daraus folgt, dass Färbungen mit diesem Antikörper bei Anwendung der oben beschriebenen immunhistochemischen Methode nur auf spezifische Antigen-Antikörper zurückzuführen sind.



**Abb. 4.5: Spezifität des pep2-Antikörpers** pep2-Immunoreaktivität im *Nucleus interpeduncularis* von Ratten (A) und Mäusen (B); nach der Präadsorption des pep2-Antikörpers mit dem Rattenprotein ( $100\mu\text{M}$ ) ist im *Nucleus interpeduncularis* von Ratten (C) und Mäusen (D) kein Signal mehr zu erkennen. Der Längenstandard in D gilt für alle Bilder der Abbildung.

Weiterhin wurde beobachtet, dass der pep2-Antikörper das Tachykinin-vorläuferprotein in Zellkörpern und Fasern von Maus- und Rattengehirnen qualitativ gleichermaßen gut nachweist. Es fiel jedoch auf, dass die Anzahl der detektierten Perikarya im Mausgewebe durchgehend geringer war als im Rattengehirn. Ein Beispiel wird in Abb. 4.6 gezeigt. In der *Amygdala* von Mäusen und Ratten konnte das pep2-Peptid in Fasern und Zellkörpern nachgewiesen werden. Auf Schnitten aus Rattengehirnen werden in dieser Region viele Fasern und Zellen angefärbt (Abb. 4.6 A und C). In der zentralen *Amygdala* von Mäusen dagegen

konnten zwar viele Fasern aber nur wenige Zellkörper angefärbt werden (Abb. 4.6 B und D). Da in beiden Geweben Tac2 mRNA exprimierende Zellen durch *in situ*-Hybridisierung detektiert werden konnten (Abb. 4.6 E und F), ist die geringere Anzahl der Zellkörper mit pep2-immunoreaktivität (pep2-IR) im Gehirngewebe von Mäusen somit nicht auf eine fehlende Tac2 Expression zurückzuführen.



**Abb. 4.6: Geringere Anzahl an Zellkörpern mit pep2-IR in der Amygdala von Mäusen**  
A+C: pep2-IR in Fasern und Zellkörpern der zentralen *Amygdala* von Ratten; B+D: Ein dichtes Netzwerk an Fasern mit pep2-IR wurde in der *Amygdala* von Mäusen angefärbt, die Anzahl der angefärbten Zellkörper dagegen ist geringer als bei Ratten. Die Pfeile zeigen auf pep2-positive Zellen; Die eingerahmten Bereiche in A und B sind in C und D bei höherer Vergrößerung dargestellt. E+F: *In situ*-Hybridisierungssignale in der zentralen *Amygdala* von Ratten (E) und Mäusen (F)

#### 4.1.2 Spezifität der *In situ*-Sonden

Zum Nachweis von Tac2 und NK3 Transkripten wurde die Methode der *in situ*-Hybridisierung verwendet. Dazu wurden zunächst DIG-markierte Ribosonden hergestellt, die anschliessend durch eine Farbreaktion nachgewiesen werden konnten.

Die Sequenz der Tac2 Ribosonde wurde so gewählt, dass sie die mRNA Sequenz einschließt, die das pep2-Peptid und NKB codiert. Die Sonden wurden mit RNA aus Mausrückmark hergestellt. Die Homologie zur entsprechenden Sequenz in der mRNA aus Rattengewebe beträgt 94%. Aufgrund dieser hohen Homologie konnten die Sonden auch auf Schnitten von Rattengewebe verwendet werden. Es besteht aber keine Homologie zu Transkripten des Tac1 Gens von Mäusen und Ratten. Zur Herstellung der Tac2-Sonde wurden nach einer reversen Transkription die Basen 276 bis 529 der murinen cDNA Sequenz (Gene Bank accession no. NM 009312) amplifiziert.

Dazu wurden folgende Primer benutzt:

Tac2:

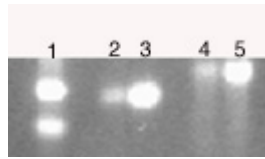
Vorwärts-Primer: 5'-CATGCTGTTTGCGGCTGTC-3'

Rückwärts-Primer: 5'-CCACAAAGAAGTCGTGCATGTC-3'

Amplikonlänge: 253 bp

Die Amplifikation wurde wie im Abschnitt 3.6 beschrieben mit *Taq*-Polymerase durchgeführt. Die Produkte wurden anschliessend in den pCRII-Vektor ligiert. Durch einen Verdau mit *EcoRI* wurde die Länge des *Inserts* überprüft. Abschliessend wurden Teile des Plasmids sequenziert, um die Orientierung des *Inserts* zu bestimmen.

Die *Sense*- und *Antisense*-Ribosonden wurden nach Angaben des Herstellers mit einem DIG RNA Labeling Kit angefertigt. Die Reinheit der Sonden wurde auf einem Agarosegel überprüft.



**Abb. 4.7: Überprüfung der Reinheit der DIG-markierten Ribosonden** 1: RNA Marker (high range), 2: Tac2 Sense, 3: Tac2 Antisense, 4: NK3 Sense, 5: NK3 Antisense

Da zwischen den mRNA Sequenzen von Tachykininrezeptoren eine hohe Homologie besteht, wurde die Sequenz für die NK3-Sonde so gewählt, dass sie sich möglichst stark von der mRNA Sequenz anderer Rezeptoren unterscheidet. Dazu wurden die Basen 286 bis 691 der murinen NK3 mRNA (Gene accession no. NM 021382) nach einer reversen Transkription mittels PCR amplifiziert. Diese Sequenz liegt in der von Exon 1 codierten Region und weist 93% Homologie zur entsprechenden mRNA Sequenz der Ratte, aber nur 30% zur mRNA Sequenz von NK1 und NK2 Rezeptoren auf.

Für die PCR wurden folgende Primer verwendet:

NK3:

Vorwärts-Primer: 5'-GGCGGAAAACCTGGACGGACGG-3'

Rückwärts-Primer: 5'-CGCCAAAGTACCACTCGCTG-3'

Amplikonlänge: 406 bp

Die Amplifikation wurde wie im Abschnitt 3.6 beschrieben durchgeführt. Mit diesen PCR-Produkten wurde analog zur Tac2-Sonde verfahren. Kontrollen zeigten, dass mit der *Sense*-Tac2-Sonde keine Signale und mit der *Sense*-NK3-Sonde nur unspezifische Signale detektiert wurden.



### 4.1.3 Expressionsmuster von NKB und NK3 in Gehirnen von Mäusen

Tachykinine werden nach der Translation in Vesikeln axonal zur Synapse transportiert, um dort bei Bedarf freigesetzt zu werden (Pennefather *et al.*, 2004).

Mit der Immunhistochemie und der *in situ*-Hybridisierung standen nun Methoden zur Lokalisierung des NKB-Vorläuferproteins und der Transkripte des Tac2 und des NK3 Gens zur Verfügung. Durch einen Vergleich der Regionen in denen Signale mit der Immunhistochemie und/oder der *in situ*-Hybridisierung erhalten wurden, konnten Rückschlüsse auf den Synthesort des Tachykinins, den Ort der Freisetzung und das Vorkommen von NK3-Rezeptoren gezogen werden. Da zu Beginn dieser Arbeit das Expressionsmuster für NKB und NK3 im Gehirn von Ratten bereits beschrieben worden war (Marksteiner *et al.*, 1992; Shugrue *et al.*, 1996), wurden Proben aus Rattengehirnen als Kontrollen für Mausproben mitgeführt. Dadurch konnte einerseits nachgewiesen werden, dass mit der angewendeten Methode die publizierten Ergebnisse reproduziert werden konnten. Andererseits konnten dadurch Ergebnisse von Ratten und Mäusen direkt verglichen werden.

Im folgenden Abschnitt werden Übereinstimmungen und Abweichungen in Projektionssystemen bei Ratten und Mäusen beschrieben. Abschliessend wurden die Muster für pep2-IR und NK3-Genexpression miteinander verglichen.

Gehirnregion	Maus				Ratte*		
	Pep2 IR		mRNA		pep2-IR	mRNA	
	Fasern, Synapsen	Perikarya	Tac2	NK3	Tac2	Tac2	NK3
<b>Telencephalon</b>							
Olfactory bulb	+	+	+	+	+	+	+
Cortex cerebri	+	+	+	+	+	+	+
Cortex piriformis	-	-	+	+	-	+	+
Tuberculum olfactorium	-	-	+	+	+	-	+
<b>Hippocampus</b>							
Stratum granulosum	-	-	-	+	+	+	+
Stratum lacunosum moleculare	-	-	-	+	+	+	+
Stratum radiatum	-	-	-	+	+	+	+
Stratum pyramidale	-	-	-	+	+	+	+
Subiculum	-	-	-	+	+	+	+
<b>Amygdala nuclei</b>							
Zentral	+	+	+	+	+	+	+
Basal	+	-	+	+	+	+	+
Medial	+	-	+	+	+	+	+
Nucleus des Tractus olfactorius lateralis	-	-	-	+	+	+	+
<b>Bed nucleus der stria terminalis</b>							
Medial	+	+	+	+	+	+	+
Lateral	+	+	+	+	+	+	+
Striatum	+	+	+	+	+	+	+
Substantia innominata/ Ventral pallidum	+	+	+	+	+	+	+
Nucleus accumbens	+	+	+	+	+	+	+
<b>Diencephalon</b>							
<b>Thalamus</b>							
Nucleus anterior dorsalis	+	-	-	+	+	-	+
<b>Habenula</b>							
Medial	+	+	+	+	+	+	+
Lateral	+	+	+	+	+	+	+
<b>Hypothalamus</b>							
<b>Area preoptica</b>							
Lateral/medial	+	+	+	+	+	+	+
Eminentia mediana	+	+	-	-	+	+	+
Nucleus arcuatus	+	+	+	+	+	+	+
Nucleus supraopticus	-	-	+	+	+	+	+
Nucleus paraventricularis	+	+	+	+	+	+	+
Nucleus Periventricularis	+	+	-	+	+	+	+
<b>Nucleus corporis mamillaris</b>							
Lateral	+	-	+	+	+	+	+
Medial	-	-	-	+	+	+	+
<b>Mesencephalon</b>							
Area tegmentalis ventralis - Nucleus interpeduncularis	-	-	-	+	+	+	+
Substantia nigra	+	-	+	+	+	+	+
Nucleus subbrachialis	+	+	+	+	+	+	+
Corpus geniculate mediale	+	+	-	+	+	+	+

Abb. 4.8: Vergleich der pep2-IR, Tac2-mRNA Expression und NK3-mRNA Expression in Gehirnen von Ratten und Mäusen \*Die Daten für das Rattengewebe basieren auf eigenen Ergebnissen, die mit Ergebnissen von Marksteiner *et al.* (1992) und Shugrue *et al.* (1996) übereinstimmen.

#### 4.1.4 Übereinstimmende Projektionssysteme in Mäusen und Ratten

Das Muster der pep2-Immunoreaktivität (pep2-IR) stimmt bei Ratten und Mäusen weitgehend überein (Abb. 4.8). Zellen und Fasern mit pep2-IR wurden in der Grosshirnrinde und im *Bulbus olfactorius* detektiert. Im *Thalamus* und *Hypothalamus* wurde bei Mäusen und Ratten ein dichtes Netz pep2-enthaltender Fasern beobachtet. Zellen mit pep2-IR wurden im *Bed nucleus* der *Stria terminalis*, in der *Area preoptica*, in der zentralen *Amygdala*, im *Nucleus arcuatus*, in der lateralen und medialen *Habenula* und im *Nucleus anterior dorsalis* detektiert. Im *Mesencephalon* wurde pep2-IR vor allem in Fasern der *Substantia nigra* und im *Nucleus interpeduncularis* nachgewiesen. Zusammen mit den Ergebnissen aus der *in situ*-Hybridisierung konnten Informationen über Projektionssysteme abgeleitet werden. Auch die Ergebnisse der *in situ*-Hybridisierung zeigten, dass das Expressionsmuster in der Maus dem in der Ratte weitgehend gleich und kaum von bereits veröffentlichten Ergebnissen abwich (Marksteiner *et al.*, 1992). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass Signale aus der *in situ*-Hybridisierung mit pep2-IR in Zellkörpern übereinstimmten.

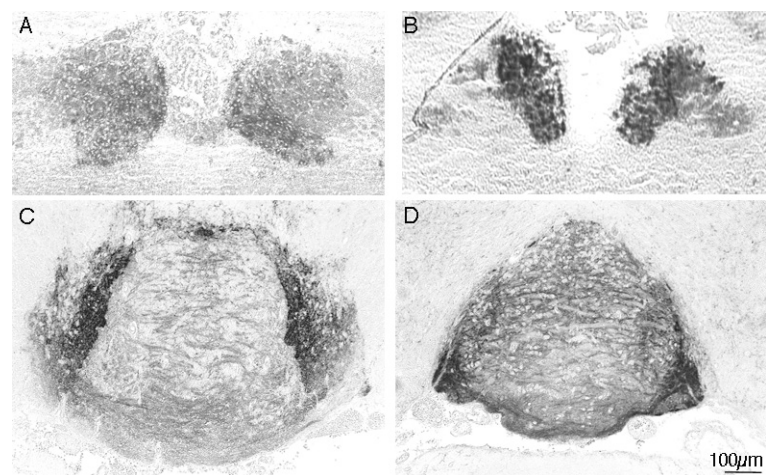
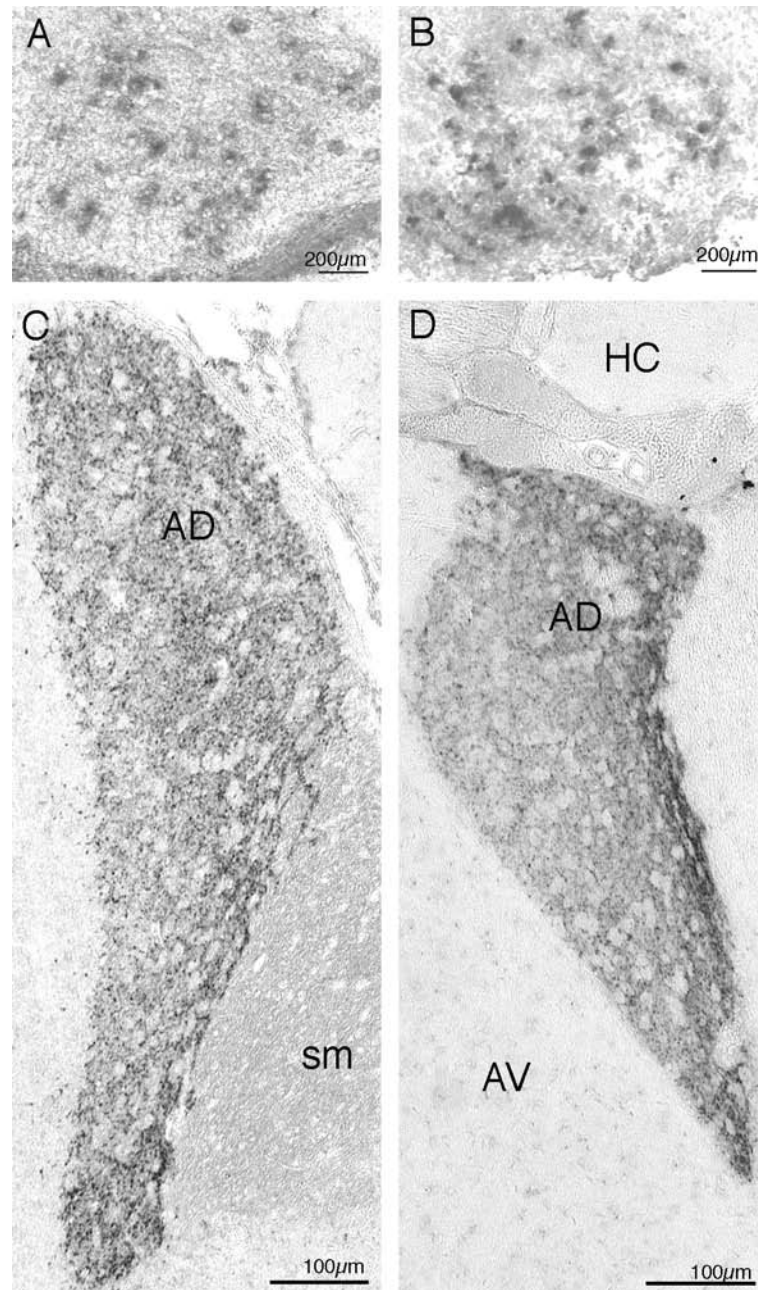


Abb. 4.9: **Tac2 mRNA-Expression in den Habenulae und pep2-IR im Nucleus interpeduncularis** A,B: Tac2 mRNA wird in den *Habenulae* von Ratten (A) und Mäusen (B) exprimiert; C,D: pep2-IR wurde im *Nucleus interpeduncularis* von Ratten (C) und Mäusen (D) detektiert. Das Längenmaß in D gilt für alle Bilder der Abbildung

