

Herstellung und Analyse einer Maus mit einer gezielten Inaktivierung des TRH-Rezeptor-1-Gens

Vom Fachbereich Chemie der Universität Hannover
zur Erlangung des Grades

Doktor der Naturwissenschaften
Dr. rer. nat.

genehmigte Dissertation
von Diplom-Biochemiker Roland Rabeler
geboren am 19.07.1970 in Hannover

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Dezember 1996 bis September 2001 am Max-Planck-Institut für experimentelle Endokrinologie in Hannover unter der Betreuung von Prof. Dr. K. Bauer angefertigt.

Referent: **Prof. Dr. K. Bauer**
Max-Planck-Institut für experimentelle Endokrinologie,
Hannover

Korreferent: **Prof. Dr. W. H. Müller**
Abteilung Physiologische Chemie,
Medizinische Hochschule Hannover

Tag der Promotion: 30. Oktober 2001

An dieser Stelle möchte ich allen Danken, die mich bei der Erstellung dieser Arbeit tatkräftig unterstützt haben:

Mein besonderer Dank gilt Prof. Karl Bauer für die Bereitstellung des interessanten Themas, für seine ständige Diskussionsbereitschaft und seine nicht enden wollende Zuversicht.

Prof. W. H. Müller danke ich herzlich für die Übernahme des Korreferates und für seine Zuversicht vermittelnde Hilfsbereitschaft.

Prof. Ulli Rüther und Dr. Birgit Weinhold danke ich für die Einführung in die Grundlagen der Knockout-Technik.

Dr. Ahmed Mansouri und Jens Kroll danke ich für die Teilhabe an den Geheimnissen der Morula-Aggregation.

Bei Dr. Michael Leitges und Dr. Jochen Klock möchte ich mich für einen sehr angenehmen und fruchtbaren Arbeitsaufenthalt in Freiburg bedanken. Darüber hinaus gilt mein besonderer Dank Dr. Leitges für den verantwortungsvollen Umgang mit meinen Tieren.

Dr. Martin Schäfer danke ich für seine mitreißende Begeisterung, für kritische Diskussionen und Anregungen und nicht zuletzt für *in situ*-Tips und -Tricks.

Dr. Theo Visser danke ich für seine Diskussionsbereitschaft und die Messung der Schilddrüsen-Hormonkonzentrationen.

Dr. Hubertus Jarry und Maria Metten danke ich für die Zusammenarbeit bei der Bestimmung der TSH- und Prolactin-Konzentrationen.

Dr. Jean Smolders danke ich für die Kooperation bei der Analyse des Hörvermögens meiner Mäuse und für die morphologische Untersuchung des Hörapparats.

Uwe Herzig und Siggi Falkenhagen möchte ich für die Herstellung exzellenter wissenschaftlicher Geräte und Hilfsmittel danken. Auch ausserhalb ihrer offiziellen Aufgaben und Pflichten waren sie immer ansprechbar und hilfsbereit.

Hans-Otto Bader und Nadine Naujokat danke ich für die ausgezeichnete Pflege meiner Tiere und die angenehme Zusammenarbeit.

Bedanken möchte ich mich bei den Mitarbeitern des „ersten Stocks“, besonders den Teilnehmern der Mittagsrunde, für ihre Hilfsbereitschaft und Diskussionsfreude.

Danken möchte ich aber vor allem den derzeitigen und ehemaligen Mitgliedern der Bauer'schen Arbeitsgruppe, für eine tolle Atmosphäre und für eine ständige Hilfsbereitschaft und Anteilnahme. Mein besonderer Dank gilt Stephanie Christ, Dr. Krzysztof Paliga, Valerie Ashe, Lars Geffers und dem Trainer Sönke Friedrichsen für ihr engagiertes Korrekturlesen. Darüber hinaus danke ich Lars Geffers und Ralf Sigmund für ihre unverzichtbare Hilfe bei Problemen der rechnergestützten Datenverarbeitung. Meinen Freunden Ralf Sigmund und Dr. Theo Papadopoulos danke ich dafür, dass sie da waren, wenn man sie brauchte.

Nicht zuletzt möchte ich mich bei meinen Eltern bedanken, für ihre uneingeschränkte Unterstützung und engagierte Anteilnahme bei den Erfolgen und Rückschlägen meines Studentenlebens. Ohne Sie hätte es diese Arbeit nicht gegeben.

Und Kathrin,... weiß Bescheid!

Die Lust am Erkennen

Weshalb ist das Erkennen, das Element des Forschers und Philosophen, mit Lust verknüpft?

Erstens, und vor allem, weil man sich dabei seiner Kraft bewusst wird, ...

Zweitens, weil man im Verlauf der Erkenntnis über ältere Vorstellungen und deren Vertreter hinaus kommt, Sieger wird oder wenigstens es zu sein glaubt.

Drittens, weil wir uns durch eine noch so kleine Erkenntnis über alle erhaben und uns als die Einzigsten fühlen, welche hierin das Richtige wissen.

Friedrich Nietzsche: *Menschliches, Allzumenschliches*

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	1
1.1	Einführung	1
1.2	Die Hypothalamus-Hypophyse-Schilddrüsen Achse	3
1.3	Das TRH-Signalsystem	6
1.3.1	TRH	6
1.3.2	TRH abbauendes Ektoenzym	8
1.3.3	TRH-Rezeptoren	10
1.4	Zielsetzung	17
2	MATERIAL UND METHODEN	19
2.1	Knockout Technologie	19
2.1.1	Einleitung	19
2.1.2	Targeting Konstrukt	20
2.1.3	Verwendete ES-Zellen	21
2.1.4	Verwendete Tierstämme	22
2.1.5	ES-Zellkultur	23
2.1.6	Elektroporation der ES-Zellen	23
2.1.7	Selektion der ES-Zellen	24
2.1.8	Isolierung der Klone	24
2.1.9	Analyse der isolierten Klone	24
2.1.10	Generierung von Keimbahn-Chimären	25
2.1.11	Gewinnung von Embryonen	25
2.1.12	Isolierung der Embryonen	26
2.1.13	Entfernung der Zona Pellucida	26
2.1.14	Morula Aggregation	26
2.1.15	Erzeugung scheinträchtiger Mäuse	27
2.1.16	Uterus-Transfer	27
2.1.17	Analyse der chimären Mäuse	28
2.1.18	Analyse der Keimbahn-Transmission	28
2.2	DNA und RNA Methoden	29
2.2.1	Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien	29
2.2.2	Isolierung genomischer DNA aus embryonalen Stammzellen	30
2.2.3	Isolierung genomischer DNA aus Schwanz-Biopsien	31
2.2.4	Isolierung von Poly(A) ⁺ -angereicherter-RNA	32
2.2.5	Southern-Blot-Analyse	33
2.2.6	Northern-Blot-Analyse	35
2.3	Histologische Analyse	36
2.3.1	Gewinnung und Verarbeitung der untersuchten Gewebe	36
2.3.2	<i>In situ</i> -Hybridisierung	37
2.3.3	<i>In vitro</i> -Transkription	37
2.3.4	Fixierung und Prähybridisierung	38
2.3.5	Hybridisierung und Posthybridisierung mit radioaktiv markierten Sonden	39

2.3.6	Hybridisierung und Posthybridisierung mit DIG markierten Sonden	40
2.3.7	Doppel- <i>in situ</i> : radioaktive ISH kombiniert mit DIG-ISH	41
2.3.8	LacZ-Färbung.....	41
2.4	Primär- und Gewebeskultur.....	42
2.4.1	Hypophysenzell-Kultur	42
2.4.2	Stimulation der kultivierten Adenohypophysenzellen	44
2.4.3	Hypophysenhälften-Kultur.....	44
2.4.4	Radio-Immuno-Assay	45
2.5	Verwendete cDNA-Fragmente und Plasmide	45
3	ERGEBNISSE	48
3.1	Herstellung TRH-R1-defizienter Mäuse.....	48
3.1.1	Generierung des Targetingvektors	48
3.1.2	<i>Gene Targeting</i> in embryonalen Stammzellen.....	50
3.1.3	Erzeugung von Chimären.....	50
3.1.4	DNA- und RNA-Analyse der knockout-Tiere	51
3.2	Phänotyp TRH-R1-defizienter Mäuse	52
3.2.1	Allgemeines Erscheinungsbild und Verhalten	52
3.2.2	Verminderte Gewichtszunahme	52
3.2.3	Verminderte Körpertemperatur	53
3.2.4	Kälte-Exposition	53
3.3	Endokrinologische Analyse.....	54
3.3.1	Schilddrüsen-Hormon-Werte	54
3.3.2	TSH-Werte	55
3.3.3	Prolactin-Werte	56
3.3.4	DIG- <i>in situ</i> -Analyse der hypophysären hormonproduzierenden Zellen.....	57
3.3.5	Somatotrope, corticotrope und gonadotrope Zellen.....	57
3.3.6	Lactotrope Zellen	59
3.3.7	Thyrotrope Zellen	59
3.3.8	LacZ-Expression in der Hypophyse.....	61
3.3.9	TRH-Bindung in Maus-Hypophysen	63
3.3.10	TRH-Induktionsexperimente	64
3.3.11	Hormon-TRH-R1-Kolokalisierung.....	67
3.4	Ontogenie des TRH-Signalsystems	72
3.5	LacZ-Expression unter der Kontrolle des TRH-R1-Promotors.....	81
3.5.1	Embryonale Verteilung der lacZ-Aktivität	81
3.5.2	Adulte Verteilung der lacZ-Aktivität.....	85
3.6	Das TRH-Signalsystem in der Ratte und in der Maus.....	97
4	DISKUSSION	102
4.1	Einleitung	102
4.2	TRH-defiziente Mäuse.....	104

4.3	Eine natürliche TRH-Rezeptor-1-Defizienz im Menschen.....	105
4.4	Der Phänotyp TRH-Rezeptor-1-defizienter Mäuse	106
4.5	Endokrinologische Analyse	108
4.6	Die Hypophyse	109
4.7	Das TRH-Signalsystem während der Entwicklung	113
4.8	Das TRH-Signalsystem im adulten ZNS.....	118
4.9	Postscriptum	122
5	ZUSAMMENFASSUNG.....	124
6	ABSTRACT	125
7	LITERATUR.....	126

1 Einleitung

1.1 Einführung

Das endokrine System beinhaltet die physiologischen Mechanismen, die zusammen mit dem Nervensystem und dem Immunsystem die Kommunikation zwischen Zellen und Organen ermöglichen. Die vielschichtige Funktion des endokrinen Systems besteht vor allem in der Steuerung von langfristigen Prozessen wie Reproduktion und Wachstum sowie in der Homöostase lebenswichtiger Systeme, wie des Wasser- und Elektrolythaushalts, sowie des Energiestoffwechsels. Diese Regelfunktionen müssen ständig an die aktuelle Situation adaptiert werden, das heißt, das Endokrinium muss adäquat auf Veränderungen im äußeren und inneren Milieu reagieren können.

Nachrichtenüberträger des endokrinen Systems sind chemische Signalsubstanzen, die Hormone. Sie werden nach der klassischen Definition in endokrinen Drüsen gebildet und in den Blutkreislauf sezerniert, um an ihren Wirkort zu gelangen. Die Hormone sind jedoch nicht auf ihre endokrine Funktion beschränkt. Mittlerweile wurden fast sämtliche Signalsubstanzen auch im zentralen Nervensystem (ZNS), im vegetativen Nervensystem und im Immunsystem nachgewiesen.

Die präzise **Regulation der Hormonwirkung** geschieht auf allen Ebenen des endokrinen Systems: auf der Ebene der Hormonsynthese, der Sekretion, des Transports, des Rezeptors und des Hormon-Metabolismus. Die basale Hormonsekretion folgt bei den meisten endokrinen Systemen spezifischen endogenen Rhythmen. Sie ändert sich im Laufe vieler Jahre (Alterungsprozesse, z. B. Wachstumshormon, GH), mehrerer Wochen (Menstruationszyklus, z. B. luteinisierendes Hormon, LH), eines Tages (zirkadian oder diurnal, z. B. Cortisol) oder in noch kürzeren Zeitabständen (episodisch oder pulsatil). Hierbei sind oftmals verschiedene Rhythmen überlagert.

Die Regulation der Hormonsekretion erfolgt über komplexe negative und positive Rückkopplungsmechanismen. Bei der funktionellen Verbindung verschiedener endokriner Drüsen spricht man von einer Achse. Die Hauptachsen des endokrinen Systems sind die Achsen **Hypothalamus-Hypophyse-periphere Drüsen**.

Der **Hypothalamus** ist ein kleiner ventraler Teil des Diencephalon. In seiner medialen, ventrikelnahen Region enthält er mehrere Kerngebiete, deren Neurone Peptidhormone

synthetisieren, welche die Funktion der Adenohypophyse und damit der peripheren Drüsen steuern. Die Axone projizieren zur Eminentia mediana an der rostralen Seite des Hypophysenstiels und geben hier ihr Neurosekret in das hypophysäre Portalkreislaufsystem ab. Durch dieses spezielle Blutgefäßsystem werden die Peptidhormone auf kurzem Weg zu den Zellen der Adenohypophyse transportiert. Hypophysäre Releasing-Hormone stimulieren die Synthese und Freisetzung von Hypophysenhormonen, Inhibiting-Hormone hemmen deren Sekretion.

Die neurosekretorischen Neurone aus dem magnozellularären, rostralen Bereich ziehen größtenteils über die Eminentia mediana hinweg und enden in der Neurohypophyse. Ihre neurosekretorischen Produkte Oxytocin und Vasopressin/Adiuretin werden hier in den Körperkreislauf abgegeben.

Die **Hypophyse** liegt im so genannten Türkensattel der Schädelbasis und ist cranial durch ein Diaphragma cerebri gegenüber dem Gehirn abgegrenzt. Die **Adenohypophyse** bildet den deutlich größeren Hypophysenvorderlappen (Pars anterior), die **Neurohypophyse** den Hypophysenhinterlappen (Pars posterior). Die Adenohypophyse entwickelt sich aus der so genannten Rathke-Tasche und ist somit ektodermal epithelialen Ursprungs.

Die Adenohypophyse ist das zentrale Steuerungsorgan im endokrinen System. Die Hormone des Hypophysenvorderlappens sind Polypeptide und werden in spezifischen Zellen synthetisiert. Sie stimulieren als glandotrope Hormone die Funktion der jeweiligen peripheren Drüsen:

- **ACTH** (adrenocorticotropes Hormon) steuert die Nebennierenrinde.
- **TSH** (thyroideastimulierendes Hormon) steuert die Schilddrüsenfunktion.
- **LH** (luteinisierendes Hormon) und **FSH** (follikelstimulierendes Hormon) koordinieren die Funktion der Gonaden.

Die nichtglandotropen Hormone **Prolactin** und **GH** (*growth hormone*, Wachstumshormon) wirken auf viele Zellen des Körpers:

- **GH** ist ein essentieller Faktor für das Längenwachstum und an der Regulation des Protein- und Kohlehydratstoffwechsels beteiligt.
- **Prolactin** ist beteiligt bei der Steuerung des Reproduktionssystems. Es stimuliert unter anderem die Milchbiosynthese und steuert die Laktation. Bei Nagern ist die semizirkadiane Prolactinsekretion zudem essentiell für die Bildung und Aufrechterhaltung des Corpus luteum

der Schwangerschaft (Arey and Freeman 1989; Arey and Freeman 1990). Bei anderen Säugern konnte diese luteotrope Funktion nicht nachgewiesen werden.

Die Sekretion der hypophysären Hormone wird durch die hypophyseotropen Peptide des Hypothalamus reguliert. Die glandotropen Hormone werden daneben über Feedback-Mechanismen durch die Hormone ihrer peripheren Drüsen kontrolliert. Zusätzlich wird die Sekretion durch parakrine Signale innerhalb der Adenohypophyse moduliert.

1.2 Die Hypothalamus-Hypophyse-Schilddrüsen Achse

Die Hormone der Schilddrüse sind Trijod- (T_3) und Tetrajodthyronin (T_4 , Thyroxin). Während der Entwicklung sind sie entscheidend an Differenzierungs- und Wachstumsprozessen beteiligt. Beim Erwachsenen greifen sie stabilisierend in alle metabolischen Prozesse ein und haben daher Rezeptoren in nahezu allen Zellen des Organismus. Die Justierung der Hormon-Aktivität in einem engen Bereich ist für die regelrechte Funktion vieler Stoffwechselwege im Organismus essentiell.

Die hypothalamische Ebene:

TRH (thyreotropin-releasing-hormone, Thyreoliberin) wird von den Neuronen des hypothalamischen paraventriculären Nucleus gebildet und gelangt über das hypothalamisch-hypophysäre Pfortadersystem in die Adenohypophyse. Dort stimuliert es die Biosynthese und Sekretion von TSH. Neben dieser namensgebenden Aktivität bewirkt TRH in vergleichbarem Maße die Freisetzung von Prolactin (Prl) aus lactotrophen Zellen (Bowers, Friesen et al. 1971). Eine Wachstumshormon (GH)-Antwort auf TRH wurde hingegen bisher nur in niederen Wirbeltieren bzw. in pathophysiologischen Situationen (Akromegalie bzw. bestimmte *Diabetes mellitus* Formen) beobachtet (Winkler, Gero et al. 1987; Yamada, Monden et al. 1993).

Die Biosynthese und Sekretion des TRH wird hauptsächlich durch noradrenerge Verbindungen reguliert. Daneben steht TRH unter der Feedback-Kontrolle von TSH und der zirkulierenden Hormone T_3 und T_4 .

Die hypophysäre Ebene:

TSH (Thyreostimulierendes Hormon, Thyreotropin) ist das glandotrope Hormon der Adenohypophyse, das sämtliche Synthese- und Sekretionsprozesse der Schilddrüse sowie

deren Metabolismus steuert. So erhöht es die Blutversorgung, stimuliert alle Schritte der Biosynthese und Sekretion von Schilddrüsenhormon und die Aufnahme von Jod. Zusätzlich beeinflusst es Wachstum und Metabolismus des folliculären Epithels. Zellulär wird die TSH-Wirkung nach Bindung an den spezifischen Rezeptor durch die Aktivierung des cAMP-Signalsystems vermittelt.

Die TSH-Synthese und Sekretion wird durch TRH stimuliert und durch negative Rückkopplung von T_4 und T_3 gehemmt.

Es gibt drei Schilddrüsenhormone mit unterschiedlicher biologischer Aktivität und Bedeutung: **Thyroxin (T_4)** ist das Hauptprodukt der Schilddrüse und wird nur in dieser synthetisiert. Im Blut ist T_4 vor allem an thyroxinbindendes Globulin (TBG), daneben an Albumin und Transthyretin (TTR, auch als thyroxinbindendes Präalbumin (TBPA) bezeichnet) gebunden. Die Halbwertszeit dieser T_4 -Speicherform im Plasma beträgt zwischen einem (Nager) und sieben Tagen (Mensch). Der tägliche Umsatz ist sehr gering, so dass tageszeitliche Schwankungen und Änderungen der Hormonsekretionsrate kaum Änderungen im Plasmaspiegel nach sich ziehen. T_4 ist als Prohormon zu betrachten, dessen Wirkung sich erst nach seiner Umwandlung entfaltet. Extrathyreoidal wird T_4 durch Dejodierung zum sehr aktiven Trijodthyronin (T_3) und zum biologisch nicht wirksamen reversen T_3 (rT_3) umgewandelt.

Trijodthyronin (T_3) ist das biologisch aktive Schilddrüsenhormon. Zum größten Teil entsteht es intrazellulär in seinen Zielzellen durch 5'-Dejodierung von T_4 . Dementsprechend befinden sich über 80 % des T_3 -Körperpools intrazellulär. Die Bindung an Plasmaproteine ist geringer als bei T_4 , so dass die Plasma-Halbwertszeit nur ca. einen Tag beträgt. T_3 wirkt nach Bindung an einen T_3 -Rezeptor aktivierend oder inhibierend auf die Transkription seiner Zielgene.

Neben T_3 wird, fast ausschließlich in der Peripherie, durch 5-Dejodierung des T_4 das so genannte **reverse T_3 (rT_3)** gebildet. Es hat keine biologische Aktivität und wird bei schweren Krankheits- oder Erschöpfungszuständen anstelle des T_3 aus T_4 gebildet. Ziel ist es hierbei, limitierte Energieressourcen für lebenswichtige (z. B. zentrale) Prozesse einzusparen.

Reguliert wird die Aktivierung und Inaktivierung der Schilddrüsenhormone in der Körperperipherie durch Organ- bzw. Gewebe-spezifische Dejodinase-Isoenzym-Systeme. Die verschiedenen Dejodinase-Isoenzyme unterliegen dabei Organ- und Zustands-spezifischen Regulationsmechanismen. Neben der Identität der Zelle bzw. des Organs sind dies unter

anderem die Schilddrüsenfunktion, die Ernährung, die Plasma-Glucosekonzentration, verschiedene Hormone usw.

Die **Regulation der Schilddrüsenhormone** erfolgt vor allem auf zwei Ebenen: durch die neuroendokrine Steuerung der HPT-Achse und den extrathyreoidalen Metabolismus der Schilddrüsenhormone (Aktivierung von T_3).

Die thyreotropen Zellen der Adenohypophyse werden durch TRH stimuliert und durch T_4/T_3 , Somatostatin, Glucocorticoide und Dopamin gehemmt. Nach Dejodierung des T_4 zu T_3 in den thyrotropen Zellen blockiert es die Synthese der beiden Untereinheiten des TSH und zusätzlich die des TRH-Rezeptors.

Das inverse Verhältnis zwischen Schilddrüsenhormon-Spiegeln und der TSH-Sekretion ist extrem präzise. Selbst kleinste Änderungen der Konzentration von frei zirkulierendem Schilddrüsenhormon können inhibitorische oder stimulatorische Effekte auf die TSH-Sekretion haben (Snyder and Utiger 1973; Saberi and Utiger 1975). Die Konzentration an TRH beeinflusst hierbei den Sollwert für die Feedback-Regulation der TSH-Sekretion durch Schilddrüsenhormon und ermöglicht dadurch die Anpassung der Schilddrüsenfunktion an veränderte Bedingungen (z. B. Kälte, Hunger oder *Diabetes*).

Störungen der Schilddrüsenfunktion gehören zu den häufigsten endokrinen Krankheiten. Wegen der wichtigen Funktionen der Schilddrüsenhormone sind sowohl eine Überfunktion (Hyperthyreose) als auch eine Unterfunktion (Hypothyreose) ernste Erkrankungen.