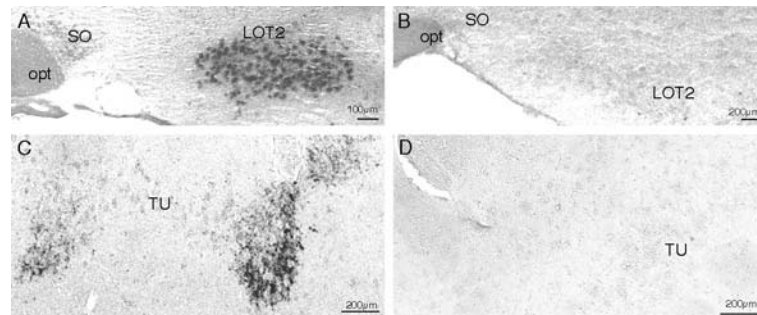


**Abb. 4.10: Tac2 mRNA-Expression im Nucleus mammillaris lateralis und pep2-IR im Nucleus anterior dorsalis** A,B: Tac2 mRNA wird im lateralen *Nucleus corporis mamillaris* von Ratten (A) und Mäusen (B) exprimiert; C,D: pep2-IR wurde im *Nucleus anterior dorsalis* von Ratten (C) und Mäusen (D) detektiert. AD *Nucleus anterior dorsalis*, sm *Stria dorsalis* des *Thalamus*, AV *Nucleus anterior ventralis* des *Thalamus*, HC *Hippocampus*

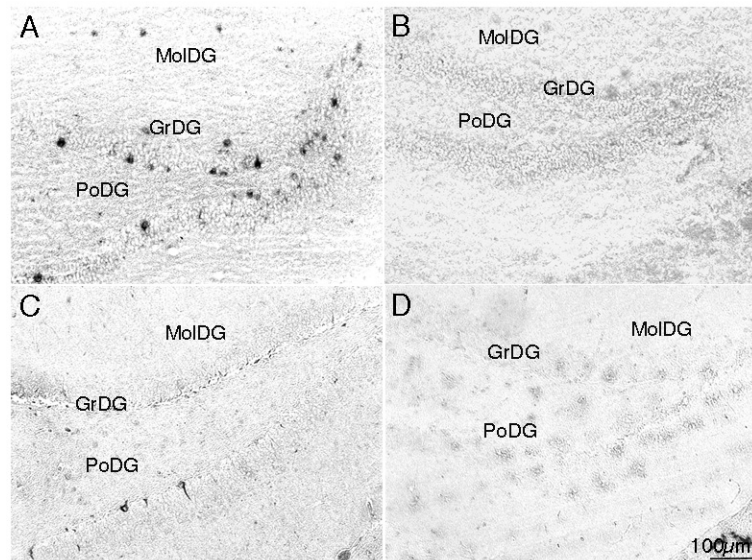
In den Projektionsgebieten der Nuclei, die Tac2 mRNA exprimierten, wurde wie erwartet pep2-IR in Fasern beobachtet. Ein Beispiel für ein übereinstimmendes Projektionsystem, in Maus und Ratte ist in Abb. 4.10 dargestellt. Tac2 mRNA wurde in den lateralen Bereichen des *Nucleus corporis mamillaris* nachgewiesen. Neurone aus dieser Region ziehen zum *Nucleus anterior dorsalis* (Gonzalo-Ruiz *et al.*, 1998), wo wie erwartet bei Mäusen und Ratten pep2-IR in Fasern nachgewiesen werden konnten. Ein weiteres Beispiel ist die Verbindung zwischen den medialen *Habenulae* und dem *Nucleus interpeduncularis* (Ciani *et al.*, 2005). In Mäusen und Ratten wurde Tac2 mRNA in der medialen *Habenulae* nachgewiesen. Neurone aus dieser Region projizieren zum *Nucleus interpeduncularis*, wo ebenfalls Fasern mit pep2-IR detektiert wurden (Abb. 4.9).

#### 4.1.5 Unterschiede in Projektionssystemen von Mäusen und Ratten

Obwohl es viele Übereinstimmungen im Expressionsmuster von NKB/Tac2 mRNA zwischen Mäusen und Ratten gab, wurden auch einige Unterschiede beobachtet. Im *Nucleus* des *Tractus olfactorius lateralis* der Ratte zum Beispiel konnte Tac2 mRNA Expression anhand eines starken Signals in der *in situ*-Hybridisierung nachgewiesen werden, wohingegen dieses Signal im entsprechenden Kern des Mausgehirns fehlt. Im Projektionsgebiet des *Nucleus* des *Tractus olfactorius lateralis*, dem *Tuberculum olfactorium* (Santiago und Shammah-Lagnado, 2004), wurden Fasern mit pep2-IR ebenfalls nur in der Ratte nachgewiesen. Bei der Maus ist im entsprechenden Kern dagegen keine Färbung zu sehen (Abb. 4.11). Ein weiteres Beispiel für Abweichungen zwischen Maus und Ratte liegt im Hippocampus vor. Ein Signal für Tac2 mRNA und pep2-IR konnte in der granulären Schicht des *Hippocampus* von Ratten nachgewiesen werden (Abb. 4.12). In der entsprechenden Region im Mausgehirn wurden dagegen keine Signale detektiert. Im *Hippocampus* der Maus scheint es also weder eine Expression von Tac2 mRNA noch eine Freisetzung oder Lagerung des NKB Peptids zu geben (Abb. 4.12).



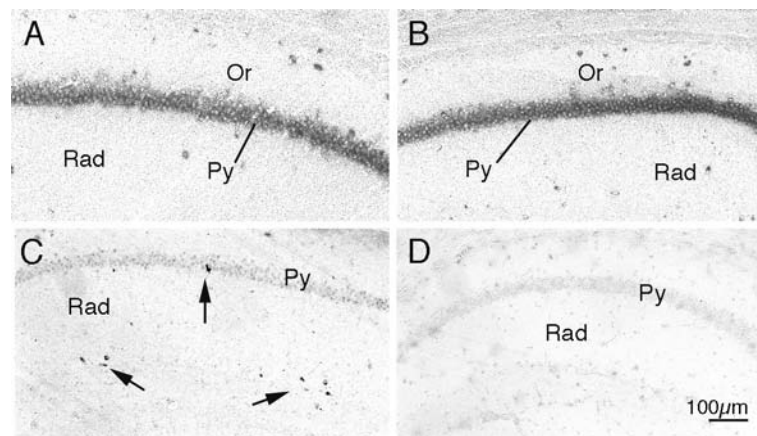
**Abb. 4.11: Tac2 mRNA Expression im Nucleus des Tractus olfactorius lateralis und pep2-IR im Tuberculum olfactorium** A-B: Ein starkes Signal für Tac2 mRNA wurde im *Nucleus des Tractus olfactorius lateralis* von Ratten (A) detektiert. Bei Mäusen (B) dagegen wurde im entsprechenden *Nucleus* keine Tac2 mRNA nachgewiesen. Im Projektionsgebiet des *Nucleus des Tractus olfactorius lateralis*, dem *Tuberculum olfactorium*, wurde entsprechend pep2-IR bei Ratten (C) aber nicht bei Mäusen (D) nachgewiesen. opt optischer Trakt, SO *Nucleus supraopticus*, LOT2 *Lamina II* des *Nucleus des Tractus olfactorius lateralis*, TU *Tuberculum olfactorium*



**Abb. 4.12: Tac2 mRNA Expression und pep2-IR im Gyrus dentatus des Hippocampus** A-B: Die Mehrzahl der Signale für Tac2 mRNA im *Hippocampus* von Ratten (A) wurde in der granulären Schicht des *Hippocampus* detektiert. In dieser Region wurden bei Mäusen (B) keine Signale nachgewiesen. C-D: pep2-IR wurde ebenfalls in Zellen der granulären Schicht des *Hippocampus* von Ratten (C) detektiert nicht aber bei Mäusen (D). MolDG molekulare Schicht des *Gyrus dentatus*, GrDG granuläre Schicht des *Gyrus dentatus*, PoDG polymorphe Schicht des *Gyrus dentatus*.

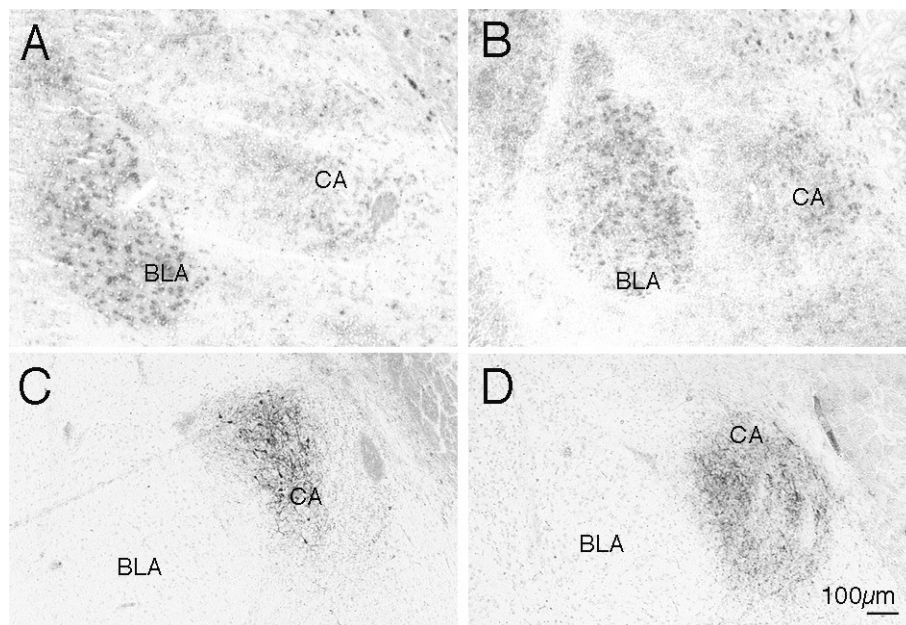
#### 4.1.6 Vergleich der pep2-IR und des NK3-Genexpressionsmusters in Mäusen und Ratten

Neurokinin B (NKB) kann, in Abhängigkeit von der Konzentration, alle drei Neurokininrezeptoren aktivieren. Die größte Affinität zeigt es jedoch zum NK3-Rezeptor (Page, 2004). Obwohl in der Literatur bereits Unterschiede in der NK3 Expression in verschiedenen Spezies beschreiben wurden (Pinto *et al.*, 2004), konnten in den vorliegenden Untersuchungen keine Unterschiede zwischen Mäusen und Ratten festgestellt werden. Expressionsmuster und die Intensität der Signale waren in Gehirngeweben von Mäusen und Ratten weitgehend gleich. Obwohl Abweichungen in der Tac2 Expression im Hippocampus auftraten, war das NK3 Expressionsmuster bei Ratten und Mäusen identisch. Besonders im *Stratum pyramidale* von Ratten und Mäusen wurde eine starke NK3 Expression beobachtet (Abb. 4.13), wohingegen nur wenige Zellen im *Stratum pyramidale* und im *Stratum radiatum* bei Ratten aber nicht bei Mäusen pep2-IR zeigten.



**Abb. 4.13: NK3 Expression und pep2-IR im CA1-Feld des Hippocampus** A-B: Starke Signale für NK3 mRNA sind in der pyramidalen Schicht des *Hippocampus* von Ratten (A) und Mäusen (B) zu erkennen; C-D: Für pep2-IR dagegen wurden nur selten Signale bei Ratten (C) beobachtet. D: Fehlende pep2-IR im *Hippocampus* von Mäusen. Rad *Stratum radiatum* des *Hippocampus*, Or *Lamina oriens* des *Hippocampus*, Py *pyramidale Schicht* des *Hippocampus*

NK3 mRNA konnte in allen Teilbereichen der *Amygdala* von Ratten und Mäusen nachgewiesen werden. Das stärkste Signal trat in der basolateralen *Amygdala* auf. Immunhistochemisch ließ sich pep2-IR aber nur in Bereichen der zentralen *Amygdala* nachweisen (Abb. 4.14). Weitere *Nuclei*, die NK3 exprimieren ohne pep2-IR zu zeigen, sind der mediale *Nucleus corporis mamillaris* und die *Area tegmentalis ventralis*.



**Abb. 4.14: NK3 mRNA Expression und pep2-IR in der Amygdala** A-B: NK3 mRNA wurde in allen Bereichen der der *Amygdala* von Ratten (A) und Mäusen (B) exprimiert. Die höchste Dichte an Signalen trat dabei im basolateralen Teil auf; C-D: pep2-IR dagegen wurde nur im zentralen Bereich der *Amygdala* von Ratten (C) und Mäusen (D) nachgewiesen. BLA basolateraler Teil der *Amygdala*, CA zentraler Teil der *Amygdala*



## 4.2 Tac2- und NK3-Genexpression in peripheren Geweben von Mäusen

Um mehr Informationen über die Tac2- und NK3-Genexpression in Mäusen zu erhalten, wurden neben dem Gehirn auch periphere Organe untersucht. Dabei stand der qualitative Nachweis und weniger die Lokalisierung von Tac2- und NK3-Transkripten im Vordergrund. Daher wurde hierfür die Methode der RT-PCR verwendet. Das Gewebe wurde wie im Abschnitt 3.7 beschrieben behandelt, um Gesamt-RNA zu isolieren und in cDNA umzuschreiben. Für die anschließende RT-PCR wurden die Primer so gewählt, dass Vorwärts- und Rückwärtsprimer möglichst nicht im selben Exon binden. So können lange PCR-Produkte, die aufgrund von Kontaminationen mit genomischer DNA entstanden sind, von den kurzen RT-PCR-Produkten unterschieden werden. Eine Ausnahme stellten die  $\beta$ -Actin Primer dar. In diesem Fall binden sowohl der Vorwärts- als auch der Rückwärtsprimer im selben Exon. Eine Unterscheidung der Produkte wäre hier aufgrund der Produktlänge nicht möglich. Zu dem Zeitpunkt, als die Methode etabliert wurde, lagen zwar Informationen über das Transkript des  $\beta$ -Actin Gens vor, die genomische Sequenz war jedoch noch nicht vollständig aufgeklärt. Daher fehlte die Information, wo die Exon/Intron-Grenzen lagen. Die Primer wurden deshalb nur aufgrund ihrer Schmelztemperatur und der Länge des Amplikons ausgewählt. Um Kontaminationen mit genomischer DNA auszuschliessen, wurde nach der Isolierung der RNA ein DNase I-Verdau durchgeführt.

Die Sequenz der verwendeten Primer lautet:

Tac2

Vorwärts-Primer: 5'-CTCAGCTTGGCTTGGACCTTC-3'

Rückwärts-Primer: 5'-GTCTCCTTTGGTCCCACGCTAG-3'

Amplikonlänge: 187 bp

NK3:

Vorwärts-Primer: 5'-TCCCATCACAGCGGTGTTT-3'

Rückwärts-Primer: 5'-GTACGGCCTGGCATGACTTT-3'

Amplikonlänge: 202 bp

$\beta$ -Actin:

Vorwärts-Primer: 5'-CACACTGTGCCATCTACGA-3'

Rückwärts-Primer: 5'-AGTGGCCATCTCCTGCTCGA-3'

Amplikonlänge: 207 bp

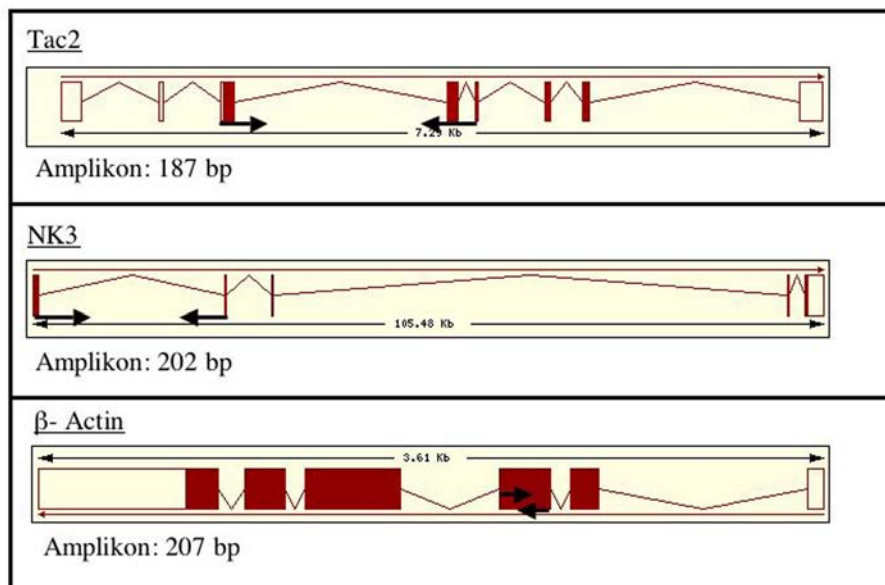
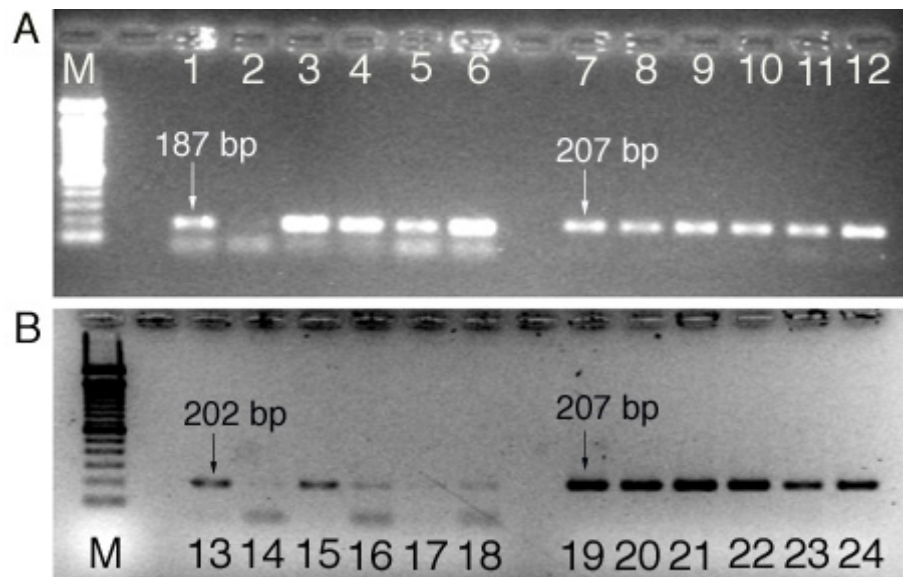


Abb. 4.15: **Schematische Darstellung der Primer-Bindungsstellen für die RT-PCR** Die Primer binden in verschiedenen Exons, so dass die kurzen RT-PCR-Produkte von den PCR-Produkten auf genomischer DNA unterschieden werden können. Da beide  $\beta$ -Actin Primer im selben Exon binden, wurde zusätzlich ein DNase I Verdau durchgeführt.

Die PCR wurde wie im Abschnitt 3.6 beschrieben durchgeführt. Für die Tac2 Primer wurde dabei eine Anlagerungstemperatur von 68°C verwendet. Die optimale Anlagerungstemperatur für die NK3 Primer lag mit 65°C etwas niedriger. Die  $\beta$ -

Actin Primer konnten bei jeder PCR als Kontrollen mitgeführt werden, da sie bei beiden Temperaturen auswertbare und reproduzierbare Ergebnisse lieferten. Eine Auswertung der PCR erfolgte über Gelelektrophorese.

Zu jeder Gewebeart wurden sechs Proben aus sechs verschiedenen Tieren (drei Weibchen und drei Männchen) untersucht. Zunächst wurde die Qualität der cDNA überprüft. Zeigte die RT-PCR für alle sechs Fälle eine eindeutige Bande für  $\beta$ -Actin im Agarosegel, so galt die Qualität der cDNA als ausreichend und die Ergebnisse für die Tac2- und NK3-Genexpression wurden ausgewertet.



**Abb. 4.16: Nachweis von Tac2 und NK3 mRNA im Rückenmark von Mäusen** A: Tac2-Proben (Proben 1-6, Produktlänge 187 bp) und  $\beta$ -Actin-Kontrollen (Proben 7-12, Produktlänge 207 bp); B: NK3-Proben (Probe 13-18, Produktlänge 202 bp) und  $\beta$ -Actin-Kontrollen (Proben 19-24, Produktlänge 207 bp). Proben aus weiblichen Tieren: 1-3, 7-9, 13-15, 19-21; Proben aus männlichen Tieren: 4-6, 10-12, 16-18, 22-24; M: 100 bp Marker

Eine Tac2- oder NK3-Genexpression galt als gesichert, wenn wie in Abb. 4.16 dargestellt, für mindestens vier der Proben (mindestens zwei Proben von Weibchen und zwei Proben von Männchen) nach der RT-PCR eine spezifische Bande im Agarosegel gezeigt werden konnte.

In der nachfolgenden Tabelle werden die Ergebnisse der RT-PCR für periphere Gewebe zusammengefasst.

Untersuchte Gewebe	Tac2-Expression	NK3-Expression
Rückenmark	+	+
Ganglion Stellatum	-	-
Auge (Retina)	+	+
Magen	-	+
Dünndarm	+	+
Dickdarm	+	+
Leber	-	-
Milz	+	-
Niere	-	-
Harnblase	-	-
Herz	-	-
Lunge	-	-
Nebenniere	+	-
Speicheldrüse	-	-
Schilddrüse	-	-
Thymus	+	-
Hypophyse	-	-
Ovar	-	+
Uterus	+	-
Plazenta	+	-
Hoden	-	-

Tabelle 4.6: **Expression von Tac2 mRNA und NK3 mRNA in peripheren Geweben der Maus** + Expression nachweisbar, - Expression nicht nachweisbar

### 4.3 Deletion des Tac2 Gens in der Maus

Eine genauere Untersuchung der Funktion des murinen Tac2-Gens sollte nach der Herstellung von *Knockout*-Mäusen erfolgen. Zunächst wurde der Gen-Locus näher untersucht: Nach Angaben der Ensembl Genome-Datenbank (<http://www.ensembl.org>) wird das murine NKB vom Tac2-Gen (ENSMUSG 00000025400) auf Chromosom 10 codiert. Es besteht aus 8 Exons und es ist nur ein Transkript (852 bp) bekannt. Nach der Translation entsteht ein Vorläuferprotein mit 116 Aminosäuren. Benachbart in 5'-Richtung liegt das Gen, das die schwere Kette des Myosin codiert (ENSMUSG 00000025401). In 3'-Richtung neben dem Tac2-Gen liegt ein Gen (ENSMUSG 00000044617), dem bisher noch kein Peptid zugeordnet werden konnte und das Gen, das das murine Adrenomedullin (ENSMUS 00000058396) codiert (Abb. 4.17).

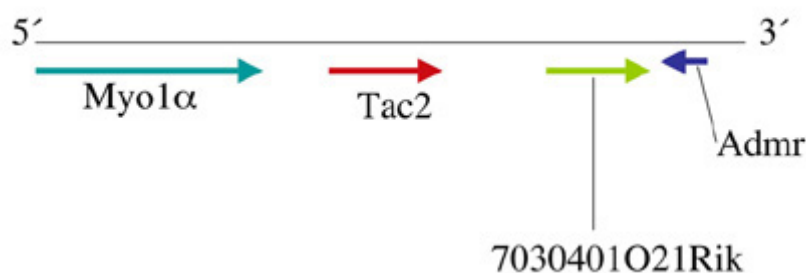
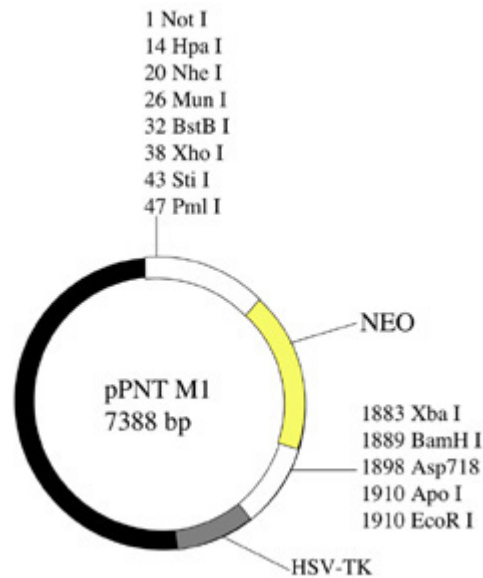


Abb. 4.17: **Schematische Darstellung eines Abschnitts aus Chromosom 10 Abschnitt D3** In 5'-Richtung neben dem Tac2 Gen liegt das Gen, das die schwere Kette des Myosin ( $Myo1\alpha$ ) codiert. Benachbart zum Tac2 Gen in 3'-Richtung liegt ein Pseudogen (7030401O21Rik) und das Gen, das Adrenomedullin (Admr) codiert.

Im folgenden Abschnitt wird beschrieben, wie ausgehend von diesen Informationen zunächst ein *Targeting*-Vektor konstruiert wurde, der eine Deletion des Gens ermöglichte. ES-Zellen, in denen nach dem Einbringen dieses Vektors durch Elektroporation eine homologe Rekombination nachgewiesen werden konnte, wurden durch Mikroinjektion in Blastozysten eingebracht oder mit Morulae aggregiert. Die daraus hervorgegangenen chimären Tiere wurden durch Verpaarung auf die Keimbahngängigkeit der homolog rekombinierten ES-Zellen überprüft.

### 4.3.1 Konstruktion eines *Targeting*-Vektors



**Abb. 4.18: Schematische Darstellung des pPNT M1-Plasmids** Die weißen Bereiche kennzeichnen die Bereiche der *Multiple Cloning Sites*, dazwischen liegt der gelb gekennzeichnete Bereich für die Neomycinresistenz. Die HSV-TK Kassette ist grau gekennzeichnet.

Ausgehend vom pPNT-M1-Plasmid (Abb. 4.18) wurde ein Vektor konstruiert, mit dessen Hilfe die Exons 1 bis 6 des Tac2-Gens ausgeschaltet werden sollten. Das Plasmid enthielt eine NEO-Kassette, die von zwei *Multiple Cloning Sites* eingerahmt wird, und eine HSV-TK-Kassette. In die *Multiple Cloning Sites* wurden zwei zur genomischen Sequenz homologe Bereiche eingefügt, wodurch später eine homologe Rekombination erst ermöglicht wird (Abb. 4.19). Die NEO-Kassette ersetzt die fehlende genomische Sequenz zwischen diesen Bereichen. Die von ihr ausgehende Neomycinresistenz wurde später als Positivkontrolle für die Integration genutzt. Die HSV-TK-Kassette dagegen enthält die Sequenz für eine *Herpes simplex* Thymidinkinase, die Nukleotidanaloga zu toxischen Produkten umsetzt, was während der Kultivierung der elektroporierten ES-Zellen als Negativkontrolle genutzt wurde.

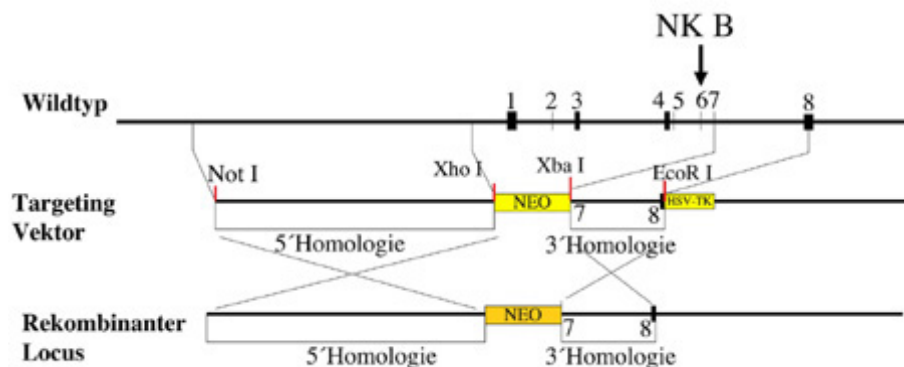


Abb. 4.19: **Schematische Darstellung der Klonierungsstrategie** Eine Sequenz aus der 3'-Region und der 5'-Region des Tac2-Gens wurden als homologe Bereiche ausgewählt, amplifiziert und in den *Targeting* Vektor kloniert. Die Sequenz zwischen diesen Bereichen soll im rekombinanten Locus durch die Neomycinresistenz ersetzt werden. Mit 1-8 sind die Exons 1-8 des Tac2 Gens gekennzeichnet, die roten Striche markieren die Schnittstellen aus den *Multiple Cloning Sites* des pPNT Vektors, die für die Klonierung genutzt wurden. Gelb markiert sind die Marker NEO und HSV-TK.

### Amplifikation der 3'-Homologie

Zu Beginn dieser Arbeit war nur wenig über das Tac2-Gen bekannt. Durch Sequenzierung genomischer DNA und einem Vergleich mit der zu diesem Zeitpunkt bereits bekannten mRNA Sequenz des Tac2-Gens konnte die NKB codierende Sequenz dem Exon 6 zugeordnet werden. Daher wurden bei der Konstruktion des *Targeting*-Vektors für die 3'-Homologie 1.998 Basenpaare ausgewählt, die teilweise die Sequenzen von Exon 7 und 8 und des dazwischen liegenden Introns einschließen. Die 3'-Homologie wurde durch PCR mit Accutaq-Polymerase wie im Abschnitt 3.6 beschrieben amplifiziert. Als Template wurde hierbei PAC-DNA eingesetzt.

Zur Amplifikation der 3'-Homologie wurden folgende Primer verwendet:

Tac2-Xba1.1: 5'-TTCTAGAACACCGACGTGGTTGAAGAGA-3'

Tac2-EcoR1.1: 5'-GGAATTCCTTAATGCAGGACACTACAGAAA-3'

Amplikonlänge: 1998bp

Die Primer enthalten neben der genomischen Sequenz zusätzliche Nukleotide für die Schnittstellen der Restriktionsendonukleasen *Xba*I und *Eco*RI, um das PCR-Produkt später gerichtet in den pPNT-M1-Vector ligieren zu können. Zur Überprüfung der Sequenz wurde das Amplikon zunächst ungerichtet in den pCRII-Vector ligiert und sequenziert. Anschließend wurde das PCR-Produkt in den noch leeren pPNT-M1-Vector eingefügt. Dazu wurden das PCR-Produkt und das Plasmid mit den Restriktionsenzymen *Eco*RI und *Xba*I verdaut und anschließend durch Gelelektrophorese und Gelextraktion aufgereinigt. Durch den Verdau entstanden überhängende Enden, die nicht kompatibel waren, wodurch eine Religation vermieden wurde. Auch am PCR-Produkt lagen nach dem Verdau überhängende Enden vor, die komplementär zu den Enden am Plasmid waren, so dass dieses Fragment nun gerichtet in den Vektor ligiert werden konnte.

### **Amplifikation der 5'-Homologie**

Für die 5'-Homologie wurde ein Bereich von 6.282 Basenpaaren in der 5'-Region oberhalb des ersten Exons gewählt. Dieser Bereich codiert, wie sich erst vor kurzem herausstellte, teilweise die schwere Kette des Myosin. Da die Gewinnung größerer DNA-Fragmente mit Sequenzen aus dem nichtcodierenden 5'-Bereich des Tac2-Gens durch PCR erfolglos war, wurden zunächst drei kleinere Teilssequenzen amplifiziert. Als Template wurde wie bei der 3'-Homologie PAC-DNA verwendet. Die drei Fragmente wurden mit Accutaq wie im Abschnitt 3.6 beschrieben amplifiziert, wobei die Magnesiumchlorid-Konzentration in diesem Fall auf 1,25 mM erhöht wurde und 1,0  $\mu$ l DMSO zu jedem Ansatz zugesetzt wurde. Folgende Primer wurden verwendet:

Amplikon 1

Not1.9F: 5'-GCGGCCGCAGGAATGCTCAGTTGATCATGAAG-3'

BspE1R: 5'-CTCGAGGAGGTCTGGGTGGTGGAGTG-3'

Amplikonlänge: 1514 bp



## Amplikon 2

BspE1F: 5'-GCTTCAACACAGCCAATCAGG-3'

BstE2R: 5'-CTCGAGGCGCGGGTCACCACC-3'

Amplikonlänge: 3535 bp

## Amplikon 3

BstE2F: 5'-CTTGACTTCTCGGAACCAGAAGAT-3'

XhoR: 5'-CTCGAGCCAGTGTTGTGGATATTTGCTGAG-3'

Amplikonlänge: 1505 bp

Auch bei diesen Primern wurden teilweise zusätzliche Nukleotide für die Schnittstellen von Endonukleasen eingefügt, um die Fragmente später gerichtet ligieren zu können. Alle Fragmente wurden einzeln in pCRII-Vektoren ligiert und sequenziert. Anschließend konnte die 5'-Homologie nach folgendem Schema zusammengesetzt werden: Die Plasmide, in die zuvor Amplikon 1 und Amplikon 2 ligiert wurden, wurden mit *XhoI* und *BspEI* verdaut. Dadurch wurde das erste Plasmid nur linearisiert, wohingegen das Amplikon 2 aus dem pCRII-Plasmid mit überhängenden Enden herausgeschnitten wurde. Das Fragment Amplikon 2 konnte nun gerichtet in das Plasmid mit Amplikon 1 ligiert werden. Anschließend wurde dieser erweiterte Vektor und das Plasmid, in das zuvor Amplikon 3 ligiert wurde, mit *BstEII* und *XhoI* verdaut. Dabei wurde das Amplikon 3 mit überhängenden Enden herausgeschnitten und der um Amplikon 1 und 2 erweiterte Vektor linearisiert. Das Fragment des Amplikon 3 wurde gerichtet in das erweiterte Plasmid ligiert. Die nun vollständig zusammengesetzte 5'-Homologie wurde durch einen Doppelverdau mit *NotI* und *Xho I* aus dem pCRII-Vektor herausgeschnitten und als zweiter Homologiebereich gerichtet in den pPNT-Vektor eingesetzt. Nach der Herstellung wurde der Vektor durch Restriktionsanalysen und durch Sequenzierung der Homologiebereiche überprüft.