Die häufigste Form der **Hyperthyreose** wird durch Autoantikörper gegen den TSH-Rezeptor hervorgerufen (*Morbus Basedow*). Diese binden spezifisch an den TSH-Rezeptor und führen zu einer starken Stimulation der Schilddrüsenfunktion. Es kommt zu einer Aktivierung aller Stoffwechselprozesse, zu Tachykardie, zu einer Erhöhung der Körpertemperatur, zu Gewichtsabnahme, emotionaler Labilität und Schlaflosigkeit.

Eine **Hypothyreose** kann vielfältige Ursachen haben. Neben Jodmangel kann es durch eine Störung auf hypothalamischer (zentraler oder tertiärer Hypothyreodismus), hypophysärer (sekundärer Hypothyreodismus) oder Schilddrüsenebene (primärer Hypothyreodismus) verursacht sein. Bei Neugeborenen und besonders in der fötalen Phase führt eine Hypothyreose zu einer Retardierung aller Entwicklungsvorgänge und zu schweren und multiplen Störungen der ZNS-Funktion (Kretinismus). Beim Erwachsenen bewirkt die Unterfunktion unter anderem eine Verlangsamung vieler Stoffwechselprozesse, eine Senkung des Grundumsatzes und der Körpertemperatur sowie eine eingeschränkte Herzfunktion. Die

reduzierte Nierenfunktion führt zu einer charakteristischen Wassereinlagerung in alle Gewebe (Myxödem).

1.3 Das TRH-Signalsystem

1.3.1 TRH

Thyrotropin-Releasing Hormon (TRH) ist ein Tripeptidamid mit der Sequenz pyroGlu-His-Pro-NH₂. Benannt ist es nach seiner TSH-freisetzenden Wirkung in der Hypophyse. Auf der Basis seiner neuroendokrinen Funktion gelang es, TRH als erstes Neuropeptidhormon zu isolieren und anschließend chemisch zu charakterisieren (Boler, Enzmann et al. 1969; Burgus, Dunn et al. 1969).

TRH wird aus einem Präprohormon gebildet, in dem die Vorläufersequenz -Gln-His-Pro-Gly- bei Maus und Ratte fünfmal, beim Menschen sechsmal vorhanden ist. Die TRH-Vorläufersequenzen sind hierbei jeweils von Paaren basischer Aminosäuren flankiert, an denen die Spaltung durch spezifische Endopeptidasen, den Prohormon-Convertasen (vor allem PC1 und PC2) erfolgt. Anschließend katalysieren Glutamylcyclasen die Zyklisierung des N-terminalen Glutaminrestes (Fischer and Spiess 1987) und eine Peptidylglycin- α -amidierende Monooxygenase die C-terminale Amidierung des Peptids (Perkins, Husten et al. 1990).

Darüber hinaus gibt es sehr starke Hinweise für die Existenz extrahypothalamisch-hypophysärer Wirkorte dieses Tripeptids, die weitere, nicht allein endokrine Funktionen vermuten lassen.

Schon früh wurde für TRH eine Signalfunktion in der **Peripherie** postuliert. Im Ratten-**Pankreas** konnte immunoreaktives TRH nachgewiesen werden (Morley, Garvin et al. 1977) dessen Konzentration, in Übereinstimmung mit den mRNA-Spiegeln, in der neonatalen Periode am höchsten ist (Aratan-Spire, Wolf et al. 1984; Dutour, Giraud et al. 1987). Innerhalb des Pankreas ist TRH in den Insulin-produzierenden β -Zellen der Langerhansschen Inseln lokalisiert (Kawano, Daikoku et al. 1983; Leduque, Wolf et al. 1985; Leduque, Aratan-Spire et al. 1989). Aufgrund der Kolokalisation mit Insulin wurde vermutet, dass TRH die Insel-Funktion modulieren könnte. An perfundierten pankreatischen Inseln konnte nachgewiesen werden, dass TRH in der Lage ist, die Glucose-induzierte Insulinfreisetzung zu

potenzieren (Kulkarni, Wang et al. 1995). In demselben *in vitro* System konnte gezeigt werden, dass Glucose die pankreatische TRH-Sekretion stimuliert und Insulin sie inhibiert (Benicky and Strbak 2000).

Auch im **Magen** konnte immunoreaktives TRH nachgewiesen werden (Morley 1979). Zudem konnte gezeigt werden, dass TRH die Magensäure-Sekretion stimuliert und die Darmmotilität erhöht (Tache, Vale et al. 1980; Furusawa, Morise et al. 1992).

Die Funktion der in den Leydigzellen des **Hoden** nachgewiesenen TRH-Expression ist dagegen umstritten. Das Vorhandensein hoch affiner Bindungsstellen und der Nachweis von TRH-Rezeptor mRNA ebenfalls in den Leydigzellen (Zhang, Zhang et al. 1995) legt eine parakrine oder autokrine Rolle des TRH bei der testikulären Funktion nahe. Da im Hoden aber vor allem unvollständig gespleißte ppTRH-Transkripte nachgewiesen werden konnten (Schomburg and Bauer 1999) und dementsprechend nur geringste Mengen authentischen TRHs vorhanden sind, muss die genaue Funktion noch evaluiert werden.

Auch im **Herzen**, vor allem in den Atrien, konnte TRH-mRNA nachgewiesen werden (Carnell, Feng et al. 1992). Zudem konnte gezeigt werden, dass TRH in Tiermodellen für endotoxische und hämorrhagische Schockzustände die kardiovaskuläre Funktion stimulieren kann (Zheng, Chen et al. 1990). Ob es sich dabei jedoch um eine direkte Wirkung von TRH auf das Herz handelt, ist umstritten. Da im Herzgewebe hochaffine Bindungsstellen detektiert werden konnten und zumindest über RT-PCR auch TRH-R1-mRNA nachgewiesen werden konnte (Fukusumi, Ogi et al. 1995), ist eine lokale Wirkung jedoch prinzipiell möglich.

Die Annahme einer **zentralnervösen Funktion** des TRH beruht zum einen auf der weiten Verbreitung des Peptids in nichtendokrinen extrahypothalamischen Regionen des ZNS. Schon früh konnte gezeigt werden, dass über 70 % des radioimmunologisch nachweisbaren TRH-Gesamtgehalts auf diese Regionen entfällt (Winokur and Utiger 1974).

Aufgrund seiner außergewöhnlichen Struktur (Mangel an geeigneten reaktiven Gruppen) hat sich TRH bislang einer umfassenden histochemischen Darstellung seiner Projektionen entzogen. Die Vorbehandlung von Tieren mit Colchicin, zur Unterdrückung des axonalen Transports und damit Anreicherung des Neuropeptids im Perikaryon, ermöglichte zumindest eine genauere Detektion TRH-immunoreaktiver Neuronen (Tsuruo, Hokfelt et al. 1987). So konnten TRH-immunoreaktive Neurone in Arealen des ZNS wie z. B. Bulbus olfactorius, verschiedenen hypothalamischen Kerngebieten, im cerebralen Cortex, in der hippocampalen Formation, im Amygdala-Komplex, in verschiedenen Kerngebieten des Hirnstamms und im dorsalen Horn des Rückenmarks nachgewiesen werden.

Weitere Hinweise auf eine zentralnervöse Funktion lieferten die zahlreichen pharmakologischen Effekte und Verhaltensänderungen, die bei zentraler und/oder peripherer Applikation von TRH beobachtet wurden (Morley 1979; Nemeroff, Kalivas et al. 1984; Griffiths 1985; Horita, Carino et al. 1986; Reichlin 1986): Die Gabe von TRH führt beispielsweise zu einer Steigerung der lokomotorischen Aktivität, zu Zittern der Vorderpfoten und zu einer Verkürzung des Schlafs. Letzteres äußert sich speziell bei winterschlafenden Tieren in einem abrupten Erwachen. Eine verstärkte Aktivität des peripheren sympathischen und parasympathischen Systems nach TRH-Gabe manifestiert sich unter anderem in Tachykardie, Bluthochdruck, erhöhter Darmmotilität und pankreatischer Sekretion sowie einer Verengung der Pupillen. Die bei Ratten nachgewiesenen, so genannten „wet dog shakes“ ähneln hierbei Opiat-Entzugserscheinungen.

Gleichzeitig zeigt TRH einen eindrucksvollen antisedativen Effekt, indem es die Wirkdauer zahlreicher Narkotika drastisch verkürzt. Auch die durch Ethanol oder Barbiturate hervorgerufene Hypothermie vermag TRH zu antagonisieren.

Zusammenfassend zeigt TRH Gemeinsamkeiten mit der Wirkung von Antiepileptika, Antidepressiva und Psychostimulantien. Das pharmakologische Profil lässt jedoch keine eindeutige Zuordnung zu einer dieser Klassen zu. Um die generell ZNS-aktivierenden Eigenschaften dieses Neuropeptids zu betonen, wurde TRH als **endogene ergotrophe** Substanz definiert (Metcalf and Dettmar 1981; Reichlin 1986).

1.3.2 TRH abbauendes Ektoenzym

Schon bevor die chemische Struktur von TRH aufgeklärt werden konnte, war klar, dass es effektive Inaktivierungsmechanismen gibt. Aufgrund seiner ungewöhnlichen Struktur ist TRH jedoch gegenüber allen bekannten unspezifischen Ektopeptidasen resistent (O'Cuinn, O'Connor et al. 1990). Die Charakterisierung des TRH-abbauenden Ektoenzym (TRH-degrading ectoenzyme, TRH-DE) gelang schließlich, nachdem in Gehirnhomogenaten eine membranständige TRH-inaktivierende Aktivität identifiziert werden konnte, die die pyroGlu-His-Bindung hydrolysiert. Dies führte zur partiellen Aufreinigung des Enzyms als lösliches Papain-Fragment aus Meerschweinchen (O'Connor and O'Cuinn 1985) und als lösliches Trypsin-Fragment aus Kaninchen (Wilk and Wilk 1989). Die genaue Charakterisierung wurde schließlich durch die Isolierung des Enzyms aus Schweine- und Rattenhirn ermöglicht (Bauer 1994). Aufgrund der dafür notwendigen 200.000fachen Anreicherung, konnte auf eine

geringe Gesamtmenge des exprimierten Proteins geschlossen werden. Die Bestimmung von Teilsequenzen des Proteins erlaubte letztendlich die Klonierung des Enzyms aus dem Gehirn bzw. aus der Adenohypophyse der Ratte (Schauder, Schomburg et al. 1994).

Hierbei handelt es sich um ein **TypII-Transmembranprotein** mit einem kurzen cytosolischen Anteil, dem der hydrophobe Bereich der Transmembrandomäne folgt. Der extrazellulär gelegene C-terminale Teil wiederum enthält neben zahlreichen Glykosylierungsstellen ein für **Zink-Metalloproteasen** charakteristisches Sequenzmotiv. Dies bestätigte die bereits nachgewiesene Zink-Abhängigkeit der enzymatischen Aktivität (Czekay and Bauer 1993).

Eine Sonderrolle in der Familie der Neuropeptid-inaktivierenden Enzyme kommt dem TRH-DE aufgrund seiner außergewöhnlich hohen Substratspezifität zu. Von allen pyroGlutenthaltenden, physiologisch wirksamen Verbindungen wird allein TRH als Substrat akzeptiert (Elmore, Griffiths et al. 1990). Gleichzeitig ist die TRH-DE die einzige zurzeit bekannte, extrazellulär lokalisierte Peptidase, die in der Lage ist, TRH zu spalten.

Die Gewebeverteilung des Enzyms ist hierbei von bemerkenswerter Heterogenität. Die höchsten enzymatischen Aktivitäten finden sich in Gehirnhomogenaten, gefolgt von Hypophysenhinterlappen, Retina, Rückenmark und Hypophysenvorderlappen. Niedrige Aktivitäten konnten in der Lunge und der Leber nachgewiesen werden, wohingegen im Skelettmuskel, dem Herz und der Niere keine signifikante Enzymaktivität detektierbar war (Bauer 1989).

Die im Serum identifizierte und aufgereinigte TRH-abbauende Aktivität führte zur Beschreibung des TRH-abbauenden Serumenzym (Taylor and Dixon 1978; Bauer and Nowak 1979; O'Cuinn, O'Connor et al. 1990), welches gleiche biochemische Eigenschaften wie das Ektoenzym aufweist. Neuere Untersuchungen (Schmitmeier 1998) zeigten, dass es sich beim Serumenzym um das Produkt des selben Gens handelt und es vermutlich durch „*Shedding*“ des membrangebundenen Ektoenzym entsteht.

Untersuchungen zur subzellulären Lokalisation ergaben im Gehirn eine Assoziation mit synaptosomalen Membranen (O'Connor and O'Cuinn 1984; Torres, Charli et al. 1986). Zellkulturexperimente zeigten, dass sich die Enzymaktivität in angereicherten Neuronenkulturen, nicht jedoch in Glia-Kulturen nachweisen lässt (Bauer, Carmeliet et al. 1990).

Über Zellfraktionierungsexperimente konnte in der Adenohypophyse eine bevorzugte Lokalisation auf Lactotrophen gezeigt werden, während somatotrophe Zellen keinerlei Enzymaktivität aufwiesen (Bauer, Carmeliet et al. 1990).

Gut untersucht ist die **hormonelle Regulation** der TRH-DE-Aktivität und ihrer Transkriptspiegel im Hypophysenvorderlappen. Hierbei zeigt sich eindrucksvoll die Funktion des Enzyms bei der Modulation der Hypophysenhormon-Freisetzung (von TSH und Prl), indem es die Stärke und Wirkdauer des hypothalamischen Signals (TRH) dem jeweiligen Hormonstatus anpasst:

Eine experimentell induzierte Hyperthyreose durch Gabe von **Schilddrüsenhormon** (T_3) führt zu einem schnellen und dramatischen Anstieg der Enzymaktivität und der Transkriptspiegel. Ein PTU-induzierter hypothyreoter Zustand führt hingegen zu einer Abnahme der Aktivität und Abfall der TRH-DE mRNA (Bauer 1987; Ponce, Charli et al. 1988; Schomburg and Bauer 1995).

Im Gegensatz zum T_3 -Effekt supprimiert die Gabe von **Östradiol** die Expression des TRH-DE. Dies erklärt unter anderem die in weiblichen Ratten um den Faktor Drei reduzierte Enzymaktivität (Schomburg and Bauer 1997). Die Funktion des Östradiol-Effekts ist hierbei vermutlich die Anpassung der Prolactin-Sekretion an den hormonellen Status.

Im Gegensatz zur Adenohypophyse unterliegt die Aktivität des TRH-abbauenden Ektoenzym im Gehirn und in den peripheren Organen keiner hormonellen Regulation (Emerson and Wu 1987; Ponce, Charli et al. 1988). Damit erfüllt die TRH-DE die Anforderung eines (obligatorisch hormonunabhängigen) Terminators einer möglichen TRH-Neurotransmitter und/oder Neuromodulatorfunktion.

1.3.3 TRH-Rezeptoren

TRH-Bindungsstudien

Obwohl TRH nahezu ubiquitär verteilt ist, ist die Anwesenheit stereospezifischer, hochaffiner Bindungsstellen auf relativ wenige Organe bzw. Gewebe beschränkt. Dazu zählen das Gehirn (Burt and Snyder 1975), die Hypophyse (Grant, Vale et al. 1973), die Retina (Burt 1979), und das Rückenmark (Prasad and Edwards 1984). Burt und Snyder (1975) waren die ersten, die eine stereospezifische Bindung von [3H]TRH auf Ratten-Gehirn-Membranen nachweisen konnten. Nachfolgende Analysen zeigten die große Ähnlichkeit zwischen der TRH-Rezeptor-Bindung im ZNS und der in der Adenohypophyse (Burt and Taylor 1980; Banerji and Prasad 1982).

TRH-Rezeptor 1 (TRH-R1)

Beim Versuch der Isolierung des TRH-Rezeptors aus der Adenohypophyse stellte sich heraus, dass die Aufreinigung dieses „low abundance“-Rezeptors mit biochemischen Standardmethoden und aus natürlichen Quellen nicht möglich war (Johnson, Nathanson et al. 1989).

1990 schließlich gelang es der Gruppe um Marvin Gershengorn, den TRH-Rezeptor 1 aus der Maus zu klonieren (Straub, Frech et al. 1990). Ohne Protein- oder Nucleinsäure-Sequenzen, die ein Screening mit Oligonucleotid-Sonden oder Antikörpern ermöglicht hätten, benutzten sie eine Expressionsklonierungsstrategie in *Xenopus* Oocyten. Als Template für die cDNA-Bibliothek wählten sie hierbei mRNA aus TSH-produzierenden Hypophysen-Tumorzellen. Eine Analyse der abgeleiteten Aminosäuresequenz zeigte, dass es sich bei dem Rezeptor um einen sieben Transmembran-Domänen enthaltenden, GTP-Bindungs- (G-)Protein gekoppelten Rezeptor (GPCR) handelt. Mit Hilfe der vom Maus-Rezeptor abgeleiteten Sequenzinformation gelang es, cDNA Klone aus verschiedenen Spezies zu isolieren, unter anderem aus Ratte (De la Pena, Delgado et al. 1992; Zhao, Yang et al. 1992; Sellar, Taylor et al. 1993) und Mensch (Duthie, Taylor et al. 1993; Matre, Karlsen et al. 1993; Yamada, Monden et al. 1993). Hierbei zeigte sich eine sehr hohe Sequenzhomologie in der Proteinkodierenden Region. Selbst auf Nucleinsäureebene weist der humane Rezeptor noch eine Homologie von 90,3 % zum Maus- und von 89,2 % zum Rattenrezeptor auf. Dennoch gibt es Unterschiede zwischen den einzelnen Spezies hinsichtlich der Sequenzen, die das offene Leseraster des Proteins kodieren.

TRH-R1-Isoformen

In der Maus existieren zwei Rezeptor 1-Isoformen (393 bzw. 412 Aa), die sich nur hinsichtlich ihres C-terminalen Endes unterscheiden und durch alternatives Splicing von zwei Exons gebildet werden (Duthie, Taylor et al. 1993).

Auch bei der Ratte lässt sich im C-terminalen Bereich alternatives Splicing beobachten, das zu Rezeptor-Isoformen führt (de la Pena, Delgado et al. 1992; Satoh, Feng et al. 1993). Struktur und Splicing unterscheiden sich jedoch von der im Mausgen. Außerdem wird die 412-Aminosäuren-Rezeptor-1-Isoform bei der Ratte auf einem einzelnen Exon kodiert.

Im Gegensatz zum Maus und Ratten TRH-R1-Gen konnten beim humanen Rezeptor 1 keine alternativen Splice-Akzeptor oder Splice-Donor Stellen im C-terminalen Bereich gefunden werden (Yamada, Monden et al. 1993). Gleichsam konnten bisher keine humanen TRH-R1-Isoformen nachgewiesen werden. Ein weiterer Unterschied existiert in einem zusätzlichen

Intron, das die Nucleotidsequenz unterbricht, die den dritten intrazellulären Loop zwischen Transmembrandomäne fünf und sechs kodiert.

Die funktionelle Bedeutung der Rezeptor-Isoformen ist noch nicht vollständig aufgeklärt. Eine Analyse der Ratten-Isoformen in *Xenopus* Oozyten ergab keine elektrophysiologischen Unterschiede (de la Pena, Delgado et al. 1992). Auch mutante Maus-Rezeptoren, denen der variable C-terminale Bereich fehlt, sind funktionell von wildtyp Rezeptoren nicht zu unterscheiden (Nussenzweig, Heinfliink et al. 1993). Da für die C-Termini von G-Protein gekoppelten Rezeptoren eine Funktion bei der Rezeptor-Desensibilisierung postuliert wird, ist es möglich, dass eine gewebsspezifische Expression der Rezeptor-Isoformen unterschiedliche Desensibilisierungs-Phänotypen ermöglicht.

Die dreidimensionale Struktur der TRH-R1-Bindungstasche und die beteiligten chemischen Wechselwirkungen bei der TRH-Bindung wurden in einem Übersichtsartikel von Marvin Gershengorn und Roman Osman detailliert erläutert (Gershengorn and Osman 1996).

Signaltransduktion

Die ersten direkten Hinweise darauf, dass die TRH-R1 vermittelte Signaltransduktion über G-Proteine erfolgt, lieferten Studien an somatomammotrophen Zelllinien (GH₃) der Ratte (Aragay, Katz et al. 1992; Hsieh and Martin 1992). Hier konnte erstmals gezeigt werden, dass die Bindung von TRH an seinen Rezeptor über eine Kopplung an die (Pertussis-Toxin-insensitiven) G-Proteine **G_q** und **G₁₁** zu einer Aktivierung der Phosphatidylinositol-spezifischen Phospholipase C- β führt. Dieses wiederum führt zur Hydrolyse von Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP₂) und zur Bildung der *second messenger* Inositol-1,4,5-triphosphat (**IP₃**) und 1,2-Diacylglycerin (**DAG**).

Neben G_q und G₁₁ konnte in bestimmten Zelltypen und unter spezifischen Bedingungen eine Kopplung an G_{i-2}, G_{i-3} und ein G_s-artiges Protein, das nicht die Adenylat-Cyclase aktiviert, gezeigt werden. Da die grundsätzliche TRH-R-Signalkaskade jedoch durch die Hydrolyse von PIP₂ initiiert wird, scheint die Kopplung an G_q und G₁₁ von primärer Bedeutung zu sein (Gershengorn and Osman 1996).

Die **Ca²⁺-Antwort** auf den TRH-Stimulus ist **biphasisch**. IP₃ bewirkt die rasche Freisetzung von Ca²⁺ aus intrazellulären Speichern und verursacht eine deutliche, transiente Erhöhung der Ca²⁺-Konzentration. Diese ist unabhängig von extrazellulärem Calcium.

Der initialen Ca²⁺-Spitze folgt eine geringere, aber langanhaltende Ca²⁺-Erhöhung. DAG und die erhöhte intrazelluläre Ca²⁺-Konzentration führen zu einer Aktivierung der Proteinkinase C und damit zu einer Öffnung spannungsabhängiger Calcium-Kanäle, die einen weiteren

Einstrom von Calcium in die Zelle ermöglichen. In der Hormon-produzierenden Zelle der Hypophyse führt dies zur Exozytose der vesikulär gespeicherten Hormone (Fomina and Levitan 1995; Hinkle, Nelson et al. 1996).