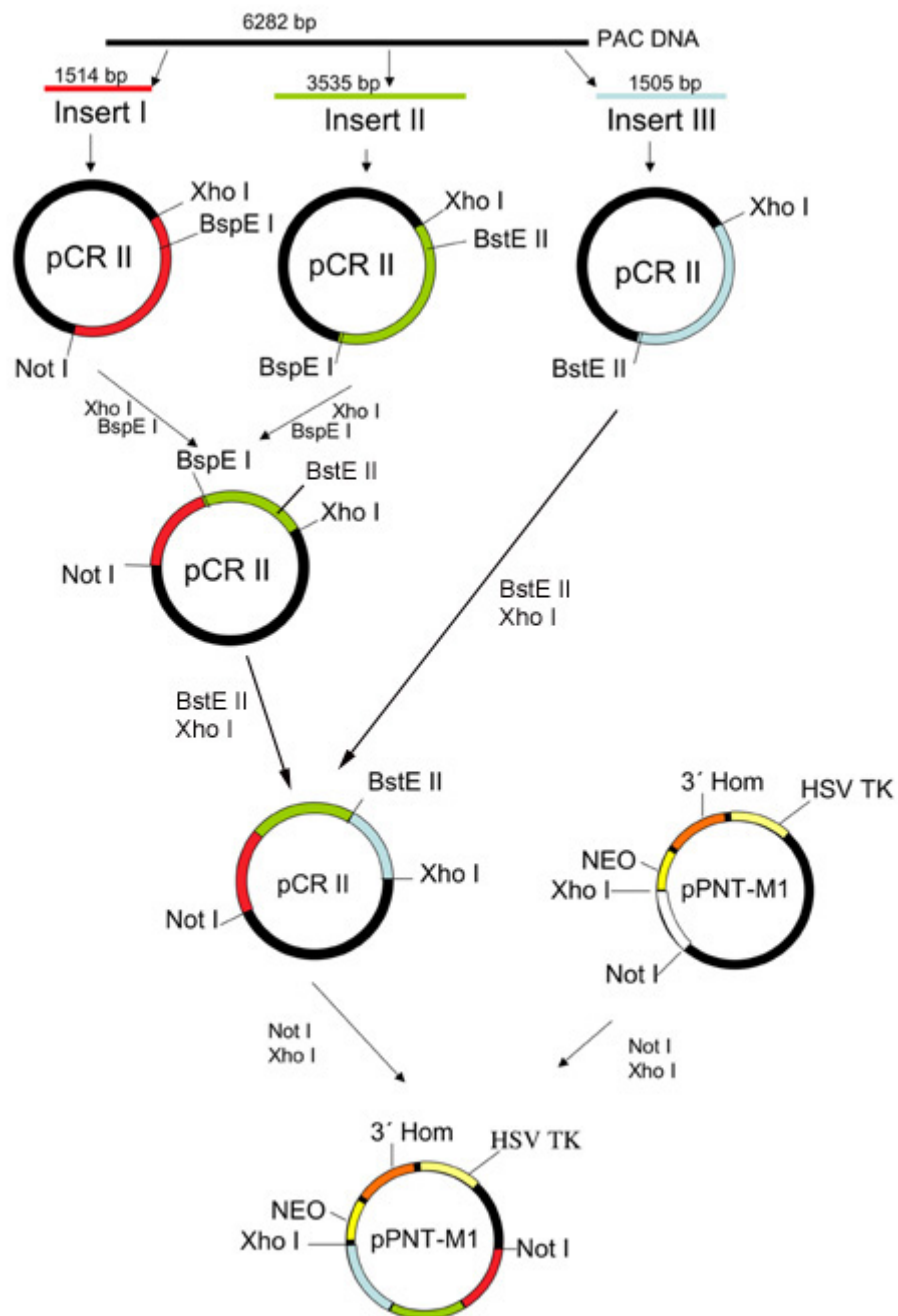


Abb. 4.20: **Schematische Darstellung der Klonierungsstrategie** Drei PCR-Produkte wurden einzeln in pCRII-Plasmide ligiert und anschließend im pPNT M1-Vektor zur 5'-Homologie zusammengesetzt

### 4.3.2 Elektroporation und chimäre Tiere

Durch Einbringen des Vektors in ES-Zellen sollte wie in Abbildung 4.19 dargestellt bei einer anschliessenden homologen Rekombination die Sequenz zwischen den beiden Homologiebereichen durch die Neomycinresistenz ersetzt werden, so dass die Herstellung des funktionsfähigen Tachykinins nicht möglich ist. Insgesamt wurden 20 Elektroporationen durchgeführt. Daraus wurden 1.512 Klone isoliert und durch *Southern Blots* und PCR auf homologe Rekombination überprüft. Die *Southern blot*-Sonde wurden durch PCR mit DIG-markierten Primern auf PAC-Klon DNA mit *Taq*-Polymerase (Abschnitt 3.6) hergestellt. Die Sonde bindet, wie in Abbildung 4.21 dargestellt, an eine Sequenz in der 3'-Region des Tac2 Gens. Die Sequenz der verwendeten Primer lautet:

3'-SondeF: 5'-CCTGGAAGGTGGTTCAGCA-3'

3'-SondeR: 5'-TTGCCATCTTCCCCAGGAT-3'

Amplikonlänge: 704 bp

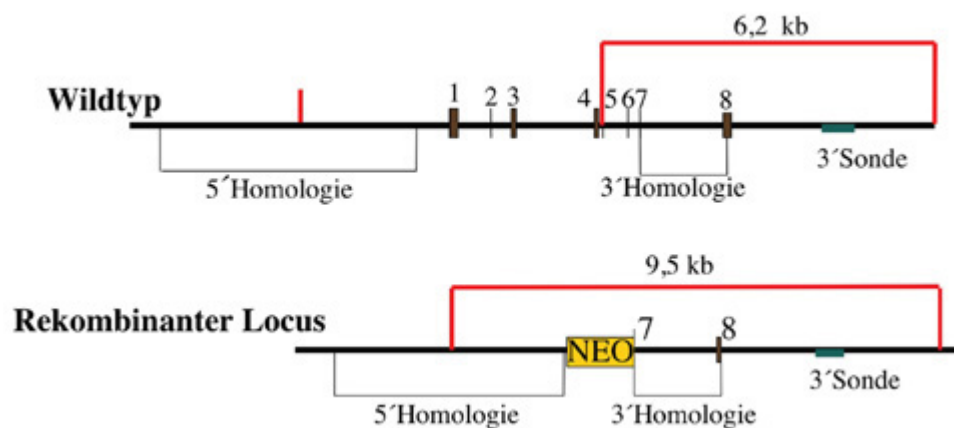


Abb. 4.21: **Schematische Darstellung des Wildtyp Locus und des rekombinanten Locus und der Bindungsstelle für die Southern Blot Sonde** Die Sonde bindet an eine Sequenz in der 3'-Region des Tac2 Gens. 1-8: Exon 1 bis 8 des Tac2 Gens; Rot markiert: *EcoRI* Schnittstellen; Grün markiert: *Southern Blot* Sonde; NEO: NEO-Kassette



Es wurden vier Klone detektiert, in denen eine homologe Rekombination stattgefunden hatte und bei denen der *Southern Blot* auf eine korrekte Rekombination hindeutete.

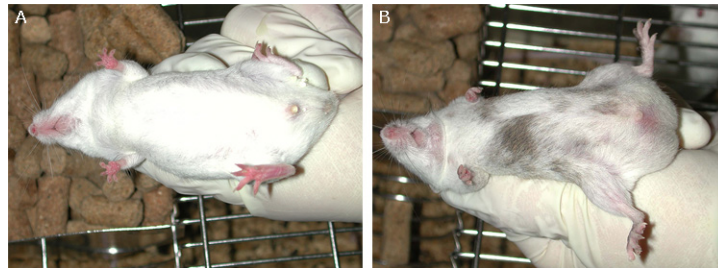
Gesamtzahl der Elektroporationen	20
Anzahl der getesteten Klone	1512
Homolog rekombinierte Klone	4

Tabelle 4.9: **Anzahl der durchgeführten Elektroporationen, die getesteten Klone und die homologe rekombinierten Klone**

Alle vier Klone, in denen eine homologe Rekombination nachgewiesen werden konnte, wurden mehrfach aggregiert und/oder injiziert. Daraus gingen 45 Nachkommen hervor, von denen 23 Tiere einen Chimäritätsgrad zwischen 10% und 70% aufwiesen.

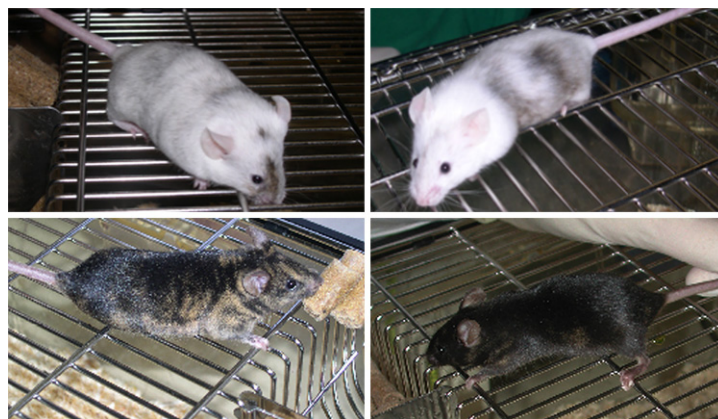
Bezeichnung des Klons	Anzahl der Retransferversuche	Anzahl der chimären Nachkommen
Tac2.7-9	16	17
Tac2.9-15	6	2
Tac2.11a-100	4	2
Tac2 EP75-49	7	2

Tabelle 4.10: **Übersicht über die Anzahl der durchgeführten Retransferversuche und die daraus hervorgegangenen Tiere**



**Abb. 4.23: Vergleich eines chimären Tieres mit einem Wildtyp-Tier** A: CD1 Männchen mit normalen Geschlechtsanlagen; B: Chimäres Tier mit verkümmerten Geschlechtsanlagen. Das Tier war nicht fertil. Von aussen betrachtet scheint es extrem vergrößerte Hoden zu haben. *Post mortem* wurde festgestellt, dass keine Hoden ausgebildet worden waren, dafür aber ein verkümmertes Uterus. Dort, wo sich die Hoden befunden hätten, befand sich bei diesem Tier nur Fettgewebe.

Tiere mit einem Chimäritätsgrad über 10% wurden verpaart. Dabei wurde beobachtet, dass die Männchen mit einem hohen Chimäritätsgrad häufig nicht fertil waren. Bei zwei dieser Männchen stellte sich *post mortem* heraus, dass es sich um Hermaphroditen handelte, die nur verkümmerte Anlagen für Geschlechtsorgane hatten. Bei den anderen Männchen konnte keine organische Störung festgestellt werden.

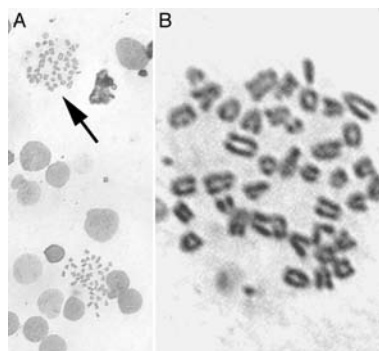


**Abb. 4.24: Chimäre Tiere** Alle vier Tiere sind durch Mikroinjektion der ES-Zellklone Tac2.7-9 und Tac2.9-15 entstanden. Die Tiere weisen einen Chimäritätsgrad von 10% bis 70% auf. Die oberen Mäuse sind durch Mikroinjektion von 129SV ES-Zellen (brauner Anteil) in CD1-Blastozysten (weisser Anteil) und die unteren durch Mikroinjektion von 129SV ES-Zellen (brauner Anteil) in C57-Blastozysten (schwarzer Anteil) entstanden.

Alle Nachkommen der Chimären zeigten die Fellfarbe des Stammes, aus dem die Blastozysten entnommen wurden. Daraus konnte geschlossen werden, dass die Deletion des Tac2 Gens nicht in die Keimbahn übergegangen war. Es sind somit noch keine heterozygoten oder homozygoten KO-Tiere vorhanden.

### 4.3.3 Karyotypbestimmung mit ES-Zellen

Da keine Chimären erhalten wurden, bei denen die Deletion des Tac2 Gens in die Keimbahn übergegangen war, mussten nachgeprüft werden, ob in einem Teilschritt der Generierung der chimären Mäuse ein Fehler vorlag oder eine Bedingung vom Optimum abwich. Um die Qualität der ES-Zellen abschätzen zu können, wurde eine Karyotyp-Bestimmung durchgeführt. Dabei wurden ES-Zellen vor der Elektroporation und die Klone, in denen eine homologe Rekombination nachgewiesen worden war, untersucht. Ein vollständiger Chromosomensatz von murinen Zellen besteht aus 40 akrozentrischen Chromosomen (Suzuki *et al.*, 1997). Je höher der Anteil der Zellen mit vollständigem Chromosomensatz ist, desto besser ist die Qualität der verwendeten ES-Zellen. Durch eine hohe Qualität erhöhen sich die Chancen, dass einige der homolog rekombinierten ES-Zellen in die Keimbahn übergehen (Suzuki *et al.*, 1997; Longo *et al.*, 1997).



**Abb. 4.25: Darstellung eines Spread zur Karyotypbestimmung** A: Zur Karyotypbestimmung wurden freiliegende *Spreads* (mit einem Pfeil gekennzeichnet) verwendet. B: Darstellung eines *Spread* bei höherer Vergrößerung. Bei dieser Vergrößerung sind die akrozentrischen Chromosomen gut zu erkennen.

Die ES-Zellen vor der Elektroporation (ES-WT) wiesen in 54% der Fälle einen Karyotyp von 40 Chromosomen auf (Abb. 4.26 A). Von den positiven Klonen zeigte einer in 42% der Fälle einen Karyotyp von 41 Chromosomen, was auf eine Trisomie hinweisen könnte (Abb. 4.26 B). Es wurde allerdings kein Karyogramm erstellt, wodurch diese Vermutung hätte bestätigt oder widerlegt werden können. Die drei anderen Klone hatten in 27-39 % der Fälle einen Karyotyp von 40 Chromosomen (Abb. 4.26 C-E). Der Anteil der Zellen mit weniger als 40 Chromosomen betrug vor der Elektroporation 38%, wohingegen er bei den ES-Zellklonen nach der Elektroporation bei 18% bis 41% lag. Bei den ES-Zellklonen waren nach der Elektroporation in 27% bis 59% der Fälle mehr als 40 Chromosomen in einem Zellkern vorhanden, wohingegen bei den Zellen vor der Elektroporation der Anteil der Zellen mit mehr als 40 Chromosomen nur bei 8% lag.

Chromosomen pro Spread	ES-WT	Tac2.7-9	Tac2.9-15	Tac2.11a-100	EP 75-49
35	0	0	1	2	2
36	0	0	5	4	4
37	2	0	4	6	6
38	12	3	9	10	8
39	24	13	22	11	14
40	54	25	27	33	39
41	6	42	15	15	22
42	1	11	10	11	2
43	1	4	5	5	7
44	0	2	2	3	2

**Tabelle 4.11: Häufigkeitstabelle zu den Ergebnissen der Karyotypbestimmung der ES-Zellen vor der Elektroporation und der Klone Tac2.7-9, Tac2.9-15, EP 75-49 und Tac2.11a-100**



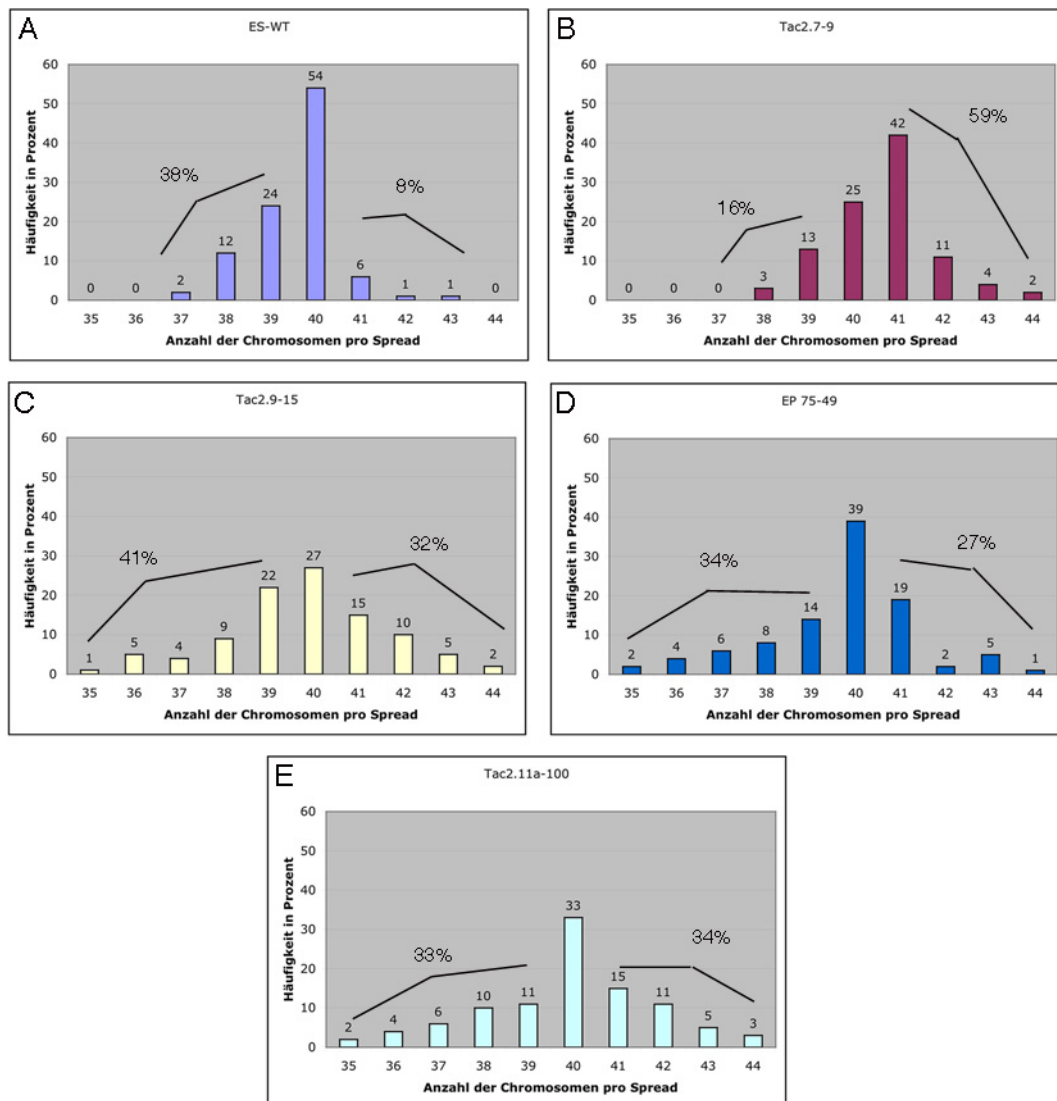


Abb. 4.26: **Übersicht über den Karyotyp der einzelnen getesteten Klone** A: Karyotyp der ES-Zellen vor der Elektroporation; B: Karyotyp des ES-Zellklons Tac2.7-9; C: Karyotyp des ES-Zellklons Tac2.9-15; D: Karyotyp des ES-Zellklons EP75-49; E: Karyotyp des ES-Zellklons Tac2.11a-100