Hormonelle Regulation

Wie das TRH-abbauende Enzym ist auch der TRH-Rezeptor in der Adenohypophyse einer hormonellen Regulation unterworfen (DeLean, Ferland et al. 1977). Entsprechend seiner Funktion bei der endokrinen Steuerung ist die Art der Regulation hierbei spiegelbildlich zum TRH-DE: Ein erhöhter Schilddrüsenhormonspiegel führt zu einer verminderten Transkriptionsrate des TRH-Rezeptors, während die Induktion eines hypothyreoten Zustands eine Erhöhung der Transkriptspiegel bewirkt (Schomburg and Bauer 1995).

Die Gabe von Östradiol dagegen bewirkt sowohl eine Stimulation der TRH-R-Expression (Schomburg and Bauer 1997) als auch eine Erhöhung der Stabilität der Rezeptor-Transkripte (Kimura, Arai et al. 1994). Dieser Östradioleffekt ist als Ursache für die geschlechtsspezifischen Unterschiede der TRH-Rezeptordichte in der Adenohypophyse anzusehen.

Lokalisation

Bis heute ist es nicht gelungen, TRH-Rezeptor 1-Antikörper zu erzeugen, die eine ausreichende Spezifität für immunhistochemische Lokalisationsexperimente aufweisen. Somit konnten nur Bindungsexperimente mit radioaktiv markiertem TRH bzw. Me-TRH, *in situ* Hybridisierungsstudien und RT-PCR- bzw. Northern Blot-Analysen Hinweise auf die Gewebeverteilung des TRH-Rezeptors liefern. Bindungsexperimente erlauben hierbei keine eindeutige Unterscheidung zwischen verschiedenen Rezeptoren/Rezeptorisoformen. Die *in situ* Hybridisierung hingegen erlaubt zwar die Lokalisierung der zellulären Syntheseorte (der Perikaryen), aber nicht die des Wirkortes (der Synapse).

Zu berücksichtigen ist weiterhin, dass es vor allem bei der regionalen Verteilung der TRH-Rezeptor-Bindung im Gehirn zum Teil erhebliche Speziesunterschiede gibt (Taylor and Burt 1982).

Bindungsexperimente

Durch autoradiographische Analysen konnte eine bevorzugte Lokalisation der TRH-Bindung in limbischen Strukturen festgestellt werden. So ließen sich Signale in fast allen Kerngebieten der Amygdala, im Hippocampus (vor allem Subiculum und ventraler Gyrus dentatus), im

accessorischen olfactorischen Bulbus, im perirhinalen Cortex und in verschiedenen septalen Kerngebieten detektieren (Rostene, Morgat et al. 1984; Manaker, Winokur et al. 1985; Mantyh and Hunt 1985; Pazos, Cortes et al. 1985; Sharif 1989; Calza, Giardino et al. 1992). Darüber hinaus konnte in der Medulla oblongata, der Retina, in nahezu allen Kerngebieten des Hypothalamus und in vielen Kernen des Hirnstammes eine TRH-Bindung nachgewiesen werden (Sharif 1989).

***In situ*-Hybridisierungsstudien und RT-PCR- bzw. Northern Blot-Analysen**

Neben der Adenohypophyse konnte TRH-R1-mRNA in verschiedenen peripheren Geweben nachgewiesen werden. Über RT-PCR und Northern Blot Analyse konnten relativ hohe Expressionsspiegel im Uterus, im Thymus, in den Ovarien und im Hoden detektiert werden (Fukusumi, Ogi et al. 1995). Eine *in situ*-histochemische Analyse der Hoden-Expression ergab eine alleinige Lokalisation auf den Leydigzellen (Zhang, Zhang et al. 1995). Die postulierte Funktion von TRH als autokriner oder parakriner Regulator der reproduktiven Funktion und/oder Entwicklung ist jedoch umstritten (siehe TRH).

Als gesichert gilt hingegen die modulative Funktion bei der Glucose-stimulierten Insulin-Sekretion. Nachdem gezeigt werden konnte, dass pankreatisches TRH in den β -Zellen der Langerhansschen Inseln lokalisiert ist (Kawano, Daikoku et al. 1983; Vara and Tamarit-Rodriguez 1988) und sogar mit Insulin in den gleichen sekretorischen Granula vorliegt (Leduque, Aratan-Spire et al. 1989), konnte auch Rezeptor 1 mRNA in den Inselzellen nachgewiesen werden (Yamada, Shibusawa et al. 2000). Hierdurch ist die molekulare Grundlage für die *in vitro* beobachtete TRH-Modulation der Insulin-Sekretion gegeben (siehe TRH).

Im Rückenmark konnte eine starke Rezeptor-1-Expression in den α -Motoneuronen und eine schwächere in den superfiziellen Schichten I und II des dorsalen Horns gezeigt werden (Calza, Giardino et al. 1992).

Doch obwohl die Analyse der Verteilung der TRH-R1 mRNA im ZNS in vielen Bereichen eine gute Übereinstimmung mit der vorher ermittelten Verteilung der TRH-Bindungsplätze ergab (Calza, Giardino et al. 1992; Zabavnik, Arbuthnott et al. 1993; Heuer, Ehrchen et al. 1998), gab es auch gravierende Unterschiede. So konnten im cerebralen Cortex trotz detektierbarer TRH-Bindung nur wenige TRH-R1 exprimierende Zellen nachgewiesen werden. Gleiches gilt für die hippocampale Formation, in der trotz hoher Anzahl von Bindungsplätzen nur eine sehr begrenzte Expression der TRH-R1-mRNA gezeigt werden

konnte. Die Annahme einer präsynaptischen Lokalisation und weiter Projektionen konnte dieses Dilemma nur unzureichend erklären.

Die Annahme, dass das TRH-abbauende Ektoenzym im synaptischen Spalt als Terminator des TRH-Signals fungiert, implizierte, dass die zelluläre Verteilung des Enzyms den Ort der TRH-Freisetzung widerspiegelt. Wurde hierbei die weiträumige und Region-spezifische Verteilung der enzymatischen Aktivität (Friedman and Wilk 1986; Vargas, Cisneros et al. 1992) bzw. der TRH-DE mRNA (Heuer, Ehrchen et al. 1998) in Betracht gezogen, so musste das Vorhandensein weiterer Rezeptoren postuliert werden.

Zusätzlich ist das Vorhandensein eines einzigen Rezeptors ein für Neuropeptide, die in der Regel an verschiedene Rezeptoren binden, höchst ungewöhnlicher Befund. Die Entdeckung verschiedener synthetischer TRH-Analoga mit präferentiellen ZNS-Effekt gegenüber schwachen thyrotropen Effekten legte schon früh das Vorhandensein von mehr als einem Rezeptor-Subtyp nahe (Metcalf and Dettmar 1981; Szirtes, Kisfaludy et al. 1984).

Versuche, über eine Expressionsklonierungs-Strategie neue Rezeptoren zu isolieren, scheiterten jedoch.

TRH-Rezeptor 2

Erst Ende 1998 gelang es zwei Gruppen unabhängig voneinander, einen zweiten TRH-Rezeptor zu klonieren (Cao, O'Donnell et al. 1998; Itadani, Nakamura et al. 1998). Beide Gruppen benutzten degenerierte Primer, abgeleitet von konservierten Transmembranregionen G-Protein gekoppelter Rezeptoren, um neue Rezeptoren zu klonieren und anschließend zu charakterisieren.

Der so genannte TRH-Rezeptor 2 (TRH-R2) ist auf Aminosäureebene zu 51 % dem TRH-R(1) identisch und weist eine vergleichbare Bindungsaffinität gegenüber TRH auf (Kd: 9 nM vs. 13 nM (TRH-R1)). Die Northern Blot und *in situ*-histochemische Analyse in der Ratte zeigte eine ZNS-spezifische Expression, die sich deutlich von der Lokalisation des TRH-R1 unterscheidet (Heuer, Schafer et al. 2000). Im Gegensatz zu TRH-R1 zeigt die TRH-R2 mRNA höchste Transkriptspiegel im gesamten Thalamus, im cerebralen und cerebellaren Cortex, in den medialen Habenulae, dem medialen Geniculat-Nucleus, dem Pontinen-Nucleus und in der ganzen retikularen Formation. In Regionen, in denen beide Rezeptoren exprimiert werden, zeigt sich in den einzelnen Schichten eine völlige Komplementarität (Heuer, Schafer et al. 2000). In der Adenohypophyse ist keine Expression des TRH-R2 detektierbar.

Zusammenfassend kann daraus geschlossen werden, dass in diskreten neuroanatomischen Bereichen die beiden Rezeptoren jeweils spezifische Funktionen bei der Transmission des

TRH-Signale vermitteln. Zugleich muss angenommen werden, dass die neuroendokrinen TRHergen Funktionen vorzugsweise, wenn nicht vollständig durch TRH-R1 vermittelt werden.

Überraschend ist hierbei, dass es bisher nicht gelungen ist, den homologen Rezeptor des Menschen zu klonieren. Weder Sequenzanalysen noch Screening mit Maus- oder Rattensonden konnten dies ermöglichen (S. Turwitt und K. Paliga, unveröffentlichte Ergebnisse). Ob der homologe humane TRH-R2 nicht existiert, oder aufgrund größerer Sequenzunterschiede schwer zu identifizieren ist, kann noch nicht abschließend beantwortet werden.

1.4 Zielsetzung

Thyrotropin-releasing hormone (TRH) ist eine multifaktorielle Signalsubstanz. Als hypothalamisch-hypophysäres Neuropeptidhormon stimuliert es die Sekretion des Hypophysenhormons TSH (*thyroid-stimulating hormone*) und damit die Funktion der Schilddrüse. Darüber hinaus agiert TRH im peripheren Nervensystem und Intestinum als regulatorisches Peptid und wirkt in extrahypothalamischen Arealen des zentralen Nervensystems als Neurotransmitter/Neuromodulator. Vermittelt wird diese Wirkung durch G-Protein-gekoppelte Rezeptoren

Ziel dieser Doktorarbeit war es, eine Maus zu generieren mit einer gezielten Inaktivierung (Knockout) des TRH-Rezeptor 1. Damit sollte ein Modellsystem für Schilddrüsen-Dysfunktionsstudien (tertiärer Hypothyreodismus) geschaffen werden. Zusätzlich würde es diese Mausmutante erlauben, weitere endokrine Wirkungen, die für TRH postuliert werden (z. B. die Induktion der Prolactin- und Wachstumshormon-Sekretion), zu überprüfen.

Darüberhinaus soll durch homologe Rekombination das Gen der bakteriellen β -Galactosidase anstelle der TRH-R1-Sequenzen in das Genom integriert werden. Ziel ist die Expression der Galactosidase unter der Kontrolle des endogenen Promotors des TRH-Rezeptor-1-Gens. Dieses soll eine hochauflösende Lokalisation TRH-R1-exprimierender Zellen ermöglichen.

Um einen Überblick über die Ontogenie des TRH-Signalsystems zu gewinnen und damit Hinweise auf mögliche TRH-R1-vermittelte TRH-Effekte während der Entwicklung zu erhalten, sollte ergänzend hierzu eine *in-situ*-Analyse verschiedener Embryonal- und früher Postnatalstadien durchgeführt werden.

Zu Beginn der vorliegenden Doktorarbeit war TRH-R1 der einzige bekannte Rezeptor, der TRH-Effekte vermittelt – ein für Neuropeptide, die in der Regel an verschiedene Rezeptoren binden, höchst ungewöhnlicher Befund. Lokalisationsexperimente und pharmakologische Untersuchungen legten schon früh das Vorhandensein von mehr als einer Rezeptorisoform nahe.

Ziel dieser Arbeit war es, durch Bindungsstudien und physiologische Untersuchungen in TRH-R1-defizienten Mäusen zu analysieren, welche TRH-Effekte über diesen Rezeptor vermittelt werden. So könnte das Postulat weiterer Rezeptoren überprüft werden. Sollten Hinweise auf weitere Rezeptoren gefunden werden, wäre die TRH-R1-Knockout-Maus zudem ein ideales Modell für deren Charakterisierung und gegebenenfalls Klonierung.

2 Material und Methoden

2.1 Knockout Technologie

2.1.1 Einleitung

Die Erzeugung experimentell induzierter Mutationen hat sich als eine erfolgreiche Methode erwiesen, um die Entwicklung multizellulärer Organismen, wie *Drosophila melanogaster* und *Caenorhabditis elegans*, auf molekularer Ebene zu studieren. Zur Untersuchung der Entwicklung und Homöostase höherer Wirbeltiere ist die Maus das derzeit am besten geeignete Modelltier. Ähnlich wie bei *Drosophila* und *C. elegans* können mutierte Mauslinien erzeugt und analysiert werden. Die Mutationen können hierbei durch chemische Substanzen, wie z. B. Äthylnitrosoharnstoff oder radioaktive Bestrahlung erzeugt werden, so dass Mäuse mit dominanten oder rezessiven mutanten Merkmalen entstehen. Der Nachteil dieses klassischen genetischen Ansatzes besteht darin, dass die erzeugten Mutationen nur zufällig eingeführt werden und dass „Screening“ und nachfolgende Kartierung, Isolierung und Sequenzierung der mutierten Gene erheblichen Zeit- und Arbeitsaufwand erfordern.

Die Entwicklung der Maus ES (embryonale Stammzellen)-Zelltechnologie hat es ermöglicht, gezielte Mutationen zur Analyse der Genfunktion in Säugetieren zu erzeugen. Seit den ersten Anwendungen (Mansour, Thomas et al. 1988; Joyner, Skarnes et al. 1989) bis heute ist das „gene targeting“ durch homologe Rekombination in ES-Zellen (Capecchi 1989) zur Methode der Wahl gereift, um die Funktion bereits identifizierter Gene zu untersuchen. Mit ihrer Hilfe ist es prinzipiell möglich, jedes klonierte Gen in ES-Zellen auszuschalten und nach Einbringen in die Keimbahn die entsprechende Maus-Mutante, die so genannte „knock-out“ (KO) Maus, zu erzeugen, der das spezifische Genprodukt fehlt.

Grundlage der Herstellung des Targeting Vektors zur Generierung einer TRH-R1-KO-Mausmutante war die erfolgreiche Klonierung der TRH-R1 cDNA (Straub, Frech et al. 1990) und anschließende Aufklärung der genomischen Organisation des Rezeptors in der Maus (Duthie, Taylor et al. 1993).

2.1.2 Targeting Konstrukt

Ein minimaler Targetingvektor für die Inaktivierung oder Veränderung eines Gens besteht aus zwei DNA-Regionen (rekombinierende Arme), die homolog zum anvisierten Gen-Locus sind und die durch einen positiven Selektions-Marker unterbrochen werden. Je nachdem ob genetisches Material nur eingefügt („insertion vector“) oder ersetzt („replacement vector“) werden soll, wird der Marker entweder in die homologe Region inseriert oder er ersetzt genomische Sequenzen zwischen den homologen Armen. Wird dieser Vektor nun durch eine Elektroporation in embryonale Stamm- (ES-)Zellen transferiert, so findet mit einer gewissen Wahrscheinlichkeit zwischen den Sequenzen im Targeting-Vektor und denen im Ziel-Gen eine homologe Rekombination statt. Das Resultat ist die Anwesenheit des Markers im anvisierten Gen-Locus. Er erlaubt es, diese seltenen Rekombinationsereignisse zu selektionieren.

Um eine optimale Übereinstimmung der homologen genomischen Bereiche sicher zu stellen, wurden diese aus einer BAC- (*bacterial artificial chromosome*-)Bank isoliert, die aus genomischer DNA von 129Sv-Mäusen erstellt worden ist (Genome Systems, Inc.). Für die Suche nach dem TRH-Rezeptor-1-Genlocus wurden cDNA-Sequenzen aus der Ratte verwendet.

Bei dem in dieser Arbeit benutzten Targeting Vektor handelte es sich um einen „replacement vektor“. Das heißt das Ziel der homologen Rekombination in ES-Zellen war der Austausch der kodierenden TRH-R1-Sequenz gegen Targeting Vektor Sequenzen, die u. a. die anschließende Antibiotika-Selektion ermöglichten.

Das verwendete Ausgangsplasmid war der so genannte pGNA-Vektor (Le Mouellic, Lallemand et al. 1990; Le Mouellic, Lallemand et al. 1992). Die Vermehrung in Bakterien und anschließende Geneticin- (G418-)Selektion erfolgreich inserierter ES-Klone wurde hierbei durch eine Neomycin-Resistenzkassette (Neo^R) ermöglicht, die unter der Kontrolle des RSV-LTR und des Tn5 Promotors exprimiert wurde (Wurst and Joyner 1993).

Gleichzeitig beinhaltete das Konstrukt das Gen für die bakterielle β -Galactosidase (lacZ). Im Falle eines homologen Rekombinationsereignisses wurde hierbei eine Fusion des Rezeptor-Transkripts mit der promotorlosen β -Galactosidase erzeugt. Das bedeutet, dass die β -Galactosidase unter der Kontrolle des TRH-R1-Promotors exprimiert wurde. Dadurch war es möglich, die Expression von TRH-R1 während der Entwicklung und im adulten Tier über eine lacZ-Färbung zu detektieren.

Zusätzlich wurde der Targetingvektor außerhalb der rekombinierenden Arme mit dem Thymidin-Kinase Gen des Herpes simplex Virus (tk) versehen. Bei der (weitaus häufigeren) zufälligen Integration der Targeting-Vektor Sequenzen wird die Kasette meist mit in das Genom integriert. Das bedeutet, dass eine nachfolgende (negative) Selektion gegen diese Kasette die meisten Zellen tötete, die den Vektor an zufälligen Orten integriert hatten (Papaioannou and Johnson 1993). Bei einer homologen Rekombination hingegen wird die Thymidin-Kinase nicht in das Genom integriert, so dass eine Gancyclovir-Behandlung keine Auswirkung auf die ES-Zellen hatte. Eine schematische Übersicht des Targeting-Vektors und des genomischen Bereichs vor und nach der homologen Rekombination ist in Abbildung 1 im Ergebnisteil dargestellt.

2.1.3 Verwendete ES-Zellen

Für die gezielte Mutagenese des TRH-R1-Gens wurden zwei ES-Zelllinien verwendet. Mit beiden Linien konnten Chimäre generiert werden, die eine Keimbahn-Transmission aufwiesen. Für die nachfolgend beschriebenen Ergebnisse wurden nur Mäuse herangezogen, die durch homologe Rekombination in R1-Zellen erzeugt wurden.

Die R1 ES-Zelllinie

R1 ES-Zellen sind abgeleitet von der F1-Kreuzung zwischen 129/Sv und 129/J Inzucht-Stämmen. Sie wurden generiert und zur Verfügung gestellt von Dr. A. Nagy, Toronto, Mount Sinai Hospital (Nagy, Rossant et al. 1993). 129/Sv ist eine Agouti-farbene Maus, das bedeutet diese Zellen führen zu einem Agouti-farbenen Fell und zu dunklen Augen.

Die E14-1 ES-Zelllinie

E14-Zellen stammen vom 129/Ola Inzucht-Stamm. Sie wurden generiert von Dr. A. Berns, Amsterdam und später subkloniert und als E14-1 bezeichnet von Dr. K. Rajewski, Universität Köln. 129/Ola ist eine Agouti-farbene Maus mit hellroten bzw. rosa Augen. Diese ES-Zellen ergeben ein Agouti-farbenes Fell, wenn sie das Haar oder das Haarfollikel bilden und ein Creme-farbenes, wenn sie beides bilden. Die Augen erscheinen rosa (hell, aber nicht unpigmentiert).

2.1.4 Verwendete Tierstämme

Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurden für die Generierung der Chimären und/oder die Propagierung des Knockout-Allels drei Mausstämme verwendet. Eine genaue Auflistung anatomischer, physiologisch/biochemischer und Verhaltens-Charakteristika befindet sich auf der entsprechenden Referenz-Seite des Jackson Laboratoriums:

<http://www.informatics.jax.org/external/festing/mouse/REFS.shtml>

129/Sv

129/Sv-Mäuse wurden für die Propagierung des Knockout-Allels verwendet. Der genomische Hintergrund ist isogen zu dem der verwendeten (R1) ES-Zellen. Der 129er Inzucht-Stamm wurde 1928 durch Kreuzung der englischen Fancier-Maus mit einem Chinchilla-Bestand aus Castle erzeugt. Fast alle Substämme tragen das White-bellied Agouti Gen AW. 129/Sv hat ein Agouti-farbenes Fell mit hellem Bauchfell und pigmentierten Augen. 129/Sv Mäuse haben unterdurchschnittliche Verpaarungseigenschaften mit kleinen Wurfgrößen. Die meisten zurzeit gebräuchlichen ES-Zelllinien wurden vom Stamm 129Sv abgeleitet.

NMRI

NMRI-Mäuse wurden als Morula-Spender für die Aggregation, als Leihmütter (so genannte Foster-Mäuse) für das Austragen der Embryonen und für die Propagierung des Knockout-Allels verwendet. Erzeugt wurde dieser Auszucht-Stamm 1937 von Lynch und Poiley auf der Basis von Schweizer Auszucht-Mäusen. NMRI-Mäuse haben einen Albino-Phänotyp mit unpigmentiertem Fell und ebenfalls nichtpigmentierten Augen. Sie haben überdurchschnittliche Verpaarungs- und Aufzuchtseigenschaften, bei überdurchschnittlichen Wurfgrößen.

C57Bl/6

C57Bl/6-Mäuse wurden als Morula-Spender für die Aggregation und für die Propagierung des Knockout-Allels verwendet. Ursprung der C57Bl-Stämme ist die Verpaarung von Weibchen Nummer 57 mit Männchen 52 (jeweils *Mus musculus domesticus*) aus dem Bestand von Abbie Lathrop durch Little 1921. C57Bl/6 wurde vor 1937 von C57Bl/10 getrennt und ist der am häufigsten Verwendete aller Inzucht-Stämme. Tiere dieses Stammes haben eine schwarze Fellfarbe und dunkelbraun pigmentierte Augen. Sie zeigen durchschnittliche bis gute Verpaarungseigenschaften, bei mittlerer Wurfgröße.

2.1.5 ES-Zellkultur

Eine detaillierte Beschreibung der Bedingungen und Techniken der ES-Zell-Kultur wurde von Dr. A. Mansouri veröffentlicht (Mansouri 1998).

Um embryonale Stammzellen in einem undifferenzierten Zustand zu erhalten, war es notwendig, diese auf einem Zell-Rasen von embryonalen Fibroblasten (MEF: mouse embryonic fibroblasts) zu kultivieren. Für die Selektion nach der homologen Rekombination, war eine Neomycin-Resistenz dieser MEF-Versorger-Zellen (Feederzellen) unabdingbar. Zusätzlich wurde dem Medium LIF (leukaemia inhibitory factor) zugesetzt, von dem gezeigt werden konnte, dass es die ES-Zell-Differenzierung unterdrückt (Smith and Hooper 1987).

Für die Erzeugung geeigneter MEF-Zellen wurden C57Bl/6-Mäuse verpaart, die die Neomycin-Resistenzkassette transgen exprimierten. An Embryonaltag 11,5 (bis maximal 14,5) wurden die Embryonen entnommen und nach Entfernen des Gehirns vollständig in Einzelzellen dissoziiert. Vor der Verwendung als Feeder-Zellen wurden die Fibroblasten mit Mitomycin C inaktiviert. Anschließend konnten sie bis zu einer Woche verwendet werden.

Die Propagierung der ES-Zellen erfolgte auf inaktivierten MEF-Zellen und unter Zusatz von LIF (GibcoBRL, Cat. No. 13275-029). Um eine Differenzierung zu vermeiden wurden ES-Kulturen, je nach Dichte, spätestens jedoch alle zwei Tage passagiert. Hierbei war es wichtig die Trypsin-Behandlung so lange durchzuführen, bis eine Einzelzell-Suspension vorlag. Das Aussähen der Zellen erfolgte in verschiedenen Dichten. So wurde vermieden, dass Zellen weiter propagiert oder für die Aggregation verwendet wurden, die auf den Platten in einer zu hohen Dichte (Gefahr der Differenzierung) oder zu niedrigen Dichte (Verminderung der Teilungsgeschwindigkeit) vorlagen.

2.1.6 Elektroporation der ES-Zellen

Für die Elektroporation wurden die ES-Zellen vollständig trypsiniert, kurz mit PBS gewaschen und in PBS in einer Konzentration von 10^7 Zellen/ml resuspendiert. Die Elektroporation erfolgte im *Gene Pulser II* Elektroporationssystem (Bio-Rad) in 4 mm Küvetten bei 250 Volt und 500 μ F. Vor der Elektroporation wurde der Zellsuspension 25 μ g linearisierter Targeting-Vektor-DNA zugesetzt. Als Negativ-Kontrolle wurden 10^6 Zellen der gleichen Prozedur unterzogen, jedoch ohne vorherige Zugabe des Targetingvektors. Nach fünf- bis zehnminütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Zellen vorsichtig in ES-Zell-Medium resuspendiert und auf MEF-beschichtete Kulturschalen überführt.

2.1.7 Selektion der ES-Zellen

24 Stunden nach der Elektroporation erfolgte der Mediumwechsel mit Selektionsmedium, inklusive G418 (Neomycin-Selektion) und Gancyclovir (TK-Selektion). Am fünften Tag der Selektion (täglicher Mediumwechsel) wurde nur noch G418 zugefügt. Die Gancyclovir-Selektion ist nur während der ersten vier Tage erforderlich.

2.1.8 Isolierung der Klone

Acht Tage nach Beginn der Selektion sollten auf der Kontroll-Platte keine lebenden ES-Zellen mehr vorhanden sein. Auf den Transfektionsplatten ließen sich ES-Zellkolonien von jeweils bis zu 1.000 Zellen erkennen und leicht unter dem Stereomikroskop mit einer ausgezogenen Glaskapillare oder einer Pipettenspitze aufnehmen. Die ES-Zellklumpen wurden anschließend trypsiniert und auf MEF-beschichtete 96-Well-Platten überführt. Nach zwei- bis dreitägiger Kultur, weiterhin unter Selektionsmedium, wurden die Kolonien trypsiniert und auf zwei 96-Well-Platten verteilt, die eine MEF-beschichtet und die andere mit Gelatine vorbehandelt. Nach weiteren zwei bis drei Tagen wurden die Klone auf der MEF-beschichteten Platte nach entsprechender Vorbehandlung eingefroren. Die zweite Platte ließ man mehrere Tage auswachsen.

2.1.9 Analyse der isolierten Klone

Für die Analyse der isolierten Klone wurde jeweils die genomische DNA präpariert. Anschließend wurden die Klone mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) oder durch „southern blotting“ und anschließende Hybridisierung analysiert. Zur Differenzierung zwischen homologen Integrationen und Zufalls-Integrationen musste die Sonde für die Southern-Hybridisierung (bzw. ein Primer der PCR-Reaktion) dabei außerhalb der rekombinierenden Arme liegen.

Die auf den Platten eingefrorenen ES-Klone konnten bis zu einem Jahr unter flüssigem Stickstoff gelagert werden.

2.1.10 Generierung von Keimbahn-Chimären

Prinzipiell gibt es zwei Möglichkeiten der Einführung von ES-Zellen in Embryos. Bei der **Blastozysten-Injektion** werden einzelne ES-Zellen mit Hilfe einer Mikroinjektionsapparatur in den Blastocoel-Hohlraum von Prä-Implantations-Blastozysten injiziert. Meist kollabieren die Blastocysten nach der Injektion, regenerieren sich jedoch wieder bei 37 °C in Kultur. Reexpandierte Blastocysten werden anschließend in den Uterus scheinträchtiger (Foster-) Mäuse transferiert.

Bei der **Morula-Aggregation** werden Klumpen von 5 bis 15 ES-Zellen mit Embryos in der frühen Morula-Phase aggregiert (Bradley 1987).

Frühe Experimente zeigten, dass mit beiden Verfahren chimäre Mäuse produziert werden können, dass jedoch die Ausbeute an Keimbahntransmittern bei der Morula-Aggregation erheblich geringer ist. Die Generierung geeigneter ES-Zelllinien zusammen mit Modifikationen der verwendeten Kulturmedien (Nagy, Sass et al. 1989; Nagy, Rossant et al. 1993) hat das Aggregationsverfahren jedoch zu einer effizienten und vielseitigen Methode zur Generierung von Keimbahnchimären gemacht.

Diese Methode hatte gegenüber der Blastozysten-Injektion verschiedene Vorteile. Zum einen wurde keine Mikromanipulations-Apparatur benötigt. Zum anderen ließ sich eine größere Anzahl Embryonen pro Experiment manipulieren. Zu berücksichtigen war, dass nicht alle ES-Zelllinien für die Aggregation geeignet sind. Die nachfolgend beschriebene Prozedur wurde von Dr. A. Mansouri (Abt. Dr. P. Gruss, MPI für biophysikalische Chemie, Göttingen) adaptiert und modifiziert.

2.1.11 Gewinnung von Embryonen

Superovulation

Um eine möglichst große Ausbeute an entwickelten Eizellen zu erhalten, wurde durch Hormongaben der Sexualzyklus der Spendertiere synchronisiert und die Ovulation induziert. Hierzu konnten Tiere im Alter von fünf bis acht Wochen verwendet werden. Die Ovulation erfolgte bei Spenderweibchen nach je einmaliger intraperitonealer Injektion von 7,5 IU PMSG (Pregnant Mare's Serum Gonadotropin) und 5 IU hCG (human chorionic Gonadotropin) und anschließender Verpaarung.

PMSG wurde 46 bis 48 Stunden vor der hCG-Gabe jeder Spendermaus injiziert. Dies erfolgte in Abhängigkeit vom Hell/Dunkel-Rhythmus des Tierstalls meist am späten Vormittag. Die Verpaarung erfolgte am Tag der Hormongabe ca. drei Stunden vor Beginn der Nachtphase.

Anhand der Vaginalpfropfe war am nächsten Tag erkennbar, ob eine Befruchtung stattgefunden hatte. Je nach Alter konnten unbefruchtete Mäuse nach etwa zwei Wochen erneut superovuliert werden.

2.1.12 Isolierung der Embryonen

Zur Gewinnung von frühen Morulastadien (8 bis 16-Zellstadium) wurde am Tag 2,5 nach der Kopulation der Eileiter mit einem kurzen Uterusstück präpariert und in ein Schälchen mit M2-Medium (Sigma, M7167, Lot 38 H 8419) überführt. Anschließend wurden die Eileiter mit einer Dumont-Pinzette fixiert und mit einer feinen Kanüle (Hamilton, Gauge 33, N733 N° 90333) durchspült. Embryonen mit mehr als vier Zellen von gleichmäßiger Form und Farbe wurden verwendet, der Rest verworfen. Mit Hilfe ausgezogener und abgeschmolzener Glaskapillaren wurden die Embryonen gesammelt und bis zu ihrer Verwendung in Tropfen von M16-Medium (Sigma, M-7292) mit 4 mg/ml BSA (Sigma, *cell culture tested*, A-4919) überführt. Diese wurden mit Mineral-Öl (Sigma, *embryo tested*, M-8410) überschichtet und bei 37 °C, 5 % CO₂ und 100 % Luftfeuchtigkeit inkubiert.

2.1.13 Entfernung der Zona Pellucida

Vor der Herstellung von Aggregationschimären mußte die Zona Pellucida entfernt werden. Hierzu wurden die Embryonen kurz in *Tyrode's Acid Solution* (Sigma, T1788) überführt und anschließend mehrfach mit M2-Medium gewaschen. Zusätzlich zur Entfernung der Zona bewirkte diese Säurebehandlung, dass die Embryonen klebrig wurden.

2.1.14 Morula Aggregation

Die von der Zona befreiten Embryonen wurden auf die Aggregations-Petrischale (Becton Dickinson, Falcon 1008) überführt.

Vorher wurden neun bis 16 Tropfen M16/BSA-Medium (jeweils ca. 100 µl) auf die Petri-Schale pipettiert. In diese Tropfen wurden mit einem Instituts-gefertigten Stempel fünf bis acht Vertiefungen pro Tropfen eingebohrt. Diese Vertiefungen hatten die Funktion, ein Verrutschen der Embryonen auf der Petrischale zu verhindern und eine enge räumliche Nähe zwischen dem Embryo und dem ES-Zell-Klumpen sicherzustellen. Die Grundfläche dieser Vertiefungen sollte dementsprechend den zweifachen Durchmesser einer Morula nicht

überschreiten. Anschließend wurden die Tropfen mit Öl (Sigma, MINERAL OIL, embryo tested, M-8410) überschichtet und bei 37 °C und 5 % CO₂-Gehalt inkubiert.

Die überführten Embryonen wurden vorsichtig mit ausgezogenen und abgeschmolzenen Glaskapillaren in die Vertiefungen überführt. Anschließend wurden Klumpen von ES-Zellen zu den Embryonen pipettiert. Aufgrund der Tierstamm-abhängigen Teilungsgeschwindigkeit der Zellen des Spender-Embryos wurden unterschiedliche ES-Klumpen verwendet. War eine NMRI-Maus der Embryonenspender, bestanden die Klumpen aus durchschnittlich 12 bis 15 ES-Zellen. Mit C57Bl/6-Embryonen wurden Klumpen aus maximal vier bis sechs Zellen aggregiert. Dieses geschah, indem der ES-Zell-Klumpen vorsichtig mit einer Kapillare an den enthüllten Embryo gespült wurde, so dass jeweils mehr als drei Zellen miteinander in direktem Kontakt standen. Anschließend wurden die Aggregations-Petrischalen wieder in den Brutschrank überführt und bei 37 °C, 5 % CO₂ und 100 % Luftfeuchtigkeit über Nacht inkubiert.

Die meisten Embryonen erreichten bis zum Mittag des nächsten Tages das Blastozystenstadium, so dass sie in den Uterus einer scheinträchtigen Maus vom Tag 2,5 p. c. (nach der Kopulation) transferiert werden konnten.

2.1.15 Erzeugung scheinträchtiger Mäuse

Um einen Embryotransfer durchführen zu können, wurden scheinträchtige Leihmütter (Foster-Weibchen) benötigt. Um diese zu erzeugen, wurden sexuell intakte Weibchen mit vasktomierten Männchen verpaart. Wichtig war hierbei das richtige Timing: Ein Transfer von Blastozysten in den Uterus konnte aufgrund der induzierten hormonellen Änderungen erfolgreich nur an Tag 2,5 p. c. (nach der Kopulation) durchgeführt werden. War es frühzeitig klar, dass am Tag nach der Aggregation nicht genügend Foster-Weibchen zur Verfügung stehen würden, konnte bei einem Teil der Embryonen durch Zusatz von 1 bis 4 % ES-Medium (ohne LIF) zum Inkubationsmedium die Entwicklung so verzögert werden, dass diese erst einen Tag später das Blastozystenstadium erreichten.

2.1.16 Uterus-Transfer

Für den Uterus-Transfer wurden Foster-Mäuse an Tag 2,5 p. c. narkotisiert und der Uterus durch vorsichtiges Herausziehen am Fettgewebe, das das Ovar umgibt, dargestellt. In das obere Stück des Uterus wurde nun mit einer feinen Nadel (27G) ein Loch gestochen. Durch

dieses Loch wurde die Transferkapillare eingeführt. Anschließend wurden bis zu acht Blastozysten in M16-Medium pro Schenkel in den Uterus eingespült. Nach vorsichtiger Repositionierung des Uterus/Ovars wurde das Bauchfell vernäht und das Fell geklammert.

2.1.17 Analyse der chimären Mäuse

Eine chimäre Maus entsteht durch Eintritt und Beteiligung von ES-Zellen an der Entwicklung des Spender-Embryos. Besiedeln die ES-Zellen hierbei auch die Keimbahn der generierten Maus, so spricht man von Keimbahn-Chimären oder „Germline-Transmittern“. Für die Erkennung des Chimärismus-Grades werden gewöhnlich Fellfarben-Marker verwendet, d. h. der Spender-Embryo hat hinsichtlich der Fellfarbe einen anderen Genotyp als die ES-Zellen.

Für Aggregations-Chimären von R1-ES-Zellen und NMRI-Spender-Embryos bedeutete dies, dass der unpigmentierte Albino-Phänotyp Wildtyp-Beteiligung dokumentierte. Ein Agouti-farbener Anteil zeigte hingegen die Beteiligung der ES-Zellen an der Chimären. Mit anderen Worten: Je brauner die entstandene Maus war, desto mehr ES-Zellen waren an der Entwicklung beteiligt und desto größer war die Wahrscheinlichkeit, dass sich auch die Keimbahnzellen von den ES-Zellen ableiteten.

R1-Aggregationschimäre mit C57Bl/6 Spender-Embryos zeigten braun- bzw. cremefarbene (mutante) Anteile auf einem schwarzen (Wildtyp-)Hintergrund. Zuerst wurde dies beim Bauchfell sichtbar. Agouti-farbene Bereiche bildeten sich, wenn sich entweder das Haar oder das Follikel von ES-Zellen ableiteten. cremefarbene Bereiche entstanden, wenn sowohl Haar als auch Follikel einen ES-Zell Ursprung hatten.

2.1.18 Analyse der Keimbahn-Transmission

Für die Analyse der Keimbahn-Transmission wurden R1/NMRI-Aggregationschimäre mit NMRI-Mäusen verpaart. Wildtyp-Nachkommen waren bei dieser Verpaarung albino, das heißt unpigmentiert. Transmittierte Nachkommen hingegen entwickelten ein stahlgraues Fell und waren bereits kurz nach der Geburt an ihren pigmentierten Augen zu erkennen.

R1/C57Bl/6-Aggregationschimäre wurden mit C57Bl/6-Mäusen verpaart. Wildtyp-Nachkommen waren hierbei schwarz, transmittierte Nachkommen entwickelten ein Agouti-farbenes Fell. Eine Transmission konnte nach etwa zehn Tagen detektiert werden, wenn das Haar sichtbar war.

An diese leicht zu erkennende Analyse der Beteiligung der ES-Zellen an der Keimbahn schloss sich die Überprüfung an, ob es sich bei den entsprechenden ES-Zellen um solche handelte, die das Knockout-Allel trugen. Dies erfolgte wie bei der Analyse der ES-Zellklone durch PCR und/oder Southern-Analytik.

2.2 DNA und RNA Methoden

2.2.1 Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien

Die Isolierung kleiner Mengen von Plasmid-DNA aus Bakterien-Suspensionen (2 bis 4 ml Kulturvolumen) erfolgte nach dem hier dargestellten Mini-Präparations-Schema. Für größere Menge wurde das Qiagen Plasmid Midi bzw. Maxi Kit (Qiagen, Kat. Nr. 12145 bzw. 12163) entsprechend den Herstellerangaben verwendet.

Verwendete Lösungen:

Lösung 1	50 mM Glucose 10 mM EDTA 25 mM Tris/HCl, pH 8,0
Lösung 2	0,2 N NaOH 1 % SDS

Arbeitsschema:

2 ml LB-Medium + Antibiotikum-Kultur in Kapsenberg-Röhrchen
37 °C – Ü/N – schütteln

In 2,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführen
5 min – 5.000 rpm – RT

Pellet in 200 µl Lösung 1 resuspendieren
vortexen
5 bis max. 10 min bei RT schütteln

Zugabe von 400 µl frisch angesetzter Lösung 2
2 bis 3 mal invertieren
5 min auf Eis

Zugabe von 300 µl 7,5 M NH₄OAc
2 bis 3 mal invertieren
kurz auf Eis
10 min – 14.000 rpm – RT

Überstand in 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß abgießen

Zugabe von 600 µl Isopropanol
4 bis 5 mal invertieren
10 min – 14.000 rpm – RT
Überstand abgießen, gut abtropfen lassen

Mit 500 µl 70 % EtOH waschen
5 min – 14.000 rpm – RT
Überstand abgießen, gut abtropfen lassen

Sediment 5 min im Lyophilisator trocknen

In 50 µl 10 mM Tris/HCl, pH 8 aufnehmen
10 min bei RT schütteln

Für einen Restriktionsverdau wurden 3 bis 5 µl (ca. 300 ng), für Sequenzierungen maximal 1 µl der präparierten DNA-Lösung eingesetzt.

2.2.2 Isolierung genomischer DNA aus embryonalen Stammzellen

Verwendete Lösung:

DNA-Extraktionspuffer 1	0,5 % Sarcosyl
	10 mM NaCl
	10 mM EDTA, pH 8,0
	10 mM Tris/HCl, pH 7,5

Arbeitsschema:

Zellen 2 mal mit PBS waschen

Zugabe von 50 µl DNA-Extraktionspuffer 1 inkl. 0,5 mg/ml Proteinase K pro Kammer einer 96-Wellplatte
Ü/N bei 37 °C im Brutschrank inkubieren
in 1,5 ml Eppendorf-Tube transferieren

Zugabe von 100 µl vorgekühlter (-20 °C) Fällungslösung (1,5 ml 5M NaCl in 100 ml EtOH)
kurz vortexen
10 min – 8.000 rpm – RT
Überstand abgießen, gut abtropfen lassen

Mit 500 µl 70 % EtOH waschen
5 min – 8.000 rpm – RT
Überstand abgießen, gut abtropfen lassen
5 min im Lyophilisator (RT) trocknen

Zugabe von 50 µl Tris/HCl, pH 8,0
 20 min bei RT stehen lassen
 vortexen
 Ü/N bei 55 °C inkubieren

Für den Restriktionsverdau wurden 25 µl (ca. 10 bis 15 µg DNA) der präparierten DNA-Lösung verwendet. 100 U Restriktionsenzym wurden pro Verdau eingesetzt. Das Gesamtvolumen sollte dabei 50 µl nicht unterschreiten.

2.2.3 Isolierung genomischer DNA aus Schwanz-Biopsien

Verwendete Lösung:

DNA-Extraktionspuffer 2	1 % SDS
	100 mM NaCl
	50 mM EDTA, pH 8,0
	20 mM Tris/HCl, pH 7,5

Arbeitsschema:

Ca. 0,5 cm Schwanz in 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß vorlegen

Zugabe von 750 µl DNA-Extraktionspuffer 2 inkl. 1 mg/ml Proteinase K
 Ü/N bei 55 °C inkubieren
 5 min bei RT schütteln

Zugabe von 250 µl gesättigter NaCl-Lösung
 5 min bei RT schütteln
 10 min – 14.000 rpm - RT

Überstand in 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß abgießen

Zugabe von 600 µl Isopropanol
 mehrmals invertieren
 10 min – 7.000 rpm – RT
 Überstand abgießen, gut abtropfen lassen

Mit 500 µl 70 % EtOH waschen
 5 min – 8.000 rpm – RT
 Überstand abgießen, gut abtropfen lassen
 5 min im Lyophilisator (RT) trocknen

Zugabe von 100 µl Tris/HCl, pH 8,0
 20 min bei RT stehen lassen
 vortexen
 Ü/N bei 55 °C inkubieren

Für den Restriktionsverdau wurden 15 µl (ca. 15 µg DNA) der präparierten DNA-Lösung verwendet. 100 U Restriktionsenzym wurden pro Verdau einsetzen. Das Gesamtvolumen sollte dabei 40 µl nicht unterschreiten.

2.2.4 Isolierung von Poly(A)⁺-angereicherter-RNA

Verwendete Lösungen:

Lysis-Puffer	0,1 M Tris/HCl, pH 7,5 0,5 M LiCl 10 mM EDTA 2 mM DTT 1 % SDS
Waschpuffer 1	20 mM Tris, pH 7,5 0,25 M LiCl 2 mM EDTA 1 % SDS
Waschpuffer 2	20 mM Tris, pH 7,5 0,25 M LiCl 2 mM EDTA
Waschpuffer 3	10 mM Tris, pH 7,5 150 mM LiCl 1 mM EDTA

Zur Gewinnung von Poly(A)⁺-angereicherter-RNA wurden 50 bis 100 mg Gewebe in einem Dismembrator zerkleinert oder mit einem Teflon-Glashomogenisator aufgeschlossen und anschließend in 4 ml Lysis-Puffer aufgenommen. Freigesetzte chromosomale DNA wurde durch mehrmaliges Aufziehen mit einer Kanüle (Durchmesser: 0,9 mm) geschert, die erhaltene Lösung wurde mit 5 mg Dynabeads[®] (Oligo-dT-Affinitätsmatrix, Deutsche Dynal) versetzt, auf vier Reaktionsgefäße (2 ml) verteilt und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Dynabeads[®] wurden zweimal mit Waschpuffer 1 und je einmal mit Waschpuffer 2 und 3 gewaschen. Anschließend wurde die mRNA mit 1 mM EDTA, pH 8.0 bei 65°C für 3 min in einem Gesamtvolumen von 200 µl eluiert. Nach phenolischer Extraktion wurde die mRNA als Natriumsalz ethanolisch ausgefällt und bei -80 °C aufbewahrt.