Der hohe Anteil an Zellen mit weniger als 40 Chromosomen könnte nicht nur auf chromosomale Aberrationen zurückzuführen sein, sondern auch darauf, dass während der Durchführung der Methode auch einige Chromosomen weggespült wurden. So mussten die Chromosomen nach dem Auftropfen der Proben auf Objektträger noch angefärbt werden, wobei sich ein Wegspülen der Chromosomen

zwar einschränken aber nicht vollkommen vermeiden ließ. Zellen, die ursprünglich einen Karyotyp von 40 Chromosomen hatten, würden dann beim Auszählen weniger als 40 Chromosomen aufweisen.

Die Karyotypbestimmung, wie sie hier durchgeführt wurde, liefert daher keine absoluten Ergebnisse, sondern gibt eher eine Tendenz wider. Daher ist auch der Anteil der Zellen mit einem Karyotyp von 40 Chromosomen eher relativ zu sehen, da er bei allen Klonen unter Berücksichtigung der Ungenauigkeiten der Methode etwas grösser sein dürfte.

Anders verhält es sich dagegen mit dem Anteil an Zellen, die mehr als 40 Chromosomen enthielten. Es ist anzunehmen, dass dieser Anteil auf Fehler während der mitotischen Teilung zurückzuführen sind, da methodische Fehler (wie zum Beispiel das Anspülen von Chromosomen) in diesem Fall eher unwahrscheinlich sind. Dazu kommt noch, dass die ES-Zellen vor der Elektroporation nur zu 8% mehr als 40 Chromosomen enthielten, wohingegen dies für die Klone nach der Elektroporation in 27% bis 59% der Fälle zutraf.

Zusammenfassend zeigten die Ergebnisse der Karyotypbestimmung eine Veränderung des Karyotyps nach der Elektroporation, was sich am deutlichsten an der prozentualen Abnahme der Zellen mit vollständigem Chromosomensatz und an der Zunahme der Anzahl von Zellen mit einem Karyotyp von mehr als 40 Chromosomen zeigt.

# Kapitel 5

## Diskussion

### 5.1 Primärantikörper

Zu Beginn dieser Arbeit mussten geeignete Methoden zur Untersuchung der Expression und Freisetzung von NKB ausgewählt und etabliert werden. Die Lokalisierung des Tachykinins NKB im Nervengewebe sollte dabei durch die Methode der Immunhistochemie erfolgen. Da aber zu diesem Zeitpunkt kein geeigneter Primärantikörper zur Verfügung stand, wurde eine Firma beauftragt, Tiere zu immunisieren, um den benötigten Antikörper zu gewinnen. Die Wahl fiel dabei auf eine Firma die dazu Hühner verwendet. Der Vorteil gegenüber konventionellen Methoden der Antikörpergewinnung durch Immunisierung von Säugetieren wie zum Beispiel Kaninchen ist, dass die Gewinnung von Antikörpern aus Hühnereigelb (IgY) besonders schonend abläuft, da die Eier und nicht das Blut zur Antikörpergewinnung genutzt werden. Diese Methode ist ausserdem sehr effizient, da die Antikörperkonzentration im Eigelb höher ist als im Serum und ein Huhn, das fünf bis sechs Eier pro Woche legt, im Vergleich zu Kaninchen fast die 10-fache Antikörpermenge produziert (Larsson *et al.*, 1993). Die Antikörperfraktion, die dabei verwendet wird, wird als IgY bezeichnet. Die Struktur des IgY-Moleküls ist dem des IgG sehr ähnlich. Es besteht aus zwei schweren Ketten mit einer Molekularmasse von 67-70 kDa und zwei leichten Ketten mit einer Molekularmasse von 25 kDa. Die Masse des IgY Moleküls ist aber mit 180

kDa höher als bei IgG Molekülen (150kDa) und der isoelektrische Punkt von IgY liegt bei pH 5,7-7,6 und ist somit etwas niedriger als bei IgG. IgY ist hydrophober als IgG und kann über mehrere Monate bei Raumtemperatur gelagert werden (Narat, 2003). Weitere Vorteile von IgY sind, dass das Immunsystem von Hühnern auch Epitope erkennt, die vom Immunsystem von Säugetieren nicht erkannt werden und dass IgY aufgrund des phylogenetischen Unterschiedes keine Kreuzreaktionen mit IgG zeigt (Narat, 2003). Für die Verwendung in der Immunhistochemie an murinem Gewebe würde dies bedeuten, dass keine unspezifischen Reaktionen mit gewebseigenen Antikörpern auftreten.

Bei der Aufreinigung der Antikörper aus dem Eigelb müssen zunächst die Lipide entfernt werden, die den Hauptanteil des Hühnereigelb ausmachen. Erst dann können die Antikörper zum Beispiel durch Zugabe von Salzen oder PEG (Goldring und Croetzer, 2003) ausgefällt werden. Das Ausfällen mit Ammoniumsulfat, wie es auch zur Aufreinigung der Antikörper in dieser Arbeit verwendet wurde, ist dabei eine häufig angewandte Methode (Narat, 2003; Contreras *et al.*, 2005; Karam *et al.*, 2004; Bizanov und Jonauskienė, 2003). Nach der Aufreinigung wird die Reinheit der erhaltenen Fraktion häufig mittels SDS-PAGE überprüft. Die in der Literatur abgebildeten Ergebnisse (Contreras *et al.*, 2005) entsprechen dann dem Muster, das auch in dieser Arbeit nach der Aufreinigung gefunden wurde (Abb. 4.1). Somit kann eine fehlerhafte Aufreinigung als Grund für die mangelnde Spezifität des NKB-IgY Antikörpers ausgeschlossen werden.

IgY wird mittlerweile in vielen Bereichen der Forschung, Diagnostic und zu therapeutischen Zwecken eingesetzt und ersetzt in Methoden wie der Immunfluoreszenz, *Western Blot* und Immunhistochemie die ursprünglich verwendeten IgG Antikörper (Narat 2003). Bei der Anwendung jeder dieser Methoden mussten bestimmte Bedingungen den Eigenschaften der Antikörper angepasst werden. Die Anpassungsversuche für den NKB-IgY Antikörper blieben jedoch erfolglos. Ein Grund könnte darin bestehen, dass für die Immunhistochemie nicht die Reinheit der Antikörperfraktion sondern die Spezifität für ein bestimmtes Antigen ausschlaggebend ist. Die Spezifität eines Antikörpers wird maßgeblich durch die

Herstellung, angefangen bei der Immunisierung der Hühner, beeinflusst. Auch hier muss die Durchführung dem Epitop angepasst werden. So richtet sich die Frequenz der Immunisierungen und *Boosts* nach dem immunogenen Potential des verwendeten Epitops. Häufig werden die Impfungen und *Boosts* in Abständen von zwei bis vier Wochen gegeben (Narat, 2003). Die Hühner aus denen das NKB-IgY gewonnen wurde, sind im Abstand von drei Wochen immunisiert worden, was einer mittleren Frequenz entspricht, die in den meisten Fällen zum Erfolg führen sollte. Da in diesem Fall aber kein spezifischer Antikörper hergestellt werden konnte, kann es sein, dass das immunogene Potential des verwendeten Epitops zu schwach war, um vom Immunsystem der Hühner erkannt zu werden.

Zusammenfassend kann man sagen, dass die Verwendung von Antikörpern aus Eigelb gegenüber den Antikörpern aus dem Serum von Säugetieren einige Vorteile haben sollte, die aber in dieser Arbeit aufgrund fehlender Spezifität des NKB-IgY nicht ausgenutzt werden konnten. Gründe dafür könnten in der Art der Aufreinigung, der mangelnden Anpassung der verwendeten immunohistochemischen Methode oder der Herstellung des Antikörpers liegen. Da aber bis zum heutigen Zeitpunkt noch kein kommerzieller Antikörper vorhanden ist, der gegen das Tachykinin NKB gerichtet ist, liegt der Verdacht nahe, dass es als Epitop ein zu schwaches immunogenes Potential hat.

Zur Lokalisierung von NKB bzw. seines Vorläuferproteins wurde schliesslich ein Antikörper aus dem Serum von Kaninchen verwendet. Das Problem hierbei war, dass, wie bereits in der Einleitung beschreiben, aus dem Pro-Peptid im Transgolgi-Bereich das kleinere Tachykinin freigesetzt wird (Pennefather *et al.*, 2004; Sossin *et al.*, 1989). Dabei war nicht klar, ob die abgespaltenen Teile des Pro-Peptids im Anschluss abgebaut werden und somit nicht mehr nachweisbar sind, oder ob sie zusammen mit dem Tachykinin zur Synapse transportiert werden und somit zum Nachweis des Tachykinins bis zum Freisetzungsort verwendet werden können.

Vor Beginn dieser Arbeit war der pep2 Antikörper bereits zur Lokalisierung von NKB in Nervengewebe von Ratten verwendet worden. Dabei konnte einerseits

gezeigt werden, dass die pep2 Sequenz sowohl in Zellkörper, wo die Translation stattfindet, als auch in Fasern und Synapsen nachgewiesen werden konnte (Marksteiner *et al.*, 1992). Andererseits wurde nachgewiesen, dass das Muster der Immunreaktivität des pep2 Antikörpers dem eines andere Antikörpers, der gegen NKB gerichtet war, entsprach (Marksteiner *et al.*, 1992). Das bedeutet einerseits, dass die abgespaltenen Teile des Propeptids im Nervengewebe von Ratte nicht vor dem Erreichen der Synapse abgebaut werden und andererseits mit NKB bis zum Erreichen der Synapse kolokalisiert sind. Daher wurde der pep2 Antikörper verwendet, um NKB im Nervengewebe von Mäusen zu lokalisieren.

## 5.2 Expressionsmuster von NKB und NK3 in Gehirnen von Ratten und Mäusen

Ratten werden häufig als Versuchstiere in physiologischen und pharmakologischen Studien eingesetzt. In genetischen Studien werden aber Mäuse bevorzugt, da ihr Genom bereits sehr gut untersucht und durch Einbringen von DNA in ES-Zellen auch manipulierbar ist. Um Ergebnisse aus Tests mit Ratten auf andere Versuchstiere oder sogar den menschlichen Organismus übertragen zu können, ist es darum wichtig, speziesabhängige physiologische Abweichungen zu kennen. Im vorliegenden Fall war bis zum Beginn der Arbeit nur die Expression von NKB im zentralen Nervensystem von Ratten beschrieben worden (Warden und Young, 1988; Marksteiner *et al.*, 1992). Ein Ziel der Arbeit war es darum, zunächst die Expression von NKB im Nervengewebe und in peripheren Geweben von Mäusen zu untersuchen und mit dem Expressionsmuster der Ratte zu vergleichen. Dabei konnten viele Ähnlichkeiten festgestellt werden, aber es wurden auch einige Unterschiede zwischen Mäusen und Ratten beobachtet. So war zum Beispiel die Anzahl der Zellkörper, die pep2-IR zeigten, bei Mäusen geringer als bei Ratten. Eine Erklärung dafür könnte eine geringere Sensitivität des Antikörpers auf Schnitte aus Mausgewebe sein. Die immunhistochemische Signale konnten zwar

mit derselben Konzentration an Protein ( $100\mu\text{m}$ ) in Maus- und Rattengewebe vollständig blockiert werden. Aber die Präadsorption wurde ursprünglich nur zur Untersuchung der Spezifität und nicht der Sensitivität des Antikörpers durchgeführt. Daher kann es sein, dass ein geringer Sensitivitätsunterschied zwischen Ratten und Mausgewebe besteht, der aber aufgrund zu weit auseinanderliegender Konzentrationen in der Verdünnungsreihe nicht erfasst werden konnte. Würde dies nicht zutreffen, wäre anzunehmen, dass im Mausgewebe weniger Zellen NKB herstellen als im Gewebe von Ratten, was auf einen speziesabhängigen quantitativen Unterschied hinweisen würde, der aber nicht weiter untersucht und in der Literatur auch nicht beschrieben wurde.

Die Funktion von NKB im Gehirn ist weiterhin ungeklärt. Es gibt zwar viele Studien mit NK3 Rezeptoragonisten und Antagonisten, in denen antihypertensive (Lessard *et al.*, 2002), anxiogene (Ribeiro *et al.*, 2002; Teixeira *et al.*, 1996), hyperalgetische (Houghton *et al.*, 1999; Zaratin *et al.*, 1999) Effekte beobachtet wurden. Ob aber alle diese Effekte auch und vor allem ausschliesslich von NKB und von keinem anderen Tachykinin ausgelöst werden können, wurde bisher noch nicht vollständig untersucht.

Übereinstimmungen im Expressionsmuster von Tac2 mRNA und pep2-IR in Gehirnen von Mäusen und Ratten implizieren gleichbleibende Funktionen für Tachykinine. Ein Beispiel für ein solches konserviertes neuronales Projektions-system verläuft von den *Habenulae* zum *Nucleus interpeduncularis* (Ciani *et al.*, 2005). Tac2 mRNA wird im *Nucleus Habenulae* synthetisiert und NKB wird von diesen Neuronen im *Nucleus interpeduncularis* freigesetzt. Tierversuche zeigen, dass die *Habenulae* an verschiedenen Prozessen beteiligt sind, die bei depressiven Patienten gestört sind, wie zum Beispiel Schlaf-Wach-Rhythmus, Belohnungsmechanismen und Schmerzempfinden (Shumake et Gonzales-Lima, 2003). Außerdem werden die *Habenulae* häufig mit Paarungs-, Lern- und Fressverhalten und der hormonellen Antwort auf Stress in Verbindung gebracht. So wurde zum Beispiel nachgewiesen, dass hypermetabolische Veränderungen in diesem System zu erhöhter Anfälligkeit für hilfloses Verhalten und Depression führen können

(Shumake et Gonzales-Lima, 2003). Die *Habenulae* sind verbunden mit der *Area ventralis tegmentalis* und dem *Nucleus accumbens*, zwei Regionen, die möglicherweise für Dopamin-abhängigen Veränderungen im *Nucleus Habenulae* verantwortlich sind (Shumake et Gonzales-Lima, 2003).

Ein weiteres konserviertes Projektionssystem besteht zwischen dem lateralen *Nucleus corporis mamillaris* und dem *Nucleus anterior dorsalis*. Vom *Nucleus corporis mamillaris* ist seit längerem bekannt, dass er eine wichtige Rolle in der Funktion des Gedächtnisses spielt (Sziklas und Petrides, 1998). Er wird vom *Hippocampus* innerviert und projiziert in den Bereich des *Nucleus anterior dorsalis* des *Thalamus*. In Versuchen mit Ratten konnte gezeigt werden, dass diese Projektionssysteme notwendig sind für das Erinnern von räumlichen Informationen (Vann und Aggleton, 2003).

Eine starke Tac2 mRNA- und NKB-Expression, wie sie in diesen Projektionssystemem beobachtet wurde, könnten auf eine regulatorische Funktion von NKB hinweisen.