Die Dynabeads[®] wurden anschließend in 70 % Isopropanol gewaschen und durch zweiminütige Inkubation in 0,1 M NaOH bei 65 °C regeneriert. Abschließend erfolgte ein zweimaliges Waschen in Waschpuffer 1.

2.2.5 Southern-Blot-Analyse

Gelaufftrennung und Blotting

Verwendete Lösungen:

1x TBE	90 mM Tris/Borsäure, pH 8,0 2 mM EDTA, pH 8,0
Denaturierungslösung	1,5 M NaCl 0,5 M NaOH
Renaturierungslösung	1,5 M NaCl 0,5 M Tris/HCl, pH 7,0

Die Auftrennung der Restriktionsfragmente erfolgte in einem 0,6 %igen Agarose-Gel, in einer 25 cm Gel-Apparatur und bei 70 V in 1x TBE. Anschließend wurden die Gele für 35 min in Denaturierungslösung auf dem Schüttler inkubiert. Dann wurden sie kurz in Leitungswasser gespült und für zweimal 20 min in Renaturierungslösung geschwenkt. Die Volumina bei der De- und Renaturierung sollten hierbei mindestens das dreifache Gelvolumen betragen.

Für den Transfer der DNA wurden die Gele mit der Oberseite auf eine Plastikfolie gelegt. Anschließend wurde eine trockene Hybond N-Blotmembran (Amersham Pharmacia, Kat. Nr. RPN 203 N) auf das Gel gelegt, so dass sie von der anhaftenden Renaturierungslösung benetzt wurde. Auf die Membran wurden zwei angefeuchtete Lagen Whatman-Papier und ein Stapel (trockener) Papiertücher oder Zellstoff-Bögen gelegt.

Der Transfer der DNA-Fragmente erfolgte über Kapillarkräfte durch die im Gel vorhandene Flüssigkeit. Nach sechs bis spätestens 16 Stunden wurde die Membran vom Gel genommen und die DNA mit 3.000 Joule im UV-Crosslinker an die Membran kovalent gebunden.

Hybridisierung

Verwendete Lösungen:

20x SSC	3 M NaCl 0,3 M Natriumcitrat, pH 7,2
Magermilchpulver-Mix	5 % Magermilchpulver in 5 % SDS
Strip-Mix	0,1 % SDS 2 µM EDTA, pH 8,0
Waschpuffer 1	2x SSC 0,1 % SDS

Waschpuffer 2	0,1x SSC 0,1 % SDS
Prähybridisierungslösung	3 ml 20x SSC 3 ml Magermilchpulver-Mix 500 µl ssDNA (10 mg/ml) ddH ₂ O ad 15 ml
Hybridisierungslösung	2 ml 20x SSC 2 ml Magermilchpulver-Mix 4 ml 50 % (w/v) Dextransulfat 500 µl ssDNA (10 mg/ml) ddH ₂ O ad 10 ml

Nach 15 minütiger Inkubation der Prähybridisierungslösung im kochenden Wasserbad wurde diese auf die Blots gegeben. Die Prähybridisierung erfolgte bei 65 °C für mindestens 3 Stunden in rotierenden Glasflaschen (Hybridisierungsöfen GFL 7601, Burgwedel).

Die Markierung von cDNA-Fragmenten mit α -³²P-dCTP erfolgte unter Verwendung des *laddermanTM labeling kits* (TaKaRa) nach den Angaben des Herstellers. Nach Zugabe der Sonde zur Hybridisierungslösung wurde diese für 15 min im kochenden Wasserbad inkubiert und anschließend auf die Membran gegeben. Die Hybridisierung erfolgte ebenfalls bei 65 °C für mindestens 10 Stunden.

Zur Entfernung unspezifisch gebundener Nucleinsäuren wurden die Blots bei 58 °C für zweimal 5 min in Waschpuffer 1 und anschließend für zweimal 20 min in Waschpuffer 2 inkubiert. Die Visualisierung der Signale erfolgte nach dem Einschweißen der Blots in Plastikfolie durch Auflegen einer Phosphoimager-Platte (Fujix, Imaging Plate BAS-II S) und ein entsprechendes Phosphoimager-Detektionssystem (Fujix, Phosphoimager BAS 1000) bzw. durch Autoradiographie (Kodak, Biomax-MS).

Für weitere Hybridisierungen mit anderen Sonden wurden die Blots mit kochendem Strip-Mix übergossen und für 15 min bei 80 °C geschwenkt.

2.2.6 Northern-Blot-Analyse

Gelaufftrennung und Blotting

Verwendete Lösungen:

10x MOPS	0,2 M MOPS 50 mM Natriumacetat 10 mM EDTA, pH 7.0
Probenpuffer	1x MOPS 45 % Formamid 6,5 % Formaldehyd
Blue-Juice	50 % Glycerin 0,25 % Bromphenolblau
20x SSC	3 M NaCl 0,3 M Natriumcitrat, pH 7,2

Etwa 2 bis 15 µg ethanolisch ausgefällter mRNA wurden in denaturierendem Probenpuffer aufgenommen und für 5 min auf 65 °C erhitzt. Danach wurde die Probe auf Eis abgekühlt und nach Zugabe von Blue-Juice auf einem denaturierenden Agarosegel (1,25 % Agarose, 1x MOPS, 2,2 M Formaldehyd, pH 7,0) elektrophoretisch nach ihrer Größe aufgetrennt. Nach dem Kapillartransfer (über Nacht in 10x SSC) auf Nylon-Membranen (Nytran NY 12 N, Schleicher und Schuell) wurde die mRNA durch UV-Bestrahlung (Stratalinker, 1.200 µJ/cm², Stratagene) kovalent fixiert.

Hybridisierung

Verwendete Lösungen:

Prähybridisierungslösung	ULTRAhyb (Ambion)
Hybridisierungslösung	Prähybridisierungslösung nach Zusatz der Sonde
20x SSPE	1,5 M NaCl 100 mM NaH ₂ PO ₄ 10 mM EDTA, pH 7,4

Vor der ersten Hybridisierung wurde die Membran durch 15 minütige Inkubation bei 95 °C in der Striplösung (0,05x SSPE, 0,3 % SDS) gewaschen. Die zur Detektion verwendeten α-³²P-dCTP markierten cDNA Sonden wurden unter Verwendung des *laddermanTM labeling kits* (TaKaRa) nach den Angaben des Herstellers erzeugt. Die Abtrennung nicht eingebauter Nukleotide erfolgte über Microspin-Säulchen (G50, Pharmacia). Die gereinigte, markierte

cDNA wurde für 5 min bei 100°C inkubiert, dann kurz auf Eis abgekühlt und anschließend der Prähybridisierungslösung zugesetzt.

Die Hybridisierung erfolgte bei 42 °C über 16 Stunden. Die verwendete Membran wurde vorher für mindestens zwei Stunden bei 42 °C im Rotationsinkubationsofen (GFL 7601, GFL, Burgwedel) prähybridisiert.

Unspezifisch gebundene Nukleinsäuren wurden durch Waschen in Lösungen mit sukzessiv geringer werdender Ionenstärke (bis 0,2x SSPE/0,3 % SDS) und steigender Temperatur (bis 60°C) entfernt. Die Visualisierung der Signale erfolgte durch Auflegen einer Phosphoimagerplatte (Imaging Plate BAS-II S (20x40 cm) und ein entsprechendes Detektionssystem (Phosphoimager Fujix BAS 1000) bzw. durch Autoradiographie (Biomax-MS, Kodak). Nach erfolgter Detektion wurde die gebundene cDNA durch Inkubation bei 95 °C (2x 15 min) in Stripplösung (0,05x SSPE, 0,3 % SDS) heruntergewaschen.

2.3 Histologische Analyse

2.3.1 Gewinnung und Verarbeitung der untersuchten Gewebe

Zur Gewinnung der Gewebe wurde das Knockout-Allel auf 129/Sv, NMRI und C57Bl/6 propagiert. Adulte Tiere wurden dekapitiert und das Gehirn, die Hypophyse und das Rückenmark präpariert. Für Northern-Blot-Analysen wurden die Gewebe anschließend in flüssigem Stickstoff tiefgefroren. Für *in situ*-Hybridisierungen und lacZ-Färbungen wurden die Gewebe in OCT-Medium (*optimal cutting temperature*, TissueTec, Plano) überführt und in mit Trockeneis auf -25 bis -30 °C gekühltem 2-Methylbutan tiefgefroren. Für lacZ-Färbungen wurden die gefrorenen Gewebe sofort mit dem Kryotom geschnitten. Ansonsten wurden die Präparate bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

Zur Herstellung von Kryo-Schnitten wurden die eingebetteten Gewebe und Embryonen in einem Kryostaten (Mikrotom) mit einer Schnittdicke von 18 µm (Hypophysen) bzw. 20 µm geschnitten. Hierbei wurde eine Objekt-Temperatur von -13 °C und eine Kammer-Temperatur von -15 °C gewählt. Die Schnitte wurden mit vorbeschichteten Objektträgern (Menzel-Gläser, SuperFrost®Plus) aufgenommen und bei RT für 15 bis 60 min getrocknet. Für lacZ-Färbungen wurden die Schnitte sofort weiterverarbeitet. Für *in situ*-Anwendungen wurden sie bis zur Fixierung bei -80 °C gelagert.

2.3.2 *In situ*-Hybridisierung

Zum Nachweis von Transkript-Molekülen auf Gewebeschnitten wurden radioaktiv markierte RNA-Sonden synthetisiert, die entweder als komplementäre Gegenstränge zur nachzuweisenden mRNA mit dieser hybridisieren konnten (so genannte *antisense*-Sonden), oder aber identisch zur mRNA waren und entsprechend keine Hybridisierung zeigen sollten (so genannte *sense*-Sonden). Die RNA-Sonden wurden auf vorbehandelte Gewebeschnitte appliziert. Nach Hybridisierung wurden nicht korrekt gepaarte RNA-Doppelstränge durch Steigerung der Stringenz der Waschbedingungen (Abnahme der Ionenstärke der Waschlösungen und Erhöhung der Waschttemperatur) voneinander getrennt und einzelsträngige RNA-Moleküle durch Behandlung mit RNasen entfernt. Die Detektion des Hybridisierungssignals erfolgte über eine Röntgenfilmexposition und über eine Fotoemulsionsexposition.

2.3.3 *In vitro*-Transkription

Verwendete Lösung:

Transkriptionslösung	0,5 mM ATP
	0,5 mM GTP
	10 mM DTT
	8 mM MgCl ₂
	50 mM NaCl
	2 mM Spermidin
	2,5 U/μl RNAsin (Promega)
	40 mM Tris/HCl, pH 8,0

Für die Darstellung radioaktiv markierter cRNA-Moleküle wurden 15 μl α-[³⁵S]-UTP und 15 μl α-[³⁵S]-CTP (>1.000 Ci/mmol; 10 μCi/μl; Amersham) zur Trockene eingengt und anschließend in 8 μl Transkriptionslösung aufgenommen. Zu diesem Ansatz wurde 1 μl linearisierte Matrizen-cDNA (1 μg/μl) gegeben. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 1 μl Polymerase (T7- bzw. T3- oder SP6-RNA-Polymerase, 50 U/μl; Stratagene) gestartet (90 min, 37 °C) und durch Zugabe von 1 μl DNase (10 U/μl, Boehringer Mannheim) beendet (15 min, 37 °C). Die Synthese der DIG-markierten Sonden erfolgte im 20 μl Ansatz mit einem kommerziell erhältlichen Nucleotid-Mix (inklusive DIG-markiertem UTP) bei ansonsten gleichen Reaktionsbedingungen.

Bei einer Transkriptgröße von über 250 nt wurde im Anschluss an die *in vitro*-Transkription eine alkalische Hydrolyse durchgeführt. Dazu wurde der Transkriptionsansatz auf 20 μl mit

Wasser aufgefüllt, mit 20 µl 0,2 M Na₂CO₃ (pH 10.2) versetzt und bei 60 °C für eine nach folgender Formel berechnete Hydrolysezeit inkubiert:

$$t(\text{min}) = \left[\frac{L_o - 0,25}{0,0275 \times L_o} \right]$$

L_o : Ausgangslänge des Fragmentes in kb

Die Hydrolyse wurde durch Zugabe von 2 µl 10 %iger Essigsäure beendet. Die Abtrennung nicht inkorporierter Nucleotide erfolgte mit Microspin-Säulchen (Pharmacia, G25) durch Größenausschluss-Chromatographie. Zur Bestimmung der Einbaurate radioaktiver Sonden wurde ein Aliquot vor und nach der Aufreinigung entnommen und mit Szintillationsflüssigkeit (Ready Flow III, Beckmann Instruments) versetzt. Anschließend wurde die Radioaktivität im Szintillationscounter gemessen. Die [³⁵S]-markierten RNA-Sonden wurden bis zu einer finalen Konzentration von 5x 10⁴ cpm/µl in Hybridisierungspuffer verdünnt, aliquotiert und bei -20 °C gelagert.

Bei DIG-markierten Sonden wurde ein Aliquot der aufgereinigten Sondenlösung einer Agarose-Gelelektrophorese unterzogen. Je nach Bandenintensität wurde die Verdünnung festgelegt.

2.3.4 Fixierung und Prähybridisierung

Verwendete Lösungen:

PBS	150 mM NaCl 10 mM Natriumphosphat, pH 7.4
Proteinase K	1 µg/ml Proteinase K (Boehringer Mannheim) 1 mM EDTA 10 mM Tris/HCl, pH 8,0

Die tiefgefrorenen Gewebeschnitte wurden ca. 30 min bei RT aufgetaut bzw. getrocknet und anschließend für 60 min bei RT in 4 %iger Paraformaldehyd-Lösung in PBS fixiert. Zur Verbesserung der Gewebspenetration und der Zugänglichkeit der mRNA wurden die Gehirnschnitte einem Proteinase K-Verdau (10 min bei 37 °C) unterzogen und anschließend erneut in 4 %iger Paraformaldehyd-Lösung (10 min, RT) fixiert. Bei den Hypophysenschnitten war eine zehnmütige Behandlung mit 0,4 % Triton X-100 in PBS ausreichend, um eine hinreichende Gewebsdurchlässigkeit zu gewährleisten. Nach

mehrmaligem Waschen in PBS wurden die Objektträger für 10 min mit 0,25 % Essigsäureanhydrid in 0,1 M Triethanolamin, pH 8,0 inkubiert. Durch diese Behandlung wurden positive Aminogruppen acetyliert und somit unspezifische, elektrostatische Wechselwirkungen zwischen den RNA-Sonden und dem Gewebe verhindert. Nach einem weiteren Waschschrift in PBS wurden die Schnitte durch aufeinanderfolgendes Eintauchen in eine 50 %ige und 70 %ige ethanolische Lösung entwässert, für mindestens 30 min an der Luft getrocknet und anschließend bei -80 °C bis zur Hybridisierung gelagert.

2.3.5 Hybridisierung und Posthybridisierung mit radioaktiv markierten Sonden

Verwendete Lösungen:

Hybridisierungspuffer	10 % (w/v) Dextransulfat (Sigma) 50 % (v/v) Formamid (Roth) 600 mM NaCl 1 mM EDTA 0,05 % (w/v) <i>E. coli</i> tRNA (B. Mannheim) 100 µg/ml gescherte Heringssperma-DNA 20 mM DTT (Sigma) 1x Denhardt's Reagenz 10 mM Tris/HCl, pH 7,5
1x SSC	150 mM NaCl 15 mM Natriumcitrat, pH 7
Denhardt's Reagenz	0,02 % BSA 0,02 % Ficoll 0,02 % Polyvinylpyrrolidon
RNase-Lösung	20 µg/ml RNase A (Sigma) 1 U/ml RNase T ₁ (Boehringer Mannheim) 0,5 M NaCl 1 mM EDTA 10 mM Tris/HCl, pH 8,0

Zur Hybridisierung wurden die Gewebsschnitte vorsichtig mit Hybridisierungspuffer überschichtet. Dieser enthielt 5×10^4 cpm/µl der radioaktiv-markierten, durch *in vitro*-Transkription hergestellten cRNA-Sonde. Die Schnitte wurden mit einem Deckglas versehen (eingedeckelt) und über Nacht in einer feuchten Kammer bei 58 °C inkubiert. Anschließend wurden die Objektträger in 2x und 1x SSC gewaschen und für 30 min bei 37 °C einem RNase-Verdau unterzogen. Es folgten Waschschriffe in Lösungen abnehmender Ionenstärke: (1x, 0,5x, 0,2x SSC; jeweils 20 min, RT). Abschließend wurden die Objektträger bei 65 °C für 60 min in 0,2x SSC inkubiert.

Zur Detektion der Hybridisierungssignale wurden die Schnitte durch eine aufsteigende Ethanolreihe (50 % und 70 %) entwässert und nach dem Trocknen ein Röntgenfilm aufgelegt (Hyperfilm β -Max, Amersham). Zur Feinanalyse der *in situ*-Signale wurden die Objektträger in eine Fotoemulsionslösung getaucht (Kodak NTB2, 1:1 mit Wasser verdünnt und auf 42 °C erwärmt), über Nacht getrocknet und in Abhängigkeit von der zu erwarteten Signalstärke für fünf Tage bis vier Wochen bei 4 °C gelagert. Anschließend wurden die Objektträger in Kodak D19 (4 min) entwickelt, mit Rapid Fix (Kodak) fixiert (15 min) und über Nacht gewässert. Am nächsten Tag wurden ausgewählte Schnitte mit Kresylviolett gefärbt und zusammen mit den übrigen Schnitten mit einer aufsteigenden Ethanolreihe entwässert. Anschließend wurden sie im Hell- bzw. Dunkelfeld (Olympus BH2 bzw. Olympus AX70) analysiert und mit einer Digitalkamera (Intas 302, Polaroid) photographiert.

2.3.6 Hybridisierung und Posthybridisierung mit DIG markierten Sonden

Verwendete Lösungen:

P1	0,1 M Tris/HCl, pH 7,5 0,15 M NaCl
P2	1 % Blockierungsreagenz (Boehringer Mannheim) in P1
Substratpuffer	0,1 M Tris/HCl, pH 9,5 0,15 M NaCl

Die Hybridisierung erfolgte bei 50 °C, die Posthybridisierung war analog der Vorgehensweise bei den radioaktiv markierten Sonden bis zu dem Waschen bei hoher Temperatur. Danach wurden die Objektträger einmal in 0,2x SSC und anschließend in P1 gewaschen. Zur Absättigung unspezifischer Proteinbindungsplätze schloss sich eine Inkubation in P2 an. Die Schnitte wurden, nachdem sie mit einem hydrophoben Stift eingerahmt worden sind, vorsichtig mit 40 μ l Anti-DIG-Antikörperlösung (Anti-DIG FAB-Fragment mit alkalischer Phosphatase gekoppelt, 1:500 in P2, Boehringer Mannheim) überschichtet und bei 4 °C in einer feuchten Kammer ca. 16 Stunden inkubiert. Darauf folgte eine zweistündige Inkubation bei 37 °C und anschließendes zweimaliges Waschen in P1. Die alkalische Phosphatase wurde durch 15 minütiges Waschen in Substratpuffer aktiviert. Dann wurden die Objektträger für einen Zeitraum von 30 min bis zu 4 Stunden in Substratpuffer mit 338 μ g/ml Nitroblautetrazolium (NBT) (Biomol) und 175 μ g/ml 5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat Dinatriumsalz (X-Phosphat) (Biomol) inkubiert. Die Färbereaktion wurde durch Waschen in

TE-Puffer gestoppt. Anschließend wurden die Objektträger für 12 bis 15 Stunden gewässert und mit wässrigem Einbettungsmedium (Kaisers Glyceringelantine, Merck) eingedeckelt.

2.3.7 Doppel-*in situ*: radioaktive ISH kombiniert mit DIG-ISH

Für Doppelmarkierungen wurden DIG- und radioaktiv-markierte Sonden wie oben beschrieben synthetisiert und in doppelter Konzentration in Hybridisierungslösung verdünnt. Das Vermischen der beiden Sonden erfolgte im Eppendorf-Reaktionsgefäß oder direkt auf dem Objektträger. Die Hybridisierung wurde bei 55 °C durchgeführt. Die Posthybridisierung und Färbereaktion erfolgte wie unter den DIG-markierten Sonden beschrieben. Nach dem Stoppen der Färbereaktion in TE wurden die Objektträger ca. 16 Stunden gewässert. Anschließend wurden die Hypophysenschnitte durch Eintauchen in 50 %ige und 70 %ige Ethanol-Lösung dehydriert. Die Visualisierung und Abschätzung des radioaktiven Signals erfolgte durch ein- bis dreitägige Röntgenfilmexposition (BioMax MR, Kodak). Anschließend wurden die Schnitte in K5D Photo-Emulsion (Ilford) getaucht, über Nacht getrocknet und in Abhängigkeit von der zu detektierten Signalstärke für fünf Tage bis vier Wochen bei 4 °C gelagert. Entwickelt wurden die Objektträger in Kodak D19 (5 min, aufgrund der größeren Schichtdicke), fixiert (15 min) mit Rapid Fix (Kodak). Nachdem sie über Nacht gewässert worden sind, wurden sie in wässrigem Einbettungsmedium (Kaisers Glyceringelantine, Merck) eingedeckelt.

2.3.8 LacZ-Färbung

Verwendete Lösungen:

Lösung A	100 mM Kaliumphosphat, pH 7,4
Lösung B	0,2 % Glutaraldehyd 5 mM EDTA 2 mM MgCl ₂ in Lösung A
Lösung C	0,01 % Na-Desoxcholat 0,02 % Nonidet P-40 5 mM EDTA 2 mM MgCl ₂ in Lösung A
Lösung D	0,5 mg/ml X-Gal 10 mM K ₃ [Fe(CN) ₆] 10 mM K ₄ [Fe(CN) ₆] in Lösung C

Die Detektion der unter dem TRH-Rezeptor Promotor exprimierten bakteriellen β -Galactosidase erfolgte auf entsprechend vorbehandelten Kryoschnitten. Um eine optimale Sensitivität zu gewährleisten und eine oxidative Degradation des Enzyms zu verhindern, wurden die Präparate hierzu direkt nach dem Einfrieren geschnitten und weiterverarbeitet. Das Vorgehen wurde dem Protokoll von Dr. A. Gossler und Dr. J. Zachago entnommen (Gossler and Zachago 1993), wobei anstatt mit Paraformaldehyd eine Fixierung mit Glutaraldehyd durchgeführt wurde. Diese Behandlung führte zu einer geringeren Beeinträchtigung der enzymatischen Aktivität.

Die Präparate wurden analog dem ISH-Protokoll in einer Schichtdicke von 20 μ m geschnitten und auf vorbehandelte Objektträger überführt. Anschließend wurden sie für 15 min bzw. bis zum Ende des Schneidens bei RT getrocknet. Danach wurden die Schnitte für 5 min in Lösung B fixiert. Nach dreimaligem jeweils zehninütigen Waschen in Lösung C wurden die Objektträger über Nacht bei 37 °C in Lösung D inkubiert. Zur Entfernung der anhaftenden Färbelösung wurden die Schnitte für 15 min in Lösung C und zweimal 5 min in destilliertem Wasser gewaschen. Anschließend erfolgte die Gegenfärbung mit Nuclear Fast Red (Vektor) und die Eindeckelung in wässrigem Einbettungsmedium (Kaisers Glyceringelatine).

2.4 Primär- und Gewebeskultur

2.4.1 Hypophysenzell-Kultur

Verwendete Lösungen und Medien:

Inkubationsmedium	DMEM (Gibco Brl) pH 7,3 25 mM HEPES 3,7 g/l NaHCO ₃ 50 mg/l Streptomycin 35 mg/l Penicillin
Medium A	Inkubationsmedium mit 0,3 % BSA
3 % BSA	3 % BSA in Inkubationsmedium
Trypsin (ICN)	2,5 % in Medium A
Trypsininhibitor TypI-S aus Sojabohnen (Sigma)	Stammlösung 10 mg/ml in Medium A (final 0,1 % in Medium A)
DNase I (Sigma)	Stammlösung 20 μ g/ml in H ₂ O

	(final 2 µg/ml in H ₂ O)
Medium C	4,76 g/l HEPES 7,5 g/l NaCl 0,4 g/l KCl 0,14 g/l NaH ₂ PO ₄ · H ₂ O 1 g/l NaHCO ₃ 1 g/l D-Glucose 10 mg/l Phenolrot 0,3 % BSA 50 mg/l Streptomycin 35 mg/l Penicillin, pH 7,3
Medium B1	Medium C mit 2 mM EDTA
Nährmedium	13,3 g/l DMEM/HAM F12 1:1 (Gibco) 5 mg/l Insulin-Zn (26 IU/mg) (Sigma) 50 µl/l Katalase (250 mg/12,5 ml) (Boehringer Mannheim) 35 mg/l Penicillin-C5 (25 · 10 ⁶ IU) (Sigma) 50 mg/l Streptomycin-Sulfat (Sigma) 10 ml BSA 10% in IMDM 40 mg/l Transferrin 15 mM HEPES 15 mM TES 1 g/l NaHCO ₃ 600 µl/l Ethanol 20 µM Ethanolamin 25 nM Natriumselenit, 290 mosm/kg H ₂ O

Die Präparation der Zellen aus den Adenohypophysen adulter Mäuse erfolgte nach der Methode von Dr. C. Deneff (Vanderschueren et al. 1982, Deneff et al. 1989) durch enzymatisches und mechanisches Dispergieren.

Für die Präparation der Hypophysenzellen wurden je 15 männliche bzw. weibliche Mäuse durch Dekapitierung getötet. Die Köpfe wurden zunächst mit kaltem Wasser abgespült und in 70 % Ethanol desinfiziert. Anschließend wurde auf der Sterilbank jeweils die Kopfhaut entfernt und der Schädel geöffnet. Die Hypophyse wurde frei präpariert und *in situ* die Neurohypophyse mit einer gebogenen Pinzette abgehoben und verworfen. Die Adenohypophysen wurden in einer Petrischale mit 5 ml Medium A gesammelt und dann mit einer Rasierklinge in kleine Fragmente zerteilt. Diese wurden mit einer sialinisierten Pasteurpipette in ein konisches, sialinisiertes Glasröhrchen überführt und 15 min bei 37 °C in 2 ml Trypsin-Lösung im Schüttelwasserbad enzymatisch aufgeschlossen. Anschließend wurde aus aufgebrochenen Zellen austretende DNA durch Zugabe von 2 ml DNase-Lösung und kurzes Schütteln hydrolysiert, der Überstand abgenommen und das restliche Trypsin

durch Inkubation in 1 ml Trypsininhibitor-Lösung inaktiviert. Nach Zugabe von 2 ml Medium B1 (EDTA-haltiges Medium zur Komplexierung von Ca^{2+} -Ionen, die als Kofaktoren für einige Zelladhäsionsmoleküle wirken) und fünfminütiger Inkubation wurden 2 ml Medium C zugegeben. Nach einer 15 minütigen Inkubation wurde der Überstand abgenommen, dreimal mit auf 37 °C vorgewärmtem Medium C gewaschen und die Fragmente in 0,75 ml Medium C durch kräftiges Aufziehen mit einer verengten Pasteurpipette (vier bis fünfmal) mechanisch dispergiert. Der Überstand mit den vereinzelt Zellen wurde in 10 ml Röhrchen zu 4,5 ml Medium A mit 50 µl DNase-Lösung pipettiert. Das mechanische Dispergieren wurde mit den restlichen, sedimentierenden Fragmenten wiederholt. Die erhaltene Zellsuspension wurde über ein Nylonnetz (50 µm Porengröße) in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen filtriert, vorsichtig mit 3 ml 3 %iger BSA-Lösung unterschichtet und 10 min bei RT mit 120 g zentrifugiert. Der Überstand wurde anschließend dekantiert und das Zellpellet in 10 ml Nährmedium resuspendiert. Durch Nigrosinausfluß wurde die Zahl lebender Zellen bestimmt. 1×10^6 Zellen wurde in 2 ml Nährmedium auf mit Poly-D-Lysin vorbeschichtete Petrischälchen (Durchmesser 35 mm) ausgesät. Die Beschichtung der Schälchen erfolgte durch einstündige Inkubation mit 2 ml Poly-D-Lysin Lösung (0,1 g Poly-D-Lysin-HBr in einem Liter 0,15 M Boratpuffer, pH 8,4, sterilfiltriert) und anschließendes zweimaliges Waschen mit Inkubationsmedium. Die Zellen wurden bei 37 °C, 1,5 % CO_2 und 100 % Luftfeuchtigkeit kultiviert.

2.4.2 Stimulation der kultivierten Adenohypophysenzellen

Vor den Stimulationsexperimenten wurden die Zellen vier Tage in Serum-haltigem Medium kultiviert. Dann wurde der Überstand abgenommen und für zwei Stunden durch Serum-freies Inkubationsmedium (Basis-Medium) ersetzt. Anschließend wurde dieses abgenommen, verworfen und für definierte Zeitperioden durch Basis-Medium mit/ohne Zusatz von final 100 µM TRH ersetzt.

2.4.3 Hypophysenhälften-Kultur

Die Inkubation der Hypophysenhälften erfolgte sofort nach der Entnahme in Serum-freiem Basis-Medium bei 37 °C, 1,5 % CO_2 und 100 % Luftfeuchtigkeit. Die Stimulationsexperimente begannen nach zweistündiger Inkubation in diesem Medium. Die Durchführung war analog der Vorgehensweise bei den adenohypophysären Zell-Kulturen.

2.4.4 Radio-Immuno-Assay

Die Ermittlung der TSH-, Prolactin- und Schilddrüsen-Hormonkonzentrationen erfolgte mit Hilfe von Radioimmunoassays in Zusammenarbeit mit Dr. H. Jarry (Göttingen, TSH und Prolactin) und Dr. T. Visser (Rotterdam, T₃ und T₄). Dieses Verfahren beruht darauf, dass radioaktive (Tracer) und nicht radioaktive Antigene um eine begrenzte Anzahl von Antikörperbindungsstellen konkurrieren. Die Menge von ¹²⁵J-markiertem Prolactin (TSH bzw. Schilddrüsenhormon), das an die Antikörper gebunden hat, war hierbei umgekehrt proportional zur Prolactin (TSH/T₃/T₄) Konzentration der untersuchten Probe. Die Trennung von freiem Antigen und vom Antigen-primärer-Antikörper-Komplex erfolgte durch Fällung mit einem sekundären Antikörper.

Die verwendeten primären Antikörper gegen Ratten- bzw. Maus-Prolactin und gegen Maus-TSH sowie Referenz-Hormone wurden von der NIDDK (University of Maryland School of Medicine, USA) bereitgestellt. Die Herstellung des ¹²⁵Jod markierten Hormon-Tracer erfolgte nach der Chloramin T-Methode (Hunter und Greenwood, 1962).

2.5 Verwendete cDNA-Fragmente und Plasmide

Für die Herstellung markierter cRNA-Sonden wurden zum Teil Fragmente bereitgestellter cDNA-Klone verwendet. Die Bezugsquellen und Größen sind in den folgenden Tabellen aufgeführt. Für die Detektion der TRH-Rezeptoren konnte aufgrund der hohen Sequenzhomologie die jeweilige Ratten cDNA verwendet werden. Die Sonden für das TRH-DE und ppTRH wurden von der Maus-Sequenz abgeleitet und über entsprechende PCR-Reaktionen im Rahmen dieser Doktorarbeit kloniert. Die lacZ-Sonde wurde aus dem Targeting-Vektor pGNA präpariert.

Die Plasmide für die verwendeten DIG-Sonden wurden von Dr. M. Schäfer und Dr. H. Heuer zur Verfügung gestellt.

Die TRH-R1-Sonden für die Southern-Analysen wurden aus subklonierter genomischer DNA generiert. Sie waren jeweils außerhalb der rekombinierenden Arme lokalisiert. Die lacZ-Sonde wurde aus dem pGNA-Targetingvektor geschnitten.

Verwendete cDNA-Fragmente für die radioaktive ISH:

cDNA	Ausgangsplasmid	Literatur	von	Fragment	Größe	linearisiert mit	Polymerase / Orientierung
mTRH-DE	-	(Schauder, Schomburg et al. 1994)	selbst	nt 73-548 in pLS (Eco RV)	475 bp	Eco RI Hind III	T3/antisense T7/sense
rTRH-R1	pSK TRH-2R	(De la Pena, Delgado et al. 1992)	P. de la Pena	nt 249-797 in pLS (Hind III / Eco RI)	548 bp	Hind III Eco RI	T7/antisense T3/sense
rTRH-R2	pBS TRH-R2	(Cao, O'Donnell et al. 1998)	P. Walker	nt 330-1637 in pcDNA 3 (Eco RV / Xba I)	1337 bp	Hind III Xba I	Sp6/antisense T7/sense
mppTRH	-	(Lechan, Wu et al. 1986)	selbst	nt 202-733 in pLS (Eco RV)	531 bp	Eco RI Hind III	T3/antisense T7/sense
β -GAL	pGNA	(Le Mouellic, Lallemand et al. 1990)	H. Le Mouellic	nt 3763-4591 in pLS (Eco RI)	828 bp	Eco RV Eco RI	T7/antisense T3/sense

Verwendete cDNA-Fragmente für DIG-ISH:

RNA-Sonde	Vektor	Größe	Fragment	Zugriffsnummer	linearisiert mit	Polymerase / Orientierung
GH	pLS	198 bp	nt 248-445	U62779	Hind III Pst I	T7/antisense T3/sense
β -TSH	pLS	254 bp	nt 190-445	M10902	Hind III Pst I	T7/antisense T3/sense
β -FSH	pLS	880 bp	nt 1-879	M36804	Hind III Pst I	T7/antisense T3/sense
Prolactin	pLS	184 bp	nt 1566-1749	J00769	Hind III Pst I	T7/antisense T3/sense
POMC	pGEM4	471 bp	nt 56-526	J00759	Xba I Hind III	T7/antisense Sp6/sense
LH	pLS	457 bp			Xba I BamHI	T3/antisense T7/sense

Verwendete Fragmente für Northern- und Southern-Analysen:

cDNA bzw. genomische DNA	Name	Ausgangsplasmid	Fragment	Größe	ausgeschnitten mit
mTRH-R1	5'-Sonde	pBS-Klon 53 (5'-Bereich des TRH-R-Gens)	Hind III/Stu I 5'-intronisches Fragment in pBS (Eco RV)	370 bp	Eco RV
mTRH-R1	R1-Exon2	pBS-mTRH-R1	nt 220-1093 Exon 2-Fragment in pBS (Eco RV)	873 bp	Eco RV
β -GAL	lacZ-Sonde	pGNA	nt 2655 – 3478 in pBS (Eco RV)	823 bp	Eco RV

3 Ergebnisse

3.1 Herstellung TRH-R1-defizienter Mäuse

3.1.1 Generierung des Targetingvektors

Grundlage für die Entwicklung der TRH-R1^{-/-}-Mausmutante war die Klonierung der TRH-R1-cDNA (Straub, Frech et al. 1990) und anschließende Aufklärung der genomischen Organisation des Rezeptors in der Maus (Duthie, Taylor et al. 1993).

Mit einer TRH-R1-cDNA-Sonde (aus Ratte, nt 249 – 797) wurden etwa 6×10^6 Klone einer Maus-genomischen BAC- (*bacterial artificial chromosome*) Bibliothek abgesucht. Fünf detektierte Klone wurden isoliert, drei davon enthielten das vollständige Gen, zwei Klone nur Teilbereiche. Nach Subklonierung überlappender Fragmente erfolgte zunächst eine Restriktionskartierung des Gens. Anschließend wurden genomische Abschnitte (rekombinierende Arme) in den pGNA-Vektor subkloniert, die 5- bzw. 3-Strich vom Bereich lagen, der ersetzt werden sollte. Dieser Bereich umfasste die nahezu vollständige kodierende Sequenz (exklusive der ersten fünf Aminosäuren) und Teile des 3-Strich-nichttranslatierten Bereichs (3-Strich-UTR) des TRH-Rezeptor 1. Ohne eine Unterbrechung des offenen Leserasters wurde die Sequenz des TRH-Rezeptor 1 durch das promotorlose Gen der bakteriellen β -Galactosidase (*lacZ*) und das Neomycin-Resistenzgen (PGK-neo) ersetzt.

Zusätzlich wurde das Gen für die Thymidinkinase (TK) des *Herpes Simplex* Virus als negativer Selektionsmarker in den Bereich außerhalb des 5-Strich-rekombinierenden Arms kloniert. Eine schematische Übersicht des Targeting-Vektors und des genomischen Bereichs vor und nach der homologen Rekombination ist in Abbildung 1 dargestellt. In dunklem Grau unterlegt ist die kodierende Sequenz des TRH-R1, in hellem Grau die Sequenzen der integrierten Gene. Es sollte hierbei darauf hingewiesen werden, dass die unter der Kontrolle des endogenen TRH-R1-Promotors exprimierte β -Galactosidase eine eigene Polyadenylierungs-Sequenz beinhaltet und die *lacZ*-mRNA somit keine 3-Strich-UTR-Sequenzen des TRH-R1-Gens enthält.

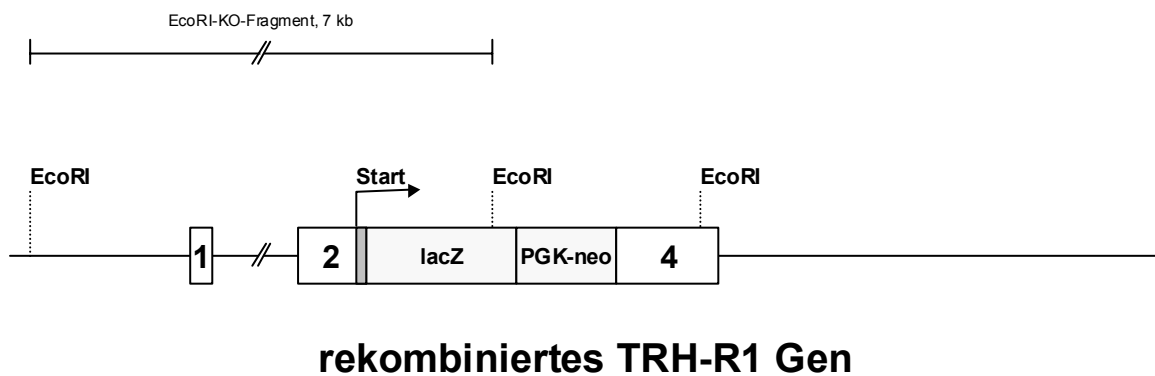
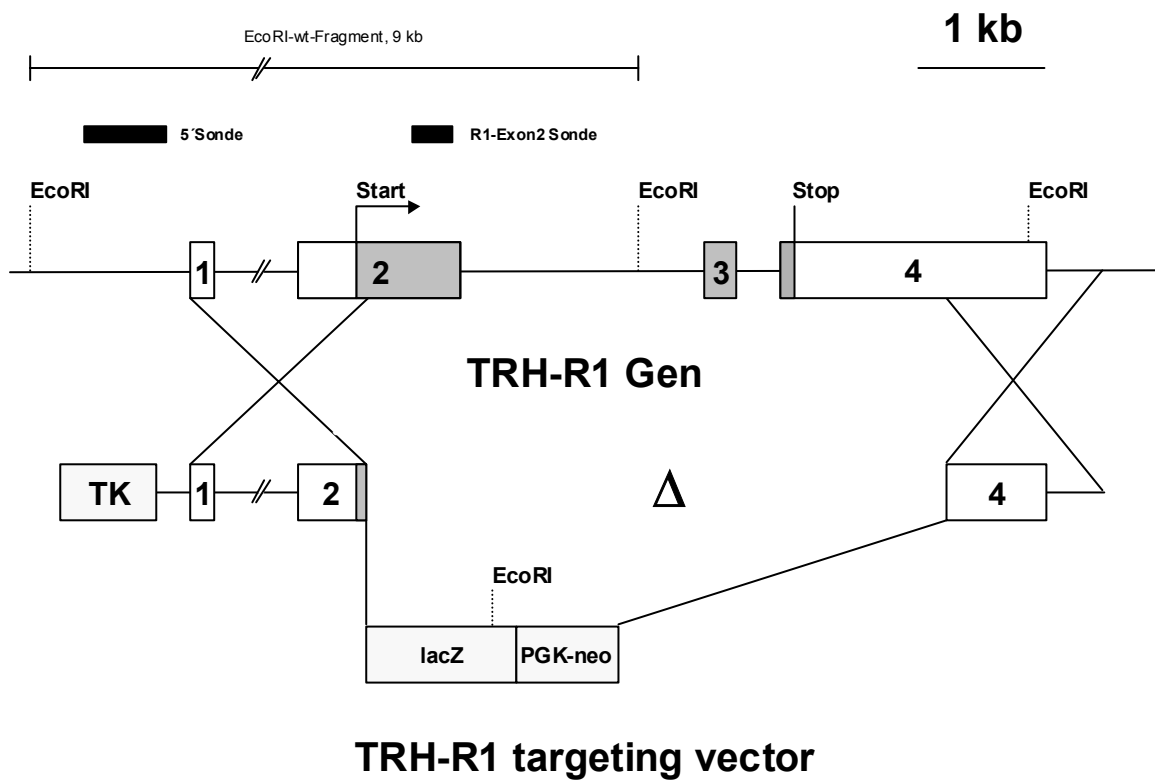


Abbildung 1: Schematische Darstellung des TRH-Rezeptor-1-Genlocus, des Targeting-Vektors und des mutierten Gens nach der homologen Rekombination: Die Exons werden durch Kästen, die Intron-Bereiche durch Linien repräsentiert. Δ , deletierter Bereich; UTR, nicht translatierte Region; lacZ, bakterielle β -Galactosidase; PGK-neo, Neomycin-Resistenz-Kassette; TK, Thymidin-Kinase des *Herpes simplex* Virus; EcoRI, EcoRI-Restriktionsspaltstelle; Start, Translationsstart, Stop, Translationsstop

3.1.2 *Gene Targeting* in embryonalen Stammzellen

In embryonalen Stammzellen (R1- bzw. E14.1-ES-Zellen) wurde mittels homologer Rekombination die vollständige TRH-R1-kodierende Sequenz (mit Ausnahme der ersten fünf Aminosäuren) und ein Teil des 3-Strich-UTR durch das bakterielle *lacZ*-Gen (und das Neomycin-Resistenz-Gen) ersetzt. Durch eine Southernhybridisierung der EcoR1-geschnittenen ES-Klon-DNA mit einer außerhalb der rekombinierenden Arme gelegenen Sonde (5-Strich Sonde) konnte zwischen Zufalls- und homologer Rekombination unterschieden werden. Das bei einem wildtyp-Allel detektierte Eco-R1-Fragment hatte eine Größe von etwa 9.000 Basenpaaren. Dagegen war das Fragment des mutanten Allels ca. 2.000 Basenpaare kleiner, (siehe Abb. 1 und Abb. 2). Die Targetingfrequenz, also das Verhältnis zwischen homologer Rekombination und Zufallsintegration, lag hierbei bei etwa 1 zu 300, d. h. von 300 analysierten ES-Klonen war im Schnitt nur ein Klon das Produkt einer homologen Rekombination.

Durch PCR bzw. Southern-Analytik konnten in 13 Elektroporationsexperimenten insgesamt mehr als 20 unabhängige ES-Klone mit einer gezielten Inaktivierung des TRH-R1-Gens isoliert werden.

3.1.3 Erzeugung von Chimären

Aufgrund morphologischer Kriterien (Homogenität, Differenzierungsgrad und Wachstumsrate) wurden acht ES-Zellklone ausgewählt, propagiert und für Morula-Aggregationsexperimente verwendet. Die manipulierten Embryonen wurden über Nacht bis zum Erreichen des Blastozystenstadiums kultiviert und anschließend in pseudoschwangere (Foster-)Mäuse transferiert. Auf diese Weise konnten insgesamt 62 chimäre Mäuse generiert werden: 17 R1-abgeleitete, 45 auf Basis von E14.1-ES-Zellen. Der Grad des Chimarismus wurde anhand der Fellfarbe abgeschätzt und variierte zwischen 5 % (einige ES-Zell-abgeleitete Flecken) und 90 % (agouti-farbene Mäuse). Um auf eine mögliche Keimbahn-Transmission hin zu testen, wurden diese Chimären mit wildtyp-Mäusen verpaart und der Nachwuchs (F1) anhand der Fellfarbe analysiert.

Es konnten 15 Keimbahntransmitter identifiziert werden, die sich von fünf unterschiedlichen ES-Klonen ableiteten (zwei R1 und drei E14.1-Klone). Die Transmissionsrate, d. h. das Verhältnis von ES-Zell-abgeleiteten (mutierten) zu Spender-abgeleiteten (wildtyp-) Nachkommen, lag zwischen 5 % und 100 %.