Die Ergebnisse der Immunhistochemie und der *In situ*-Hybridisierung zeigen, dass der *Hypothalamus* ebenfalls eine Region ist, die bei Ratten und Mäusen von NKB-enthaltenden Fasern und Zellen innerviert wird. Besonders hervorzuheben sind dabei der *Nucleus arcuatus*, die *Area preoptica* und der *Nucleus Striae terminalis*, die Teil der reproduktiven Achse sind (King et al., 1982; Dong et al., 2004). Untersuchungen an menschlichem Gewebe ergaben, dass SP und NKB in Hypothalamus komplementär verteilt sind (Chawla et al., 1997). Zusätzlich wurde nachgewiesen, dass die Tac2 mRNA-Expression im *Nucleus arcuatus* bei Mäusen durch den Estrogenrezeptor  $\alpha$  beeinflusst wird (Dellovade et al., 2004). Ausserdem kann die LH Sekretion im *Hypothalamus* bei Ratten durch den NK3-Agonisten Senktide inhibiert werden (Guzman et al., 2004). Es gibt also deutliche Anzeichen dafür, dass das NKB/NK3-System im Gehirn reproduktive Funktionen beeinflusst.

Unterschiede zwischen Ratten und Mäusen wurden zum Beispiel im *Hippocampus* beobachtet. Hier konnte NK3 mRNA bei Ratten und Mäusen gleichermaßen



nachgewiesen werden, pep2-IR dagegen nur bei Ratten. Das könnte bedeuten, dass bei Mäusen ein anderer Ligand die Aktivierung der NK3 Rezeptoren im Hippocampus übernimmt wie zum Beispiel das Tachykinin SP. Das Vorkommen von SP im Hippocampus wurde bereits im Zusammenhang mit zentralen Krämpfen nachgewiesen (Liu *et al.*, 1999).

Da im *Hippocampus* immunhistochemisch mit dem pep2 Antikörper fast nur Zellkörper angefärbt wurden und sich diese Färbungen mit den Signalen der Tac2 Sonde aus der *in situ* Hybridisierung vollständig überlagern, ist es darum notwendig auch die *Nuclei* zu berücksichtigen, in die der *Hippocampus* projiziert. Der *Hippocampus* spielt eine zentrale Rolle bei Gedächtnisfunktionen und Epilepsie-Erkrankungen (Kralic *et al.*, 2005; Vakalopoulos, 2006) und er innerviert *Nuclei*, die ebenfalls zu einer bestimmten Gedächtnisleistung beitragen und in denen pep2-IR nachgewiesen wurde. Bereits erwähnt wurden der *Nucleus corporis mamillaris* und der *Nucleus anterior dorsalis*, die zum Erinnern räumlicher Informationen notwendig sind (Vann und Aggleton, 2003). Aber auch die *Substantia nigra* und die *Area tegmentalis ventralis* werden von *Hippocampus* innerviert und sind neben einigen anderen Funktionen auch an Gedächtnisleistungen beteiligt (Ambrogio Lorenzini *et al.*, 1998; Lisman und Grace 2005).

Ein weiteres Beispiel für einen Unterschied zwischen der Tac2 Expression in Maus und Ratte ist das Projektionssystem zwischen dem *Nucleus* des *Tractus olfactorius lateralis* und dem *Tuberculum olfactorium*. Tac2 mRNA konnte nur im *Nucleus* des *Tractus olfactorius lateralis* der Ratte nachgewiesen werden. Bei der Maus fehlten Signale in diesem Bereich. Entsprechend wurde pep-IR nur im *Tuberculum olfactorium* von Ratten detektiert, wohingegen im *Tuberculum olfactorium* von Mäusen keine pep2-IR nachgewiesen werden konnte. Es gibt nur wenig Information über die Funktion dieser *Nuclei*. Aber Untersuchungen an Ratten weisen darauf hin, dass der *Nucleus* des *Tractus olfactorius lateralis* nicht-pheromonales olfaktorisch-gesteuertes Verhalten (wie zum Beispiel Fressen) beeinflusst (Santiago und Shammah-Lagnado, 2004). Abweichungen auf der

Ebene von Genexpression in diesen Projektionssystemen könnten sich somit in speziesabhängigen Unterschieden im Lern- und Fressverhalten von Ratten und Mäusen widerspiegeln.

Neben den Unterschieden zwischen Maus und Ratte wurden auch Abweichungen zwischen der NK3 Expression und der pep2-IR festgestellt. Da NKB das Tachykinin mit der grössten Affinität zum NK3 Rezeptor ist, wäre zu erwarten, dass dort, wo NK3 exprimiert wird auch pep2-IR auftritt. Starke Signale für NK3 mRNA wurden im supraoptischen *Nucleus* nachgewiesen. Seit längerem wird vermutet, dass das Tachykininsystem in diesem *Nucleus* die Vasopressin Freisetzung steuert und so den Blutdruck regulieren kann (Spitznagel *et al.*, 2001). Obwohl SP-IR in diesem *Nucleus* bei Ratten beschrieben worden ist, konnte nicht nachgewiesen werden, dass SP die Vasopressin-Freisetzung beeinflusst (Howe *et al.*, 2004). Die pep2-IR, die im supraoptischen *Nucleus* von Ratten und Mäusen beobachtet wurde, ist zwar sehr schwach, aber bei Ratten ist nach einem fünftägigen Wasserentzug ein starker Anstieg der pep2-IR beobachtet worden (Hatae *et al.*, 2001). Es könnte sich hier also um ein autorezeptives System handeln, dass bei bestimmten äusseren Bedingungen wie Wasserentzug zur Aufrechterhaltung des Blutdruckes aktiviert wird.

Schwieriger ist es dagegen, Abweichungen in der *Amygdala* zu erklären. NK3 mRNA wurde vor allem im basolateralen Teil nachgewiesen, wohingegen pep2-IR ausschliesslich in zentralen Teil der *Amygdala* auftritt. SP scheidet in diesem Fall als Ligand aus, da SP-IR ebenfalls nur im zentralen Teil nachgewiesen werden konnte. Im zentralen Teil der *Amygdala* konnten einige Zellkörper mit pep2-IR nachgewiesen werden. Wenn diese in den basolateralen Teil der *Amygdala* projizieren würden, könnte das über diesen Weg freigesetzte NKB die NK3 Rezeptoren aktivieren. Die *Amygdala* ist an Prozessen für das Erinnern von Informationen in Verbindung mit Emotionen beteiligt (Holland und Gallagher, 1999). Dabei stellt die basolaterale *Amygdala* die Stelle dar, an der die Informationen in die *Amygdala* gelangen. Sie leitet sie weiter in oder durch den zentralen Teil der *Amygdala*, von wo aus Neuronen in andere Gehirnregionen projizieren (Pare

et al., 2003; Quirk et al., 2003, Likhtik et al., 2005). Eine Verbindung aus dem zentralen Teil der *Amygdala* in den basolateralen wird im Gegensatz dazu nicht erwähnt. Es bleibt also weiterhin ungeklärt, welcher Ligand die NK3 Rezeptoren in der basolateralen *Amygdala* aktiviert.

Zusammenfassend kann man sagen, dass Übereinstimmungen im NKB Expressionsmuster bei Ratten und Mäusen auf eine speziesübergreifende Funktion in reproduktiven Prozessen hinweist. Abweichungen zwischen Maus und Ratte betreffen vor allem Regionen die für das Gedächtnis (*Hippocampus*) oder das Fressverhalten (*Nucleus des Tractus olfactorius lateralis*) zuständig sind. In einigen Regionen, in denen zwar NK3-Rezeptoren aber kein Ligand nachgewiesen werden konnte, könnte durch bestimmte äussere Bedingungen (wie zum Beispiel Wasserentzug) ein autorezeptives System aktiviert werden. Bei anderen konnte das Fehlen von NKB nicht theoretisch erklärt werden.

### 5.3 Tac2- und NK3-Genexpression in peripheren Geweben von Mäusen

Neben der Verteilung von NKB im Gehirn wurde auch die Expression von Tac2 und NK3 in peripheren Geweben untersucht. Da NKB lange nicht in peripheren Organen detektiert werden konnte, stand zunächst der qualitative Nachweis der Genexpression und weniger eine Lokalisierung im Vordergrund. Daher wurde in diesem Fall die Methode der RT-PCR ausgewählt. Der Vorteil dieser Methode ist die Sensitivität. Geringe Mengen an mRNA können nach der Amplifikation der entsprechenden cDNA durch eine spezifische PCR nachgewiesen werden. Die RT-PCR liefert im Gegensatz zur Immunhistochemie allerdings keine Information über die Lokalisierung des Tachykinins oder des Rezeptors. Tac2 und NK3 mRNA wurde wider Erwarten nicht nur in Geweben wie dem Rückenmark und der Retina nachgewiesen, die zum zentralen Nervensystems gezählt werden, sondern auch in Geweben wie der Plazenta, die aus nicht-neuronalen Zellen bestehen.

### **Rückenmark und Retina**

Aus immunhistochemischen Versuchen war bereits bekannt, dass bei Ratten NKB in der *Lamina II* des dorsalen Horns freigesetzt wird (McLeod *et al.*, 2000). In Verlauf dieser Arbeit konnte dies auch für Mäuse gezeigt werden. In weiteren Studien konnten ausserdem NK3 Rezeptoren immunhistochemisch ebenfalls in der *Lamina II* bei Ratten nachgewiesen werden (Ding *et al.*, 2002). Die Ergebnisse der RT-PCR für Mäuse stimmen also mit den immunhistochemischen Ergebnissen aus der Literatur für Ratten überein. Daher ist es naheliegend zu vermuten, dass auch die Funktion des NKB/NK3 Systems bei Ratten und Mäusen gleich ist. Bei Ratten wurde eine Beteiligung an Schmerzwahrnehmung zwar lange vermutet, aber es konnte nicht genau bestimmt werden, ob das NKB/NK3-System an der Nociception oder an der Antinociception beteiligt ist. Mittlerweile konnte jedoch nachgewiesen werden, dass NK3 Rezeptoren in der Lamina II sowohl mit  $\mu$ -Opioidrezeptoren, die einen antinociceptiven Effekt auslösen, als auch mit der Stickstoffmonoxid-Synthase (NOS), die durch die Synthese von Stickstoffmonoxid (NO) an der Nociception beteiligt ist, kolokalisiert sind (Fürst 1999; Ding *et al.*, 2002). Das NKB/NK3-System könnte daher modulierend an der Schmerzwahrnehmung beteiligt sein (Ding *et al.*, 2002).

### **Magen-Darm-Trakt**

Auch im Magen-Darm-Trakt wurde Tac2 und NK3 mRNA mittels RT-PCR detektiert. In der Literatur war bereits das Vorkommen und die Funktion von NK3 Rezeptoren im Darm von Ratten und Mäusen beschrieben worden. Sie sind in sensorischen Nerven des Dünne- und Dickdarms enthalten und ihre Aktivierung führt dort sowohl zur Kontraktion als auch zur Relaxation des Darms (Mann *et al.*, 1997; Wang *et al.*, 2002). Studien zeigten, dass mit NK3 Antagonisten die Nociception schmerzhafter Darmkontraktionen und die durch Stress ver-

unsachte Hypersensitivität reduziert werden können. Aber im Gegensatz zu dem, was lange vermutet wurde, haben NK3 Antagonisten keinen Einfluss auf Entzündungsreaktionen im Darm (Fioramonti et al., 2003). Die Expression von Tac2 mRNA oder die Freisetzung von NKB im Darm wurde in der Literatur bisher noch nicht beschrieben und stellen somit ein völlig neues Ergebnis dar. Es ist anzunehmen, dass NKB so freigesetzt wird, dass es die NK3 Rezeptoren aktivieren kann. Welche Faktoren aber zu einer Freisetzung von NKB führen, wurden noch nicht untersucht.

### **Ovar, Uterus und Plazenta**

Die Expression von Tac2 und NK3 mRNA im Uterus und der Plazenta wurde bereits für die Ratte und den menschlichen Organismus beschrieben und in Abhängigkeit von Hormonspiegel und dem Verlauf von Schwangerschaft und Trächtigkeit untersucht (Pinto et al., 2004; Pinto et al., 2001; Page et al., 2000; Page et al., 2001; Patak et al., 2003; Candenias et al., 2001). Dabei steht meistens eine erhöhte NKB Freisetzung aus der Plazenta während des letzten Drittels der Schwangerschaft und die dadurch verursachten Symptome der Präeklampsie im Mittelpunkt. Die Ergebnisse der RT-PCR für murines Gewebe aus dieser Arbeit bestätigen weitgehend die Ergebnisse aus der Literatur. So konnte übereinstimmend mit den Ergebnissen für humanes Gewebe im Uterus und der Plazenta Tac2 mRNA nachgewiesen werden. Im Gegensatz zu den Ergebnissen für humanes Gewebe wurden keine NK3 Rezeptoren in der Plazenta sondern nur im Ovar detektiert. Obwohl bisher die Expression von NKB und NK3 Rezeptoren im peripheren Gewebe von Mäusen noch nicht bekannt war und es einige Unterschiede im Aufbau der murinen und humanen Plazenta gibt, existieren bereits einige murine Modelle zur Untersuchung einzelner Faktoren und möglicher Ursachen der Präeklampsie (Cross, 2003).

### **Lunge, Niere**

Lunge und Niere gehören zu den Organen, bei denen eine Rolle der Tachykinine an der Entstehung von pathogenen Veränderungen wie Asthma oder Proteinurie als Symptom der Präeklampsie häufig diskutiert werden.

Im Lungengewebe von Mäusen konnte Tac2 und NK3 mRNA allerdings nicht nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu wurden beim Menschen sowohl Tac3 als auch NK3 Transkripte im Lungengewebe detektiert (Pinto et al., 2004). In pharmakologischen Tests mit NK3-Antagonisten konnten bisher jedoch noch nie Effekte in der Plasmaextravasation gemessen werden. Auch NK3 *Knockout*-Mäuse zeigten keinen Phänotyp in allergischen Tests (Grant et al., 2002, Kung et al., 2004). Beide Ergebnisse würden für ein Fehlen von NK3 Rezeptoren im Lungengewebe von Mäusen sprechen und somit die Ergebnisse aus der RT-PCR bestätigen.

### **Milz, Nebenniere, Thymus**

Tac3 Expression wurde in humanem Thymus-Gewebe bereits beschrieben und bestätigt das Ergebniss der RT-PCR für murines Gewebe. Das Fehlen von NK3 mRNA im Thymus konnte ebenfalls übereinstimmend in murinem und humanem Gewebe beobachtet werden (Pinto et al., 2004). Neu ist dagegen, dass bei der Maus Tac2 mRNA auch in der Nebenniere und in der Milz exprimiert wird. Da auch für die Untersuchung des menschlichen Gewebes die Methode der RT-PCR gewählt wurde, können zu diesen Geweben keine genauen Aussagen zu Lokalisation und Funktion des Tachykinins gemacht werden. Möglich wäre, dass NKB wie im Darm Rezeptoren aktiviert, die in Nervenzellen exprimiert werden. Da in der Maus keine NK3 Rezeptoren im Darm vorhanden sind, würden dann andere Neurokininrezeptoren wie die NK1 oder NK2 Rezeptoren aktiviert werden, deren Expression aber auch noch nicht untersucht wurde.

## 5.4 Deletion des murinen Tac2 Gens

Die physiologische Funktion des NKB/NK3-Systems sollte an *Tac2-Knockout*-Mäusen untersucht werden. Im Verlauf dieser Arbeit war es jedoch nicht möglich die gewünschte Deletion in die Keimbahn von Mäusen einzufügen. Mangelnde Keimbahngängigkeit bei der Generierung von KO-Mäusen wird in der Literatur häufig beschrieben und die Gründe dafür werden kontrovers diskutiert. Eine wichtige Rolle scheinen dabei die verwendeten ES-Zellen zu spielen, wobei noch nicht geklärt ist, ob die mangelnde Totipotenz oder ein aneuploider Karyotyp ausschlaggebend für den Verlust der Keimbahngängigkeit sind (Suzuki *et al.*, 1997). Die Wahrscheinlichkeit der Keimbahngängigkeit von ES-Zellen verringert sich jedoch mit steigender Anzahl an Zellen mit aneuploidem Chromosomensatz. Wenn mehr als 50% der ES-Zellen einen aneuploiden Chromosomensatz aufweisen, scheint eine Integration in die Keimbahn nicht möglich zu sein (Longo *et al.*, 1997). Alle in Abschnitt 4.3.3 untersuchten Klone weisen nach der Elektroporation in deutlich weniger als 50% der Fälle einen euploiden Chromosomensatz von 40 Chromosomen auf, was ein Grund für die fehlende Keimbahngängigkeit der Deletion des Tac2 Gens sein könnte.

Besonders auffallend ist der Karyotyp des Klons Tac2.7-9. Die Auswertung der Karyotypbestimmung weist auf eine mögliche Trisomie hin. Trisomien treten häufig in ES-Zellen auf. In einigen Fällen, wie zum Beispiel bei einer Trisomie des Chromosoms 8, führt dies zu einer erhöhten Wachstumsrate der Zellen, die die Trisomie aufweisen. Dadurch können nach einiger Zeit die Zellen mit einem euploiden Chromosomensatz verloren gehen, da sie sich langsamer teilen. Aber im Gegensatz zu Zellen mit einem euploiden Chromosomensatz gehen Zellen mit einer Trisomie eher selten in die Keimbahn über (Liu *et al.*, 1997).