3.1.4 DNA- und RNA-Analyse der knockout-Tiere

Abbildung 2 zeigt eine typische Southern-Hybridisierung von Nachkommen heterozygoter Knockout-Tiere. Durch diese Analyse ließen sich wildtyp-Tiere (nur die 9.000 Basenpaare (bp) wildtyp-Bande) von ihren homozygoten (nur die 7.000 bp knockout-Bande) und heterozygoten Geschwistern (beide Banden) unterscheiden.

Die Northern-Analyse von Geweben heterozygoter und homozygoter knockout-Tiere (Abb. 3) zeigte, dass in TRH-R1-defizienten Mäusen keine TRH-Rezeptor-1-mRNA mehr nachweisbar ist. Somit handelt es sich um einen vollständigen Verlust der TRH-R1-Genfunktion.

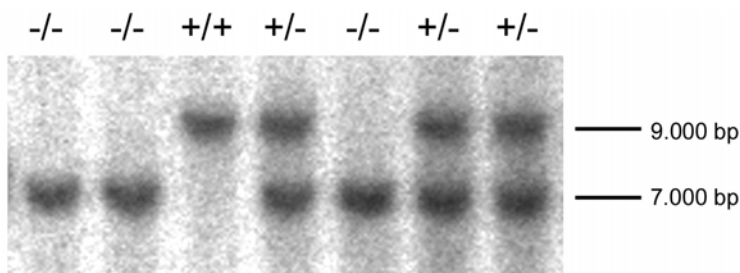


Abbildung 2: Southern-Genotypisierung von TRH-R1^{+/-}-Nachkommen: Dargestellt ist das typische Ergebnis einer Genotypisierung von wildtyp ($+/+$), heterozygoten ($+/-$) und homozygoten ($-/-$) Nachkommen. Die Gel-aufgetrennten EcoR1-Fragmente wurden nach dem Blotting mit der 5'-Sonde hybridisiert. Die 9.000 Basenpaare (bp) große Bande ist die wildtyp-Bande, die 7.000 bp große Bande die knockout-Bande. (siehe Abb. 1)

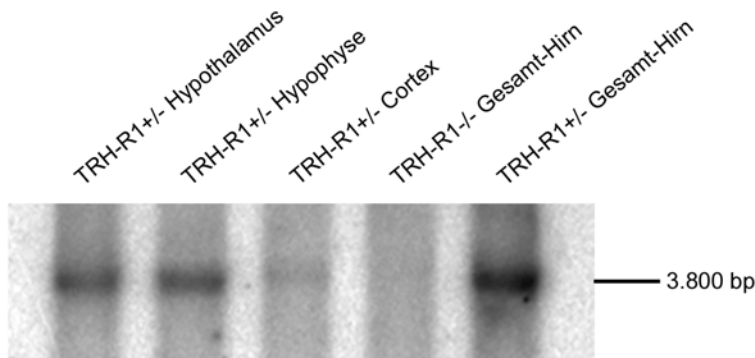


Abbildung 3: Northern-Analyse heterozygoter und homozygoter TRH-R1-Knockout-Tiere: Aus verschiedenen Gehirngeweben wurde mRNA präpariert. 6µg RNA wurden auf das Gel aufgetragen. Die aufgetrennte mRNA wurde mit der R1-Exon2-Sonde hybridisiert. 3.800 Basenpaare (bp) entspricht der TRH-R1-mRNA. In heterozygoten Tieren kann eine starke Bande im Hypothalamus, in der Hypophyse und in der Gesamt-Hirn-Präparation detektiert werden. Im Cortex ist nur eine schwache Expression nachweisbar. In der Gesamt-Hirn-Präparation aus homozygoten Mäusen kann dagegen kein Hybridisierungssignal für TRH-R1-mRNA nachgewiesen werden.

3.2 Phänotyp TRH-R1-defizienter Mäuse

3.2.1 Allgemeines Erscheinungsbild und Verhalten

Homozygote TRH-Rezeptor-1-Knockout Mäuse waren fertil und zeigten keine offensichtlichen Abnormalitäten im allgemeinen Körperbau, in der Morphologie des Gehirns oder im Verhalten. Dennoch waren sie bereits nach zwei Wochen aufgrund ihrer geringeren Körpergröße zu identifizieren.

3.2.2 Verminderte Gewichtszunahme

Um den Effekt des fehlenden TRH-Rezeptor 1 auf die Gewichtszunahme zu quantifizieren, wurde deren Verlauf in den ersten acht Wochen nach der Geburt bestimmt. Hierzu wurden insgesamt elf homozygote TRH-R1-defiziente Mäuse und 13 wildtyp-Geschwister in definierten Zeitabständen gewogen. Alle Tiere entstammten der F3-Generation und hatten einen NMRI-genomischen Hintergrund.

Abbildung 4 zeigt eine deutliche, statistisch signifikante Verminderung der Gewichtszunahme nach 25, 35 und 42 Tagen. Nach acht Wochen war weiterhin ein Unterschied detektierbar, der jedoch nicht mehr statistisch signifikant war. Eine Analyse späterer Altersgruppen (nicht gezeigt) machte deutlich, dass sich die Gewichtskurve der homozygoten Mäuse der ihrer wildtyp-Geschwister annäherte, diese aber nie ganz erreichte. Aufgrund größerer Schwankungen zeigten auch diese Werte keine statistische Signifikanz.

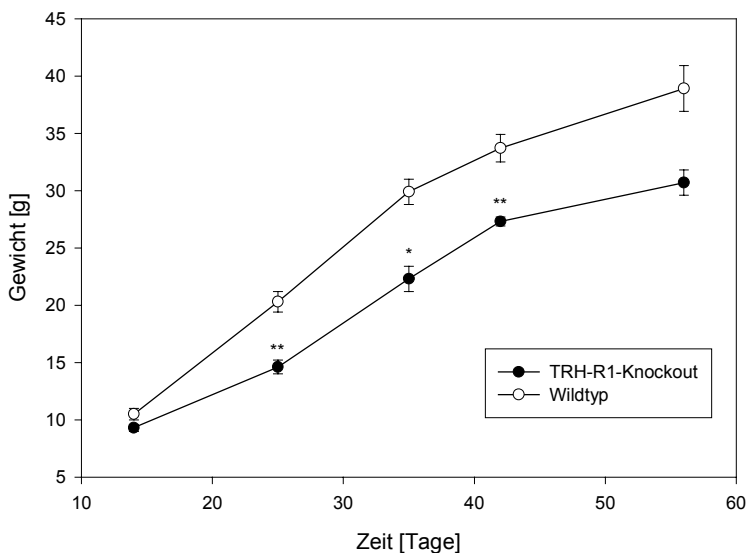


Abbildung 4: Effekt der TRH-R1-Defizienz auf die Gewichtsentwicklung: Für die Gewichtsbestimmung wurden vier Geschwisterpaare (NMRI-Background) verwendet. Die Anzahl der Tiere ist: n = 13 wildtyp- und n = 11 homozygote Tiere. Datenpunkte repräsentieren den Mittelwert \pm SEM. *, $P < 0,05$; **, $P < 0,01$ vs. Wildtyp.

3.2.3 Verminderte Körpertemperatur

Um zu analysieren, ob das Fehlen des TRH-Rezeptor 1 eine Auswirkung auf die Körpertemperatur der mutanten Mäuse hatte, wurde diese in 15 männlichen, homozygot TRH-R1-defizienten Mäusen und 13 wildtyp-Geschwistern rektal bestimmt. Alle Tiere hatten einen C57Bl/6-genomischen Hintergrund.

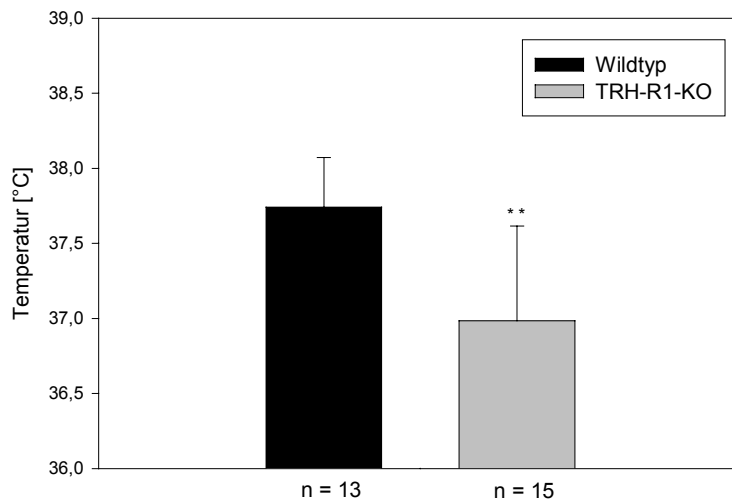


Abbildung 5: Effekt der TRH-R1-Defizienz auf die mittlere Körpertemperatur: Die Körpertemperatur wurde acht Wochen nach der Geburt in wildtyp-Mäusen (n = 13) und ihren mutanten Geschwistern (n = 15) rektal bestimmt. Die Messung erfolgte um neun Uhr morgens. Die Balken entsprechen den Mittelwerten \pm SEM. **, P < 0,01 vs. Wildtyp.

Aufgrund einer schnellen, vermutlich stressinduzierten Körpertemperatur-Zunahme ergaben sich bei dieser Bestimmung relativ große Schwankungen. Dennoch konnte bei mutanten Mäusen eine statistisch signifikante Reduktion der mittleren Körpertemperatur um etwa 0,7 °C festgestellt werden.

3.2.4 Kälte-Exposition

Um zu analysieren, inwieweit die TRH-R1-Defizienz eine Auswirkung auf die Fähigkeit der Mäuse hat, eine kalte Umgebungstemperatur zu tolerieren, wurde eine Kälte-Exposition durchgeführt. Dazu wurden je drei männliche Knockout-Mäuse und ihre wildtyp-Geschwister in einen 4 °C-Raum überführt. Eine halbe Stunde vor dem Transfer und zu definierten Zeitpunkten danach wurde die Körpertemperatur rektal gemessen.

Obwohl die Körpertemperatur in den Knockout-Mäusen im Mittel um etwa 0,6 °C niedriger war als in ihren wildtyp-Geschwistern, ließ sich in den ersten eineinhalb Stunden nach Eintritt in die Kälte kein Unterschied im Temperatur-Verlauf feststellen. Dieses änderte sich nach weiteren eineinhalb Stunden dramatisch. Während sich die wildtyp-Mäuse bei einer

Körpertemperatur von etwa 35 °C stabilisierten, fiel die Temperatur der Rezeptor-defizienten Mäuse im Mittel auf Werte unter 32 °C. Nach einer weiteren Stunde war ein Knockout-Tier bereits tot, die übrigen beiden zeigten eine rektale Temperatur von weniger als 18 °C.

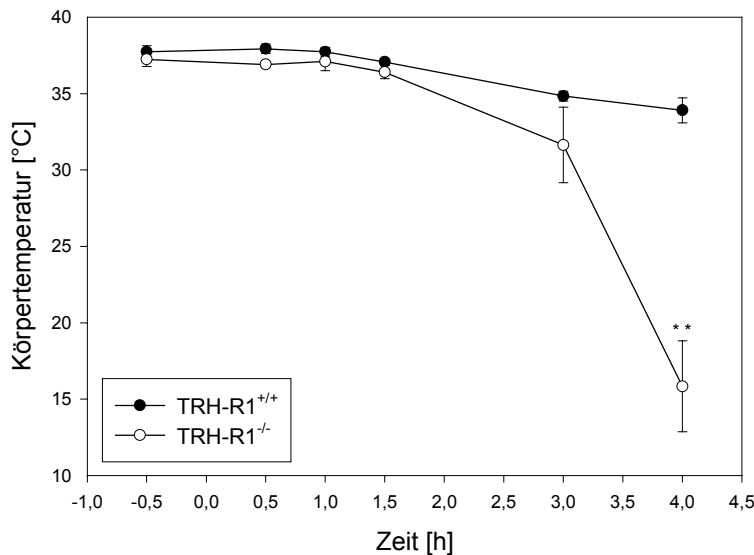


Abbildung 6: Kälteexposition: Drei männliche wildtyp-Mäuse und drei Knockout-Tiere aus einem Wurf wurden einer Temperatur von 4 °C ausgesetzt. Eine halbe Stunde vor und zu definierten Zeitpunkten nach dem Transfer wurde die Körpertemperatur rektal gemessen. Die Datenpunkte repräsentieren Mittelwerte \pm SEM. **, $P < 0,01$ vs. Wildtyp.

3.3 Endokrinologische Analyse

Verschiedene Parameter wurden analysiert, um Veränderungen in der endokrinen Balance zu detektieren.

3.3.1 Schilddrüsen-Hormon-Werte

Um den Effekt der TRH-R1-Deletion auf die Schilddrüsen-Hormon-Konzentration zu bestimmen, wurden insgesamt 43 wildtyp-Blutseren, 27 Seren von heterozygoten Mäusen und 48 Seren von homozygoten Mäusen analysiert (Abb. 7). Hierfür wurden sowohl männliche als auch weibliche Mäuse verwendet. Die Tiere hatten einen NMRI- und C57Bl/6-genomischen Hintergrund.

Die Schilddrüsen-Hormonkonzentration in den heterozygoten Tieren war nicht von den wildtyp-Werten unterscheidbar. Dagegen konnte bei den homozygoten Knockout-Mäusen sowohl bei der Gesamt-T₃- als auch bei der Gesamt-T₄-Konzentration eine statistisch signifikante Reduktion auf etwa 50 % der wildtyp-Werte festgestellt werden. Hierbei konnten

weder Stamm- noch Geschlechtsspezifische Unterschiede beobachtet werden. Bei keinem der analysierten Knockout-Tiere konnte ein T₄-Gehalt von über 30 nmol/l gemessen werden, keine der wildtyp-Mäuse hatte eine Konzentration unter 30 nmol/l.

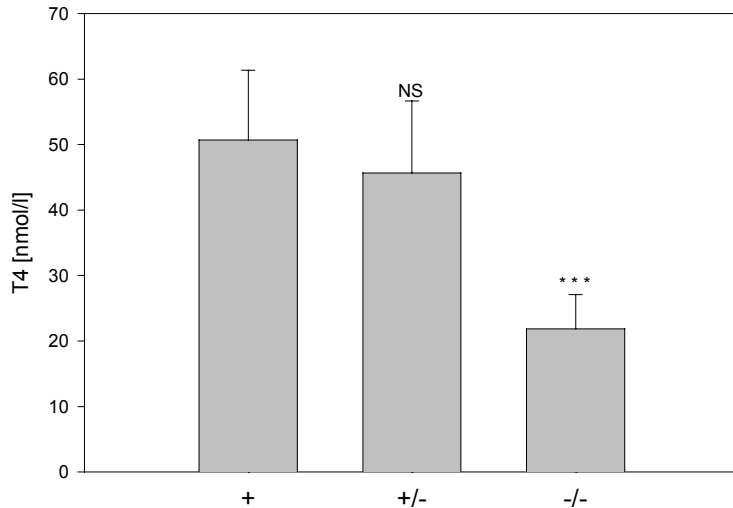
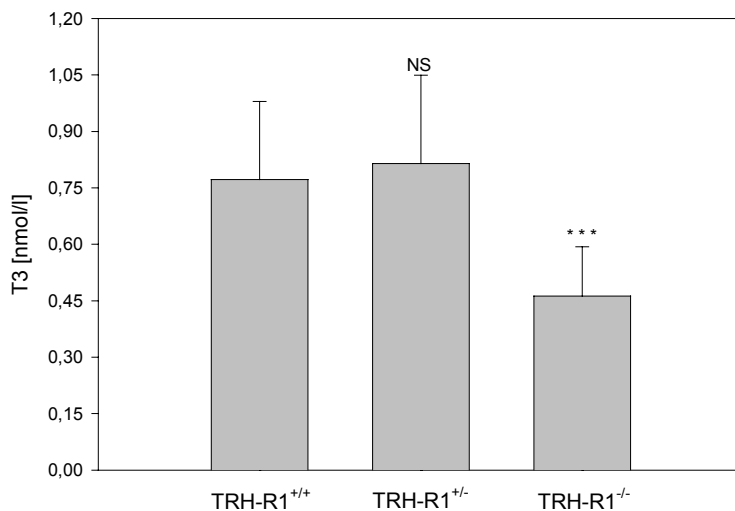


Abbildung 7: Schilddrüsen-Hormon-Konzentrationen: Gemessen wurden die Gesamt-T₄- und Gesamt-T₃-Konzentrationen in adulten wildtyp-Mäusen (n = 43), heterozygoten Mäusen (n = 27) und homozygoten Mäusen (n = 48). Es wurden männliche und weibliche Tiere verwendet, auf einem NMRI bzw. C57Bl/6-genomischen Hintergrund. Stamm- oder Geschlechtsspezifische Unterschiede konnten nicht detektiert werden. Die jeweiligen Balken entsprechen den Mittelwerten ± SEM. ***, P < 0,001 vs. Wildtyp. NS, nicht signifikant.



3.3.2 TSH-Werte

Für die Analyse der TSH-Konzentrationen wurde ein Teil der Blutseren verwendet, die bereits für die Schilddrüsen-Hormon-Bestimmung genutzt worden waren. Anders als bei den Schilddrüsen-Hormonen waren jedoch bei den TSH-Werten zum Teil erhebliche Varianzen

feststellbar, die weder Geschlechts- noch Genotyp-spezifisch zuzuordnen waren. So konnte bei den männlichen Knockout-Mäusen eine Konzentrations-Spanne von 0,5 bis 6 ng TSH/ml detektiert werden. Da sich die Konzentrationsunterschiede in einem Kontroll-RIA bestätigen ließen, wurden im Diagramm (Abb. 8) alle erhobenen Werte berücksichtigt.

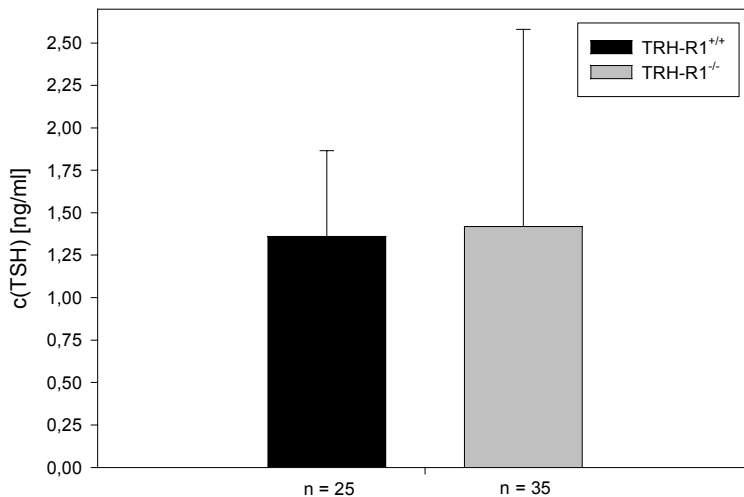


Abbildung 8: TSH-Serumkonzentration: Für die Bestimmung der TSH-Werte wurden Seren von 25 wildtyp-Mäusen und 35 homozygoten knockout-Mäusen analysiert. Es wurden sowohl männliche als auch weibliche Mäuse verwendet, auf NMRI- und auf C57Bl/6-genomischen Hintergrund. Die Balken repräsentieren Mittelwerte \pm SEM.

Entsprechend den Variationen ergab sich eine erhebliche Standardabweichung. Da die errechneten Mittelwerte annähernd identisch waren, konnte dennoch auf eine nahezu unveränderte TSH-Gesamtkonzentration im Serum geschlossen werden.

3.3.3 Prolactin-Werte

Da die Prolactin-Sekretion durch Stress induzierbar ist, wurden für die Analyse der Serumkonzentration nur Tiere verwendet, die nicht vor der Blutentnahme betäubt worden waren. Somit konnte nur ein Teil der Seren verwendet werden, die zur Messung der TSH-Werte herangezogen worden waren. Da die Prolactin-Konzentration in weiblichen Mäusen zudem Zyklus-abhängigen Schwankungen unterworfen ist, wurden auch diese bei der statistischen Auswertung (Abb. 9) nicht berücksichtigt. Die Gegenüberstellung der mittleren Serum-Prolactin-Konzentration männlicher Mäuse zeigte eine statistisch signifikante Reduktion auf etwa 50 % des wildtyp-Wertes. Auch bei weiblichen Tieren konnte eine deutliche Reduktion der Prolactin-Konzentration festgestellt werden, die aufgrund der erheblichen Schwankungen jedoch nicht statistisch signifikant war.

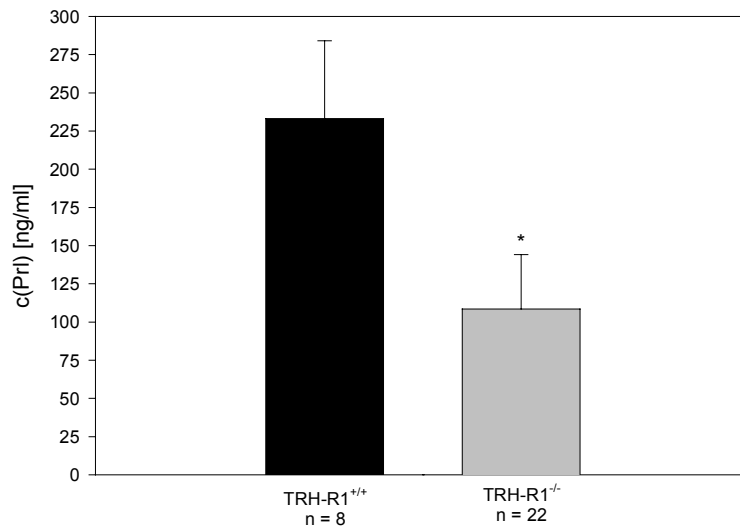


Abbildung 9: Effekt der TRH-R1-Defizienz auf die Serum-Prolactin-Konzentration: Die Seren von acht wildtyp- und 22 homozygoten männlichen Mäusen wurden auf ihren Prolactin-Gehalt untersucht. Die Balken entsprechen den Mittelwerten \pm SEM. *, $P < 0,05$ vs. Wildtyp.