Analog dazu konnte auch beim Klon Tac2.7-9 eine hohe Wachstumsrate beobachtet werden, wodurch sich die Zellen mit einer Trisomie nach einigen Passagen anreichern könnten. Obwohl mit diesem Klon Tiere mit einem relativ hohen Chimäritätsgrad (ca. 70%) erreicht werden konnten, wurde die Deletion des Tac2

Gens aus den ES-Zellen nicht auf die Keimbahn dieser Tiere übertragen. Ausserdem entstanden mit diesem Klon die meisten der infertilen Männchen und zwei Hermaphroditen. Daher scheint dieser Klon trotz seiner hohen Wachstumsrate nicht für die Generierung von KO-Mäusen geeignet zu sein, was vermutlich auf eine Trisomie zurückzuführen ist.

Ein aneuploider Chromosomensatz tritt besonders bei murinen ES-Zellen nach einer hohen Anzahl von Passagen auf und spiegelt sich dann in einer geringen Chimärität der entstandenen Tiere wider (Longo *et al.*, 1997). Der Grad der Chimärität wiederum steht in engen Zusammenhang mit Wahrscheinlichkeit der Keimbahngängigkeit von ES-Zellklonen. Je höher der Chimäritätsgrad eines Tieres ist, der anhand der Fellfarbe abgeschätzt werden kann, desto höher ist auch die Wahrscheinlichkeit, dass das chimäre Tier die Deletion eines Gens auf seine Nachkommen überträgt (Longo *et al.*, 1997; Suszuki *et al.*, 1997) Die für diese Arbeit verwendeten ES-Zellen wurden vor der Mikroinjektion in Blastozysten mehr als 20 Mal passagiert, da bereits die ES-Zellen, die vor der Elektroporation in Kultur genommen wurden, Passage 15 hatten. Die daraus entstandenen Tiere (ausser denen die durch Mikroinjektion des Tac2.7-9 Klons entstanden sind) wiesen meist eine geringe Chimärität auf und übertrugen die nachgewiesene Deletion des Tac2 Gens nicht auf ihre Nachkommen.

Die Ursache der fehlenden Keimbahngängigkeit bei den untersuchten ES-Zellklonen ist vermutlich auf die hohe Anzahl der Passagen zurückzuführen, durch die die Ausbildung eines aneuploiden Chromosomensatzes begünstigt wurde.

Als positives Ergebnis ist jedoch zu erwähnen, dass bereits ein *Targeting*-Vektor zur Verfügung steht, mit dem eine homologe Rekombination bereits in vier Fällen durch Southern blots und PCR nachgewiesen werden konnte, der also in das Mausgenom integriert werden kann. Somit kann nun, da die Ursache für die fehlende Keimbahngängigkeit gefunden wurde, bei Verwendung von ES-Zellen mit euploidem Chromosomensatz und geringerer Anzahl von Passagen in naher Zukunft eine Tac2 KO-Maus hergestellt werden.



## Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war es, die Expression von NKB im ZNS und in peripheren Geweben der Maus durch in situ Hybridisierung, Immunhistochemie und RT-PCR zu untersuchen. Tac2 mRNA und Immunoreaktivität für das NKB Vorläuferprotein pep2 konnte in vielen Bereichen des Gehirns nachgewiesen werden. Eine starke Expression wurde vor allem in Bereichen des Thalamus und Hypothalamus (Habenulae, Nucleus anterior dorsalis, Area preoptica, Nucleus arcuatus) beobachtet. Beim Vergleich des murinen Expressionsmusters mit dem der Ratte konnten einige Abweichungen festgestellt werden. Nur bei Ratten konnte eine Expression von Tac2 mRNA im Nucleus des lateralen olfaktorischen Traktes und im Hippocampus nachgewiesen werden. Entsprechend fehlten bei Mäusen auch Signale für NKB in den Projektionsgebieten, wohingegen bei Ratten die Signale vorhanden waren. NKB zeigt die höchste Affinität zum NK3 Rezeptor. Daher wurde auch das Expressionsmuster für NK3 mRNA untersucht. Obwohl für Tac2 mRNA Abweichungen zwischen Maus und Ratte beobachtet worden waren, traf dies nicht auf die Expressionsmuster für NK3 zu. Die Signale für NK3 mRNA ergaben wider Erwarten in Gehirnen von Mäusen und Ratten identische Muster. Es gab allerdings Abweichungen zwischen der pep2-IR und dem NK3 Expressionsmuster im Hippocampus und in der Amygdala, was teilweise damit erklärt werden kann, dass andere Tachykinine in diesen Regionen NK3 Rezeptoren aktivieren könnten. Die Untersuchung der peripheren Gewebe ergab, dass Tac2 mRNA ausserhalb des Gehirns noch in weiteren Geweben (Rückenmark, Auge, Dick- und Dünndarm, Milz, Nebenniere Thymus, Uterus, Plazenta) nachgewiesen werden konnte. Die NK3 Expression konnte nur in wenigen peripheren Geweben (Magen, Dick- und Dünndarm, Ovar) und im Rückenmark und im Auge nachgewiesen werden. Im Gegensatz zu Ergebnissen aus Expressionsstudien für den Menschen konnte keine Tac2 mRNA in der Niere, der Lunge oder der Leber von Mäusen nachgewiesen werden.

Um die Funktion des murinen Tac2 Gens zu untersuchen, sollte eine gezielte Deletion dieses Gens durchgeführt werden. Dazu wurde ein Targeting-Vektor hergestellt und in ES-Zellen elektroporiert. Mit Hilfe von Markern (Neomycinresistenz, Abwesenheit des Gens für HSV-TK) und der *Southern Blot* Methode wurden diese Zellen selektiert und auf homologe Rekombination überprüft. Insgesamt wurden vier Klone ausgewählt, die in Blastozysten injiziert oder mit Morulae aggregiert wurden. Nach dem Retransfer in scheinträchtige Weibchen wurden chimäre Tiere geboren, die einen Chimäritätsgrad zwischen 10% und 70% zeigten. Alle Tiere, die einen Chimäritätsgrad von mehr als 10% zeigten, wurden verpaart. Aus diesen Verpaarungen sind jedoch keine heterozygoten Tiere hervorgegangen, was darauf hinweist, dass die Deletion des Gens nicht in die Keimbahn der Tiere integriert werden konnte.

## Kapitel 6

# Literaturverzeichnis

Akil H, Owens C, Gutstein H, Taylor L, Curran E, Watson S (1998) Endogenous opioids: overview and current issues. *Drug and Alcohol Dependence* 51:127-140

Ambrogi Lorenzini CG, Baldi E, Bucherelli C, Sacchetti B, Tassoni G (1998) Temporal characterization of subcortical nuclei in mnemonic processes: results of tetrodotoxin reversible inactivation studies in the rat. *Arch Ital Biol* 136(4): 279-296

Attwood TK and Findlay JB (1994) Fingerprinting G-protein-coupled receptors. *Protein Eng* 7: 195-203

Baharvand H, Matthaei KI (2004) Culture condition difference for establishment of new embryonic stem cell lines from C57BL/6 and BALB/c mouse strains. In *Vitro cell. Dev. Biol.- Animal* 40: 76-81

Beaujouan JC, Torrens Y, Saffroy M, Kemel ML, Glowinski J (2004) A 25 year adventure in the field of tachykinins. *Peptides* 25: 339-357

Bilkei-Gorzo A, Racz I, Michel K, Zimmer A (2002) Diminished Anxiety- and Depression-related behaviors in mice with selective deletion of the *Tac1* gene. *J Neurosci* 22: 10046-10052

Bizanov G, Jonauskiene I (2003) Production and Purification of IgY from Egg Yolk after Immunization of Hens with Pig IgG. *Bull Vet Inst Pulawy* 47: 403-410

Bohlen und Halbach O von, Dermietzel R (1999) *Methoden der Neurohistologie*, Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg; Berlin; Oxford, Reihe Labor im Fokus

Burbach JPH, Luckman SM, Murphy D, Gainer H (2001) Gene Regulation in the Magnocellular Hypothalamo-Neurohypophysial System. *Phys Rev* 81(3): 1197-1267

Campos MM, Calixto JB (2000) Neurokinin mediation of edema and inflammation. *Neuropeptides* 34(5): 314-322

Candenas ML, Magraner J, Armesto CP, Anselmi E, Nieto PM, Martín JD, Advenier C, Pinto FM (2001) Changes in the Expression of Tachykinin Receptors in the Rat Uterus During the Course of Pregnancy. *Biol Reprod* 65: 538-543

- Cao YQ, Mantyh PW, Carlson EJ, Gillespie AM, Epstein CJ, Basbaum AI (1998) Primary afferent tachykinins are required to experience moderate to intense pain. *Nature* 392: 390-394
- Chawla MK, Gutierrez GM, Young WS, McMullen NT, Rance NE (1997) Localization of neurons expressing substance P and neurokinin B gene transcripts in the human hypothalamus and the basal forebrain; *J Comp Neurol* 384:429-442
- Ciani E, Severi S, Bartesaghi R, Contestabile A (2005) Neurochemical correlates of nicotine neurotoxicity on rat habenulo-interpeduncular cholinergic neurons. *Neurotoxicology* 26(3): 467-474
- Conner AC, Simms J, Hay DL, Mahmoud K, Howitt SG, Wheatley M, Poyner DR (2004) Heterodimers and family-B GPCRs: RAMPS, CGRP and adrenomedullin. *Biochem Soc Trans* 32(5): 843-846
- Contreras VT, De Lima AR, Navarro MC, Arteaga RY, Graterol D, Cabello L, Farias M (2005) Producción y purificación de anticuerpos (IgY) a partir de huevos de gallinas inmunizadas con epimastigotas de *Trypanosoma cruzi*. *Salus* 9(2): 21-27
- Covenas R, Martin F, Belda M, Smith V, Salinas P, rivada E, Diaz-Cabiale Z, Narvaez JA, Marcos P, Tramu G, Gonzalez-Baron S (2003) Mapping of neurokinin-like immunoreactivity in the human brainstem *BMC Neurosci* 4(3): 1471-2202
- Cross JC (2003) The genetics of pre-eclampsia: a feto-placental or maternal problem? *Clin Genet* 64: 96-103
- Cueille C, Garel JM (2004) RAMP et récepteurs couplés aux protéines G. *Medecine/Sciences* 20:773-778
- De Felipe C, Herrero JF, O'Brien JA, Palmer JA, Doyle CA, Smith AJ, Laird JM, Belmonte C, Cervero F, Hunt SP (1998) Altered nociception, analgesia and aggression in mice lacking the receptor for substance P. *Nature* 392: 334-335
- Dellovade TL, Merchenthaler I (2004) Estrogen Regulation of neurokinin B gene Expression in the mouse arcuate nucleus is mediated by estrogen receptor  $\alpha$ . *Endocrinology*, 145: 736-742
- Ding YQ, Lu CR, Wang H, Su CJ, Chem LW, Zhang YQ, Ju G (2002) Two major distinct subpopulations of neurokinin-3 receptor-expressing neurons in the superficial dorsal horn of the rat spinal cord. *Eur J Neurosci* 16: 551-556
- Fioramonti J, Gaultier E, Toulouse M, Sanger GJ, Bueno L (2003) Intestinal anti-nociceptive behaviour of NK3 receptor antagonism in conscious rats: evidence to support a peripheral mechanism of action. *Neurogastroenterol Motil* 15(4): 363-369
- Flower DR (2003) Modelling G-protein-coupled receptors for drug design. *Biophys Acta* 1422: 207-234
- Fredriksson R, Lagerström MC, Lundin LG, Schiöth HB (2003) The G-Protein-Coupled Receptor in the Human Genome from Five Main Families. Phylogenetic Analysis, Paralogue Groups, and Fingerprints. *Mol Pharmacol* 63: 1256-1272

- Fürst S (1999) Transmitter involved in antinociception in the spinal cord. *Brain Res Bull* 48(2): 129-141
- Gether U (2000) Uncovering Molecular Mechanisms involved in Activation of G Protein-coupled Receptors *Endocrine. Rev* 21(1):90-113
- Goldring JPD, Coetzer THT (2003) Isolation of Chicken Immunglobulins (IgY) from Egg Yolk. *Biochem Mol Biol Edu* 31(3): 185-187
- Gonzalo-Ruiz A, Morte L, Sanz JM (1998) Glutamate/aspartate and leu-enkephalin immunoreactivity in mammillothalamic projection neurons of the rat. *Brain Res Bull* 47(6): 565-574
- Grant AD, Akhtar R, Gerard NP, Brain SD (2002) NK B induces oedema formation in mouse lung via tachykinin receptor-independent mechanism. *J Physiol* 543: 1007
- Guillemin R (2005) Hypothalamic hormones a.k.a. hypothalamic releasing factors. *J of Endocrinol*, 184: 11-28
- Harlow E, Lane D (1988) *Antibodies. A laboratory manual* Cold Spring Harbour Laboratory, New York
- Hatae T, Nakayama Y, Kawano H, Masuko S (2001) Effects of water deprivation on neurokinin B production by the arginine-vasopressin neurons of hypothalamic paraventricular supraoptic nuclei. *Fukuoka Acta Med*, 92: 89-98
- Hellwig B (2004) Neue Arzneimittel. *Deutsche Apotheker Zeitung* 51. Jahrgang, Beilage im März
- Hesketh PJ, Grunberg SM, Gralla RJ, Warr DG, Roila F, de Wit R, Chawla SP, Carides AD, Ianus J, Elmer ME, Evans JK, Beck K, Reines S, Horgan K (2003) The oral Neurokinin-1 Antagonist Aprepitant for the Prevention of Chemotherapy-Induced Nausea and Vomiting: A Trial in Patients Receiving High-Dose Cisplatin-The Aprepitant Protocol 052 Study Group. *J of Clin. Oncol.* 21: 4112-4119
- Hökfelt T, Pernow B, Wahren J (2001) Substance P: a pioneer amongst neuropeptides. *J Intern Med* 249: 27-40
- Holland PC, Gallagher M (1999) Amygdala circuit in attentional and representational processes. *Trends Cogn Sci* 3(2): 65-73
- Houghton AK, Ogilvie J, Clarke RW (1999) The involvement of tachykinin NK2 and NK3 receptors in central sensitization of a spinal withdrawal reflex in the decerebrated, spinalized rabbit. *Neuropharmacol* 39(1): 133-140
- Howe HE, Somponpun SJ, Sladek CD (2004) Role of Neurokinin 3 receptor in supraoptic Vasopressin and Oxytocin neurons. *J Comp Neurol* 462:10103-10110
- Hoyle CHV (1998) Neuropeptide families: evolutionary perspectives. *Regul Pept* 73(1): 1-33
- Kamali F (2001) Osanetant Sanofi-Synthelabo. *Curr Opin Investg Drugs* 2: 950-956

- Kandel ER, Schwartz JH, Jessel TM (1995) *Neurowissenschaften: Eine Einführung*, Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg; Berlin; Oxford
- Karam GA, Mirzaee M, Mahmoodi M, Rasaei MJ, Pouramir M (2004) Extraction and Purification of Anti-Proteinase 3 (PR3) Antibodies from Egg Yolk. *Iranian Biomedical Journal* 9(1):41-45
- Kesteren RE, Smit AB, Dirks RW, With ND, Geraerts WPM, Joosse J (1992) Evolution of the vasopressin/oxytocin superfamily: Characterization of a cDNA encoding a vasopressin-related precursor, preproconopressin, from the mollusc *Lymnaea stagnalis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 4593-4597
- Kolakowski LF Jr (1994) GCRDB: a G-protein-coupled receptor database. *Recept Channels* 2:1-7
- Koutcherov Y, Ashwell KWS, Paxinos G (2000) The distribution of the neurokinin B receptor in the human and rat hypothalamus. *Neuroreport* 11(14): 3127-3131
- Kralic JE, Ledergerber DA, Fritschy JM (2005) Disruption of the neurogenic potential of the dentate gyrus in a mouse model of temporal lobe epilepsy with focal seizures. *Eur J Neurosci* 22(8): 1916-1927
- Kung TT, Crawley Y, Jones H, Luo B, Gilchrest H, Greenfeder S, Anthes JC, Lira S, Wiekowski M, Cook DN, Hey JA, Egan RW, Chapman RW (2004) Tachykinin NK3-receptor deficiency does not inhibit pulmonary eosinophilia in allergic mice. *Pharmacol Res* 50: 611-615
- Larsson A, Balow RM, Lindahl TL, Forsberg PO (1993) Chicken Antibodies: Taking Advantage of Evolution- A Review. *Poultry Science* 72: 1807-1812
- Laufert R, Changeux JP (1989) Calcitonin Gene-related Peptide and Cyclic AMP stimulate Phosphoinositide Turnover in Skeletal Muscle Cells. *J Biol Chem* 264(5): 2683-2689
- Leitch AR, Schwarzacher T, Jackson D, Leitch IJ (1994) *In Situ-Hybridisierung*, Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg; Berlin; Oxford, Reihe Labor im Fokus Lewin B (2002) *Molekularbiologie der Gene*, Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg; Berlin; Oxford
- Lessard A, Campos MM, Neugebauer W, Couture R (2003) Implication of nigral tachykinin NK3 receptors in the maintenance of hypertension in spontaneously hypertensive rats: a pharmacologic and autoradiographic study. *Br J Pharmacol* 138: 554-563
- Likhtik E, Pelletier JG, Paz R, Parè D (2005) Prefrontal control of the amygdala. *J Neurosci* 25(32): 7429-7437
- Lisman JE, Grace AA (2005) The hippocampal-VTA loop: controlling the entry of information into long-term memory. *Neuron* 46(5): 703-713
- Liu H, Mazarati AM, Katsumori H, Sankar R, Wasterlain CG (1999) Substance P is expressed in hippocampal principal neurons during status epilepticus and plays a critical role in the maintenance of status epilepticus. *Proc Natl Acad Sci USA* 96(9): 5286-5291

- Liu X, Wu H, Loring J, Hormuzdi S, Distèche CM, Bornstein P, Jaenisch R (1997) Trisomy eight in ES cells is a common potential problem in gene targeting and interferes with germ line transmission. *Dev Dyn* 209(1): 85-91
- Lohmeier TE (2003) Neurohypophysial hormones. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 285: R715-R717
- Longo L, Bygrave A, Grosveld FG, Pandolfi PP (1997) The chromosome make-up of mouse embryonic stem cells is predictive of somatic and germ cell chimaerism. *Transgen Res* 6(5): 321-328
- Maggi CA (2000) Principles of tachykinergic co-transmission in the peripheral and enteric nervous system. *Regul Pept* 93: 53-64
- Mann PT, Southwell BR, Ding YQ, Shigemoto R, Mizuno N, Furness JB (1997) Localisation of neurokinin 3 (NK3) receptor immunoreactivity in the rat gastrointestinal tract. *Cell Tissue Res* 289: 1-9
- Marksteiner J, Sperk G, Krause JE (1992) Distribution of neurons expressing Neurokinin B in the rat brain: Immunohistochemistry and In Situ hybridization. *J Comp Neurol*. 317:341-356
- Munekata E (1991) Neurokinin A and B. *Comp Biochem Physiol* 98:171-179
- Massi M, Panocka I, Caro G (2000) The psychopharmacology of tachykinin NK-3 receptors in laboratory animals. *Peptides* 21: 1597-1609
- McLeod AL, Krause JE, Ribeiro da Silva A (2000) Immunohistochemical localization of Neurokinin B in rat spinal dorsal horn and its association with SP and GABA: An electron microscopic study. *J comp Neurol* 420: 349-362
- Mileusnic D, Magnuson DJ, Hejna MJ, Lorens JB, Lorens SA, Lee JM (1999) Age and species-dependent differences in the neurokinin B system in rat and human brain. *Neurobiology of Aging* 20: 19-35
- Moussaoui SM, Le Prado N, Bonici B, Faucher DC, Cuine F, Laduron PM, Garret C (1992) Distribution of Neurokinin B in rat spinal cord and peripheral tissues: Comparison with Neurokinin A and substance P and effects of neonatal capsaicin treatment. *Neurosci* 48: 969-978
- Munekata E (1991) Neurokinin A and B. *Comp. Biochem. Physiol.* 98C(1): 171-179
- Mutschler E (1996) Arzneimittelwirkungen: Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie (7. Auflage), Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart
- Myers AC, Goldie RG, Hay DWP (2005) A Novel Role for Tachykinin Neurokinin-3 Receptors in Regulation of human Bronchial ganglia Neurons. *AM J Respir Crit Care Med* 171: 212-216
- Nakajima Y, Tsuchida K, Negishi M, Ito S, Nakanishi S (1992) Direct linkage of three tachykinin receptors to stimulation of both phosphatidylinositol hydrolysis and cyclic AMP cascades in transfected chinese hamster ovary cells. *J. Biol Chem* 267:2437-2442
- Narat M (2003) Production of Antibodies in Chickens *Food Technol Biotechnol* 41(3): 259-267

- Néan S, Germain N, Lagente V, Emonds-Alt X, Advenier C, Boichot E (2001) Inhibition of inflammatory cell recruitment by the tachykinin NK3-receptor antagonist SR 142801 in a murine model of asthma. *Eur J Pharmacol* 421: 201-205
- Page NM, Woods RJ, Gardiner SM, Lomthaisong K, Gladwell RT, Butlin DJ, Manyonda IT, Lowry PJ (2000) Excessive placental secretion of neurokinin B during the third trimester causes pre-eclampsia. *Nature* 405: 797-800
- Page NM, Woods RJ, Lowry PJ (2001) A regulatory role for Neurokinin B in placental physiology and pre-eclampsia. *Regul pep* 98: 97-104
- Page NM (2004) Hemokinins and endokinins. *Cell Mol Life Sci* 61: 1652-1663
- Parè D, Royer S, Smith Y, Lang EJ (2003) Contextual inhibitory gating of impulse traffic in the intra-amygdaloid network. *Ann N Y Acad Sci* 985: 78-91
- Patak E, Pennefather JN, Flemming A, Story ME (2002) Functional characterization of tachykinin NK1 receptors in the mouse uterus. *Brit J Pharmacol* 137: 1247-1254
- Patak E, Candenas ML, Pennefather JN, Ziccone S, Lilley A, Martin JD, Flores C, Mantecón AG, Story ME, Pinto FM (2003) Tachykinins and tachykinin receptors in human uterus. *Br J Pharmacol* 139:523-532
- Paxinos G, Franklin KBJ; *The Mouse Brain*. Academic Press; San Diego, San Francisco, New York, Boston, London, Sydney, Tokyo
- Pennefather JN, Lecci A, Candenas ML, Patak E, Pinto FM, Maggi CA (2004) Tachykinins and tachykinin receptors: a growing family. *Life Sci* 74: 1445-1463
- Pernow B (1983) Substance P. *Pharmacol Rev* 35:85-129
- Pinto FM, Cintado CG, Philippe D, Candenas ML (2001) Expression of preprotachykinin-B, the gene that encodes neurokinin B, in the rat uterus. *Eur J Pharmacol* 425: R1-R2
- Pinto FM, Almeida TA, Hernandez M, Devillier P, Advenier C, Candenas ML (2004) mRNA expression of tachykinins and tachykinin receptors in different human tissues. *Eur J Pharmacol* 494:233-239
- Quirk GJ, Likhtik E, Pelletier JG, Parè D (2003) Stimulation of Medial Prefrontal Cortex Decreases the Responsiveness of central Amygdala Output Neurons. *J Neurosci* 23(25): 8800-8807
- Ribeiro SJ, Teixeira RM, Calxto JB, De Lima TCM (1999) Tachykinin NK3 receptor involvement in anxiety. *Neuropeptides* 33(2): 181-188
- Rossi SG, Dickerson IM, Rotundo RL (2003) Localization of the Calcitonin Gene-related Peptide Receptor Complex at the Vertebrate Neuromuscular Junction and its Role in Regulating Acetylcholinesterase Expression. *J Biol Chem* 278(27): 24994-25000
- Rupniak NMJ, Carlson EJ, Webb JK, Harrison T, Porsolt RD, Roux S, de Felipe C, Hunt SP, Oates B, Wheeldon A (2001) Comparison of the phenotype of NK1R<sup>-/-</sup> mice with pharmacological blockade of the substance P (NK1) receptor in assays for antidepressant and anxiolytic drugs. *Behav Pharmacol* 12: 497-508

- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) Molecular cloning. A laboratory manual (2. Auflage). Cold Spring Harbour Laboratory, New York
- Sandoval Guzman T, Rance NE (2004) Central injection of senktide, an NK3 receptor agonist, or neuropeptide Y inhibits LH secretion and induces different patterns of Fos expression in the rat hypothalamus. *Brain res* 1026 (2004) 307-312
- Sanger GJ (2004) Neurokinin NK1 and NK3 receptors as targets for drugs to treat gastrointestinal motility disorder and pain. *Br J Pharmacol* 141: 1303-1312
- Santarelli L, Gobbi G, Debs PC, Sibille EL, Blier P, Hen R, Heath MJS (2000) Genetic and pharmacological disruption of neurokinin 1 receptor function decreases anxiety-related behaviour and increases serotonergic function. *PNAS* 98(4): 1912-1917
- Santarelli L, Saxe MD (2003) Substance P Antagonists: Meet the New Drugs, Same as the Old Drugs? Insight from transgenic Animal Models. *CNS Spectr* 8(8): 589-596
- Santiago AC, Shammah-Lagnado SJ (2004) Efferent Connections of the Nucleus of the Lateral Olfactory Tract in the Rat. *J Comp Neurol* 471: 314-332
- Schenkel J (1995) *Transgene Tiere*, Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg; Berlin; Oxford, Reihe Labor im Fokus
- Schwarzer C, Sperk G, Samanin R, Rizzi M, Gariboldi M, Vezzani A (1996) Neuropeptides-immunoreactivity and their mRNA expression in kindling: functional implications for limbic epileptogenesis. *Brain Res Rev*, 22: 27-50
- Severini C, Improta G, Falconieri-Erspamer G, Salvadori S, Erspamer V (2002) The Tachykinin Peptide Family. *Pharmacol Rev* 54:285-322
- Shugrue PJ, Lane MV, Merchenthaler I (1996) In situ hybridization of Neurokinin-3 mRNA in the rat central nervous system. *J Comp Neurol* 372:395-414
- Shumake J, Gonzalez-Lima F (2003) Brain systems underlying susceptibility to helplessness and depression. *Behav Cogn Neurosci Rev* 2: 198-221
- Sossin WS, Fisher JM, Scheller RH (1989) Cellular and Molecular Biology of Neuropeptide Processing and Packaging. *Neuron* 2:1407-1417
- Spitznagel H, Baulmann J, Blume A, Unger T, Culmann J (2001) C-FOS expression in the rat brain in response to substance P and neurokinin B. *Brain REs* 916(1-2): 11-21
- Suzuki H, Kamada N, Ueda O, Jishage K, Kurihara Y, Kodama T, Yazaki Y, Toyoda Y (1997) Germ-Line Contribution of Embryonic Stem Cells in Chimeric Mice: Influence of Karyotype and *In Vitro* Differentiation Ability. *Exp. Anim* 46(1): 17-23
- Sziklas V, Petrides M (1998) Memory and the region of the mammillary bodies. *Prog Neurobiol* 54:55-70
- Teixeira RM, Santos AR, Ribeiro SJ, Calixto JB, Ga R, De Lima TC (1996) Effects of central administration of tachykinin receptor agonists and antagonists on plus-maze behavior in mice. *Eur J Pharmacol* 311(1): 7-14



Vakalopoulos C (2006) Neuropharmacology of cognition and memory: A unifying theory of neuromodulator imbalance in psychiatry and amnesia. *Med Hypotheses* 66(2): 394-431

Vann SD, Aggleton JP (2003) Evidence of a Spatial Encoding Deficit in Rats with Lesions of the Mammillary Bodies or Mammillothalamic Tract. *J Neurosci* 23(8): 3506-3514

Wang H, Zhang YQ, Ding YQ, Zhang JS (2002) Localization of neurokinin B receptor in the mouse gastrointestinal tract. *World J Gastroenterol* 8(1): 172-175

Warden MK, Young WS (1988) Distribution of cells containing mRNAs encoding Substance P and Neurokinin B in the rat central nervous system. *J Comp Neurol* 272:90-113

Zaratin P, Angelici O, Clarke GD, Schmid G, Raiteri M, Carità F, Bonanno G (2000) NK3 receptor blockade prevents hyperalgesia and the associated spinal cord substance P release in monoarthritic rats. *Neuropharmacol* 39(1): 141-149

Zimmer A, Zimmer A, Baffi J, Usdin T, Reynolds K, König M, Palkovits M, Mezey E (1998) Hypoalgesia in mice with a targeted deletion of the Tachykinin 1 gene. *Proc Natl Acad Sci* 95: 2630-2635

## Kapitel 7

# Anhang

### 7.1 Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
Abb.	Abbildung
A. bidest	<i>Aqua bidestillata</i> zweifach destilliertes demineralisiertes Wasser
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintri-phosphat
BCIP	5-Bromo-4-chloro-3-indolylphosphat
BSA	bovines Serumalbumin
C	Cytosin
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
cDNA	Komplementäre DNA
CGRP	<i>Calcitonin gene related peptide</i>
DAB	Diaminobenzidin
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DIG	Digoxigenin
DMEM	<i>Dubelcco's Modified Eagle Medium</i>
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	Desoxynukleotidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
FCS	Foetales Kälberserum
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ES-Zellen	Embryonale Stammzellen
FIAU	2'-Deoxy-2'-fluoro- $\beta$ -D-arabinofuranosyl-5-iodouracil
G	Guanin
GABA	Gamma-Aminobuttersäure
GDP	Guanosindiphosphat
GTP	Guanosintri-phosphat
HBSS	<i>Hanks' balanced salt solution</i>
KO	<i>Knockout</i>
hCG	Humanes Choriongonadotropin

---

ICM	<i>inner cell mass</i>
IgG	Immunglobulin G
IgY	Antikörper aus Hühnereigelb
IP3	Inositoltriphosphat
IR	Immunoreaktivität
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
LB-Medium	Nährmedium nach Luria-Bertani
LIF	<i>Leukemia inhibitory factor</i>
MEF	Murine embryonale Fibroblasten
m/v	Masse pro Volumen
MOPS	Morpholinopropansulfonsäure
NaCl	Natriumchlorid
NBT	<i>Nitroblue tetrazolium</i>
NK1	Neurokininrezeptor 1
NK2	Neurokininrezeptor2
NK3	Neurokininrezeptor3
NKA	Neurokinin A
NKB	Neurokinin B
PAC	<i>Phage artificial chromosom</i> , künstliches Phagenchromosom
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i> , Phosphatpuffer
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> , Polymerase Kettenreaktion
PFA	Paraformaldehyd
PMS	Pregnant mare serum
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	PCR kombiniert mit reverser Transkription
SDS	Sodium dodecyl sulfate), Natriumdodecylsulfat
SP	Substanz P
T	Thymin
Tab.	Tabelle
Tac1	SP und NKA codierendes Gen
Tac2	Gen, das NKB bei Ratten und Mäusen
Tac3	humanes NKB codierendes Gen
Tac4	Gen, das Endokine und Hemokine codiert
TAE-Puffer	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TEMED	N,N,N',N',-Tetramethyldiamin
UpM	Umdrehungen pro Minute
v/v	Volumen pro Volumen
wt	Wildtyp
ZNS	zentrales Nervensystem

## 7.2 Aminosäurecode

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

# Publikationen

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht in:

Duarte CR, Schütz B, Zimmer A (2006) Incongruent pattern of neurokinin B expression in rat and mouse brains. *Cell Tissue Res* 323(1): 43-51

# Danksagung

Mein Dank gilt:

Herrn Prof. Dr. A. Zimmer für die Überlassung eines interessanten Themas, die ausgezeichneten Arbeitsbedingungen im Labor und die wissenschaftliche Betreuung dieser Arbeit.

Frau Prof. Dr. C. Müller für die Unterstützung meiner Arbeit.

Herrn Dr. Burkhard Schütz für die ausgezeichnete Betreuung meiner Arbeit, für die vielen wertvollen fachlichen Diskussionen zur Durchführung und Darstellung dieser Arbeit selbst nach dem Verlassen unseres Labors.

Allen Mitarbeitern aus dem Labor für Molekulare Neurobiologie für ein angenehmes Arbeitsklima, ihre Hilfsbereitschaft und Geduld.

Meinem gesamten Freundeskreis der mich während des Studiums und während dieser Arbeit geduldig ertragen und unterstützt hat. Besonders erwähnen möchte ich dabei meiner zweite Gehirnhälfte Agnès Baermann und alle, die mich in der Endphase dieser Arbeit finanziell unterstützt haben.

Ganz besonderen Dank gilt meinen Eltern, die mich trotz vieler Bedenken immer meinen eigenen Weg haben gehen lassen.

# Lebenslauf

## Angaben zur Person:

Name: Ribeiro Duarte  
Vorname: Celia  
Geburtsdatum: 12.07.1974  
Geburtsort: Neuss, Deutschland  
Staatszugehörigkeit: portugiesisch  
Familienstand: ledig  
Anschrift: Heerstr. 191  
53111 Bonn

## Schulische Bildung:

1985 - 1994: Schule Marienberg Neuss/Rhein  
Erzbischöfliches Gymnasium für Mädchen

## Hochschulausbildung:

1994 - 1999: Studium der Pharmazie an der  
Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität, Bonn

8. April 1997: Erster Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung

20. April 1999: Zweiter Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung

Mai 1999 -  
Oktober 1999: Erste Hälfte des praktischen Jahres  
Neue Apotheke, Duisdorf, Bonn

November 1999 -  
Mai 2000: Zweite Hälfte des praktischen Jahres  
und Anfertigung des praktischen Teils der Diplomarbeit  
in der Apotheke der Rheinischen Kliniken Viersen

Oktober 1999-  
September 2000:  
14. September 2000: Aufbaustudiengang Diplom-Pharmazie  
Diplomprüfung und  
Erlangung des akademischen Grades  
Diplom-Pharmazeutin

3. April 2001: Dritter Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung

August 2001-  
Februar 2006: Tätigkeit als Doktorandin  
in der Molekularen Neurobiologie, Uniklinik Bonn