3.3.4 DIG-*in situ*-Analyse der hypophysären hormonproduzierenden Zellen

Um die Auswirkung der TRH-R1-Deletion auf die Zusammensetzung der hormonproduzierenden Zellen in der Hypophyse und auf die Expression der jeweiligen mRNA zu untersuchen, wurde eine DIG-*in situ*-Analyse auf Cryoschnitten durchgeführt. Analysiert wurden Tiere auf einem C57Bl/6 und einem 129Sv-genomischen Hintergrund. Es wurden jeweils mindestens drei Hypophysen jeden Geschlechts und aller Genotypen (wildtyp, heterozygot und homozygot) verwendet. Die Tiere waren zwischen acht und neun Wochen alt. Die dargestellten *in situ*-Färbungen zeigen beispielhaft den jeweiligen Status. Die Signale in den heterozygoten Tieren waren nicht vom Wildtyp zu unterscheiden.

3.3.5 Somatotrope, corticotrope und gonadotrope Zellen

Weder für die GH-produzierenden somatotropen Zellen, noch für die gonadotropen (LH, Luteinisierendes Hormon und FSH, Follikel-stimulierendes Hormon) oder corticotropen (POMC, Proopiomelanocortin) konnte eine Veränderung der Anzahl oder der Expressionstärke beobachtet werden (Abb. 10).

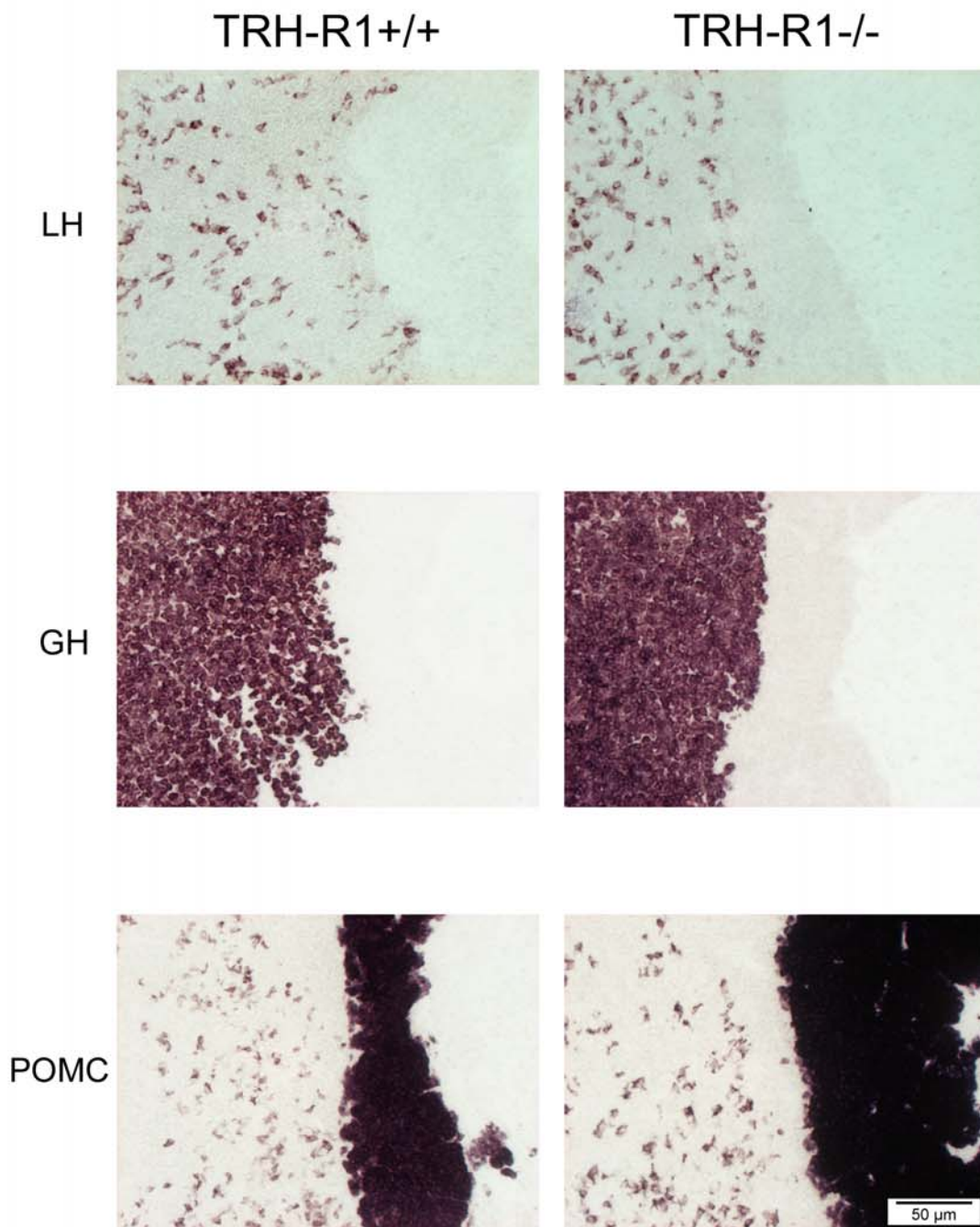


Abbildung 10: DIG-*in situ* Hybridisierung auf wildtyp- und TRH-R1-defizienten Hypophysen: Detailaufnahme der Signale für LH (oberes Bild, Hellfeld (HF)), GH (mittleres Bild, HF) und POMC (unteres Bild, HF). Das Hybridisierungssignal für FSH entspricht hinsichtlich der Intensität und Verteilung dem LH-Signal. Bei keiner dieser Hormon-produzierenden Zellen konnte ein Unterschied zwischen der wildtyp- (links) oder der Knockout-Expression (rechts) festgestellt werden.

3.3.6 Lactotrope Zellen

Bei den Prolactin-produzierenden, lactotropen Zellen war in den Knockout-Mäusen beiderlei Geschlechts acht Wochen nach der Geburt eine deutliche Reduktion der Anzahl festzustellen (Abb. 11, unten). Die Expressionstärke schien dagegen nicht beeinflusst zu sein. Heterozygote Tiere zeigten ein unverändertes, wildtyp-artiges Expressionsmuster. Um einen Eindruck über langfristige Auswirkungen zu erhalten, wurden exemplarisch Hypophysen aus zwei ein- und einhalbjährigen Maus-Böcken, einem homozygoten und einem wildtyp-Tier, präpariert und analysiert. Erneut konnte weder für die somatotropen, noch für die gonado- oder corticotropen Zellen ein Unterschied festgestellt werden. Bei den lactotropen Zellen hingegen war eine deutliche Reduktion, sowohl der Anzahl als auch der Expressionstärke, feststellbar. Ob es sich hierbei um das Resultat einer allgemeinen, progressiven Abnahme der Prolactin-produzierenden Zellen in TRH-R1-defizienten Mäusen handelte, muss in weiteren Experimenten bestätigt werden.

Um die Auswirkung der Laktation auf die lactotropen Zellen zu untersuchen, wurden jeweils zwei Hypophysen aus laktierenden wildtyp- und TRH-R1-KO-Mäusen präpariert und analysiert. Weder die Anzahl der Zellen, noch die Stärke der Prolactin-Expression war unterscheidbar (nicht gezeigt).

3.3.7 Thyrotrope Zellen

Von besonderem Interesse war das Erscheinungsbild der TSH-produzierenden, thyotropen Zellen. Hier konnte bereits nach acht Wochen eine deutliche, fünf- bis zehnfache Reduktion der Zellzahl detektiert werden (Abb. 11, oben). Eine Reduktion der TSH-Expressionsstärke war dagegen nicht festzustellen.

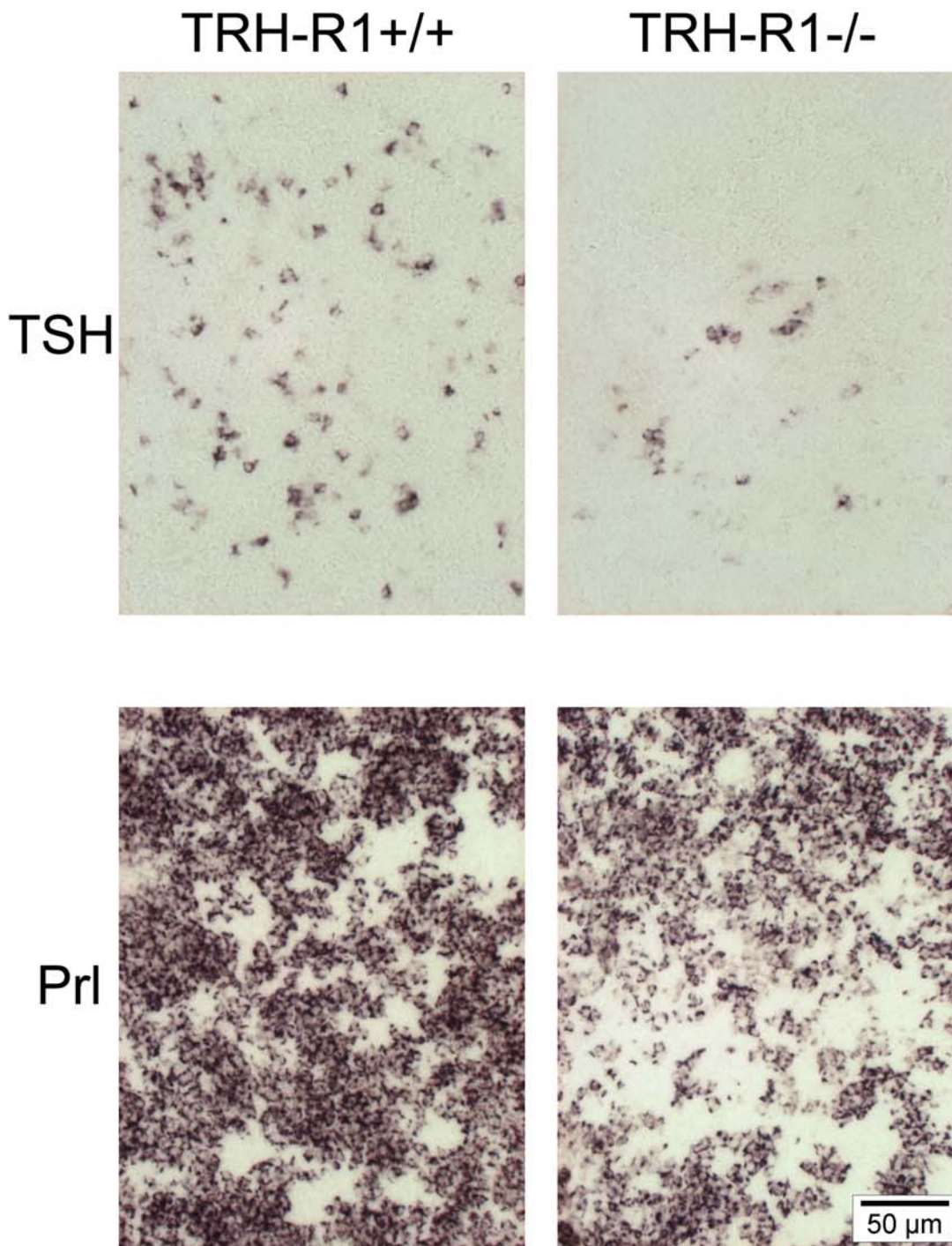


Abbildung 11: DIG-in situ Hybridisierung mit TSH- und Prl-Sonden: Detailaufnahme der Signale für TSH (oberes Bild, Hellfeld (HF)) und Prolactin (unteres Bild, HF) auf Schnitten von wildtyp- (links) bzw. Knockout-Hypophysen acht Wochen nach der Geburt. Es ist eine dramatische, fünf- bis zehnfache Reduktion der Thyrotropen detektierbar. Gleichzeitig nimmt auch die Anzahl der lactotropen Zellen deutlich ab.

3.3.8 LacZ-Expression in der Hypophyse

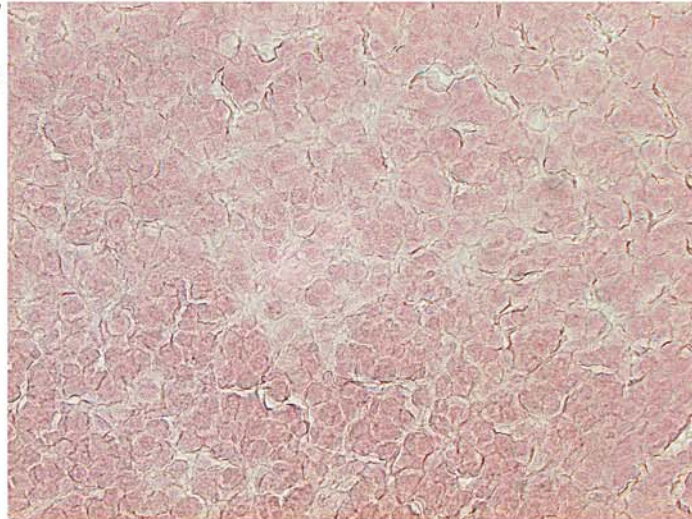
Um zu überprüfen, ob die beobachtete Reduktion der thyrotropen Zellen auch mit Hilfe der TRH-R1-Promotor kontrollierten *lacZ*-Expression nachzuvollziehen war, wurden hypophysäre Schnitte von wildtyp-Mäusen sowie heterozygoten und homozygoten Knockout-Mäusen einer β -Galactosidase-Färbung unterzogen (Abb. 12). Verwendet wurden 10 Wochen alte männliche Tiere mit einem NMRI-genomischen Hintergrund.

In keiner der analysierten wildtyp-Hypophysen konnte ein Färbesignal detektiert werden.

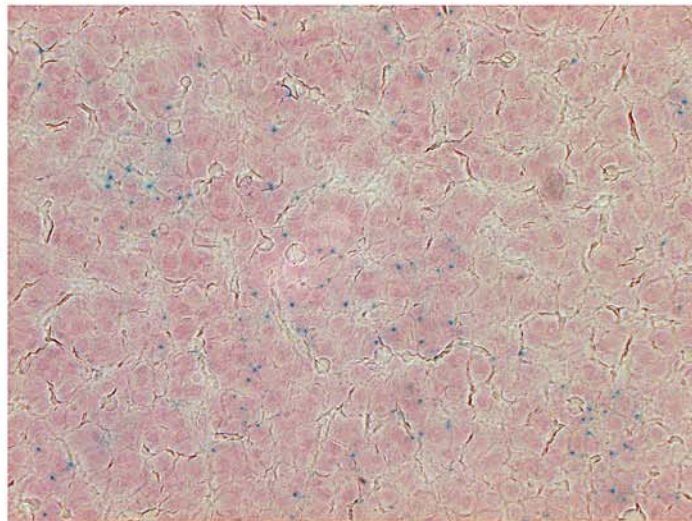
Dagegen konnte sowohl in heterozygoten als auch in homozygoten Knockout-Tieren eine Vorderlappen-spezifische Expression beobachtet werden. Die Anzahl der *lacZ*-exprimierenden Zellen war in den homozygoten Mäusen wiederum deutlich reduziert. Zusätzlich ließ sich in Hypophysen homozygoter Tiere eine veränderte Morphologie feststellen. Wie es auf Abbildung 12 (unten) deutlich erkennbar ist, kam es in diesen Tieren zu einer Vermehrung von Strukturen, die durch die *Nuclear Fast Red*-Gegenfärbung nicht anfärbbar waren.

LacZ in der
Hypophyse

TRH-R1+/+



TRH-R1+/-



TRH-R1/-

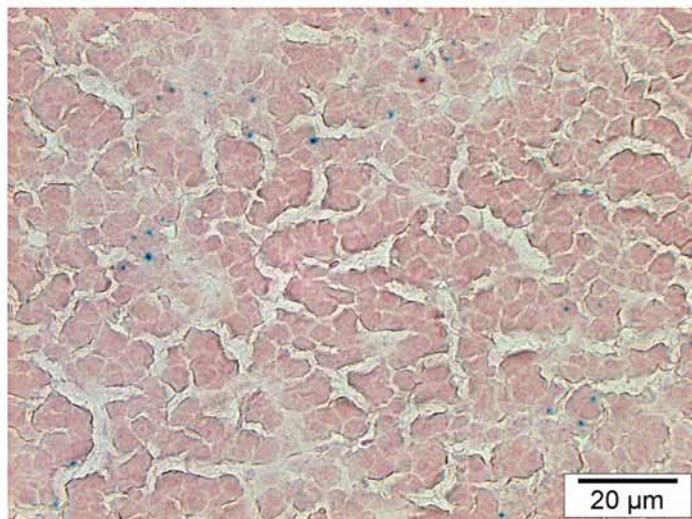


Abbildung 12: Lac-Z-Expression in der Hypophyse: Dargestellt ist eine 40-fache Vergrößerung lacZ-gefärbter hypophysärer Schnitte aller drei Genotypen. In der Wildtyp-Hypophyse (oberes Bild) sind keine Signale nachweisbar. Dagegen sind sowohl in der heterozygoten (mittleres Bild) als auch der homozygoten Hypophyse (unteres Bild) Cluster-artig gehäuft auftretende Zellen mit lacZ-Expression detektierbar. Im Vergleich zum heterozygoten Tier ist die Anzahl der lacZ-positiven Zellen deutlich reduziert. Gleichzeitig lässt sich in der homozygoten Hypophyse eine Zunahme von Strukturen erkennen, die nicht durch *Nuclear Fast Red* (rote Gegenfärbung) anfärbbar sind.

3.3.9 TRH-Bindung in Maus-Hypophysen

Um zu analysieren, ob es in der Hypophyse der Maus weitere Rezeptoren gibt, die in der Lage sind, TRH zu binden, wurde in Membranpräparationen aus homogenisierten Hypophysen ein [³H]MeTRH-Bindungsassay durchgeführt. Hierzu wurden pro Wert jeweils fünf Hypophysen des entsprechenden Genotyps gepoolt und aufgearbeitet (Abb. 13).

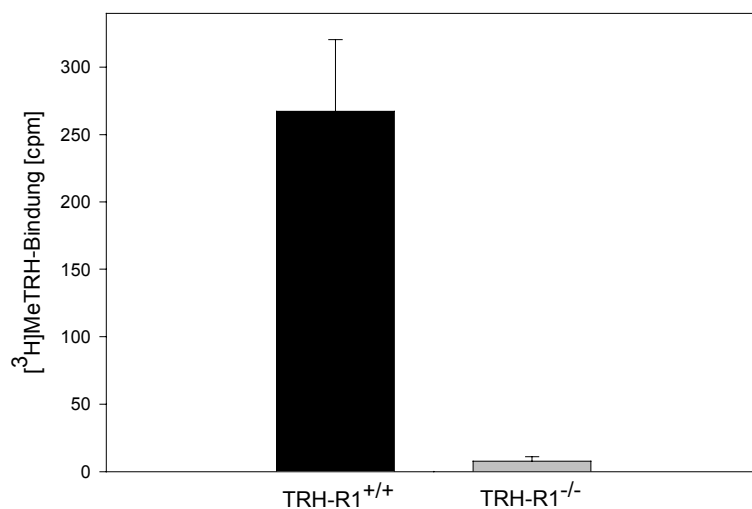


Abbildung 13: TRH-Bindung durch hypophysäre Membranen. Adenohypophysäre Membranpräparationen wurden für vier Stunden, bei 4 °C mit [³H]MeTRH inkubiert. Unspezifische Bindung wurde durch Zusatz von nicht markiertem TRH (final 100 μM) analysiert. Sechs Wildtyp-Pools und drei Knockout-Pools mit jeweils fünf bis sechs Adenohypophysen wurden untersucht. Die Balken repräsentieren Mittelwerte ± SEM.

Im Gegensatz zu wildtyp-Membranpräparation konnte in Membranen von homozygoten Knockout-Mäusen keine TRH-Bindung mehr detektiert werden.

3.3.10 TRH-Induktionsexperimente

Um zu überprüfen, ob hypophysäre Zellen TRH-R1-defizienter Mäuse in der Lage sind, auf einen TRH-Stimulus zu reagieren, wurde in Hypophysenzell-Kultur bzw. in Hypophysenhälften die TSH bzw. Prolactin-Sekretion nach TRH-Induktion untersucht. Für die Hypophysenzell-Kultur wurden 30 knockout- und 30 wildtyp-Hypophysen (davon jeweils 15 männliche und 15 weibliche) verwendet. Die Tiere hatten einen NMRI-genomischen Hintergrund und waren zwischen 10 und 15 Wochen alt.

Für die Hypophysenhälften-Kultur wurden drei männliche Knockout Mäuse, fünf männliche wildtyp-Mäuse und drei weibliche, laktierende wildtyp-Mäuse verwendet. Alle Tiere waren 13 bis 15 Wochen alt und hatten einen NMRI-genomischen Hintergrund.

Induktion der TSH-Sekretion

Im Überstand von wildtyp-Hypophysenzellen war bereits zwei Stunden nach Beginn der TRH-Stimulation eine geringe, nach 24 Stunden eine statistisch signifikante, etwa dreieinhalbfache Induktion der TSH-Sekretion festzustellen (Abb 14, oben). Im Vergleich dazu war bei den TRH-R1-Knockout-Zellen eine vier- bis fünffache Reduktion der basalen TSH-Sekretion zu beobachten. Eine Zunahme der TSH-Sekretion durch TRH-Induktion war dagegen nicht zu detektieren. Die Zugabe von Kaliumchlorid in das Medium zur Entleerung der intrazellulären TSH-Speicher zeigte zudem, dass in TRH-stimulierten wildtyp-Hypophysenzellen eine Erhöhung der Gesamtmenge an gespeichertem Hormon festgestellt werden kann. Dagegen ließ sich in knockout-Hypophysenzellen kein Unterschied zwischen TRH-exponierten und -nicht exponierten Zellen beobachten.

Um zu überprüfen, ob das Vorhandensein eines intakten hypophysären Gewebeverbands Auswirkungen auf die TRH-stimulierte TSH-Sekretion hat, wurde das Experiment in einer Hypophysenhälften-Kultur wiederholt. Auch in diesem Kultursystem zeigte sich in intakten wildtyp-Hypophysenhälften von männlichen NMRI-Mäusen eine statistisch signifikante Induktion der TSH-Sekretion. Wiederum konnte in TRH-R1-defizienten Hypophysen kein TRH-Effekt auf die TSH-Sekretion festgestellt werden (nicht gezeigt).

Induktion der Prl-Sekretion

Ein Vergleich der Prolactin-Sekretion in wildtyp-Hypophysenzellen und homozygot TRH-R1-defizienten Hypophysenzellen (Abb. 14, u.) zeigte eine statistisch signifikante Reduktion der basalen Sekretion auf etwa 65 % des wildtyp-Wertes. Weder in TRH-R1-defizienten noch in wildtyp-Zellen konnte die Prolactin-Sekretion durch Zugabe von TRH gesteigert werden.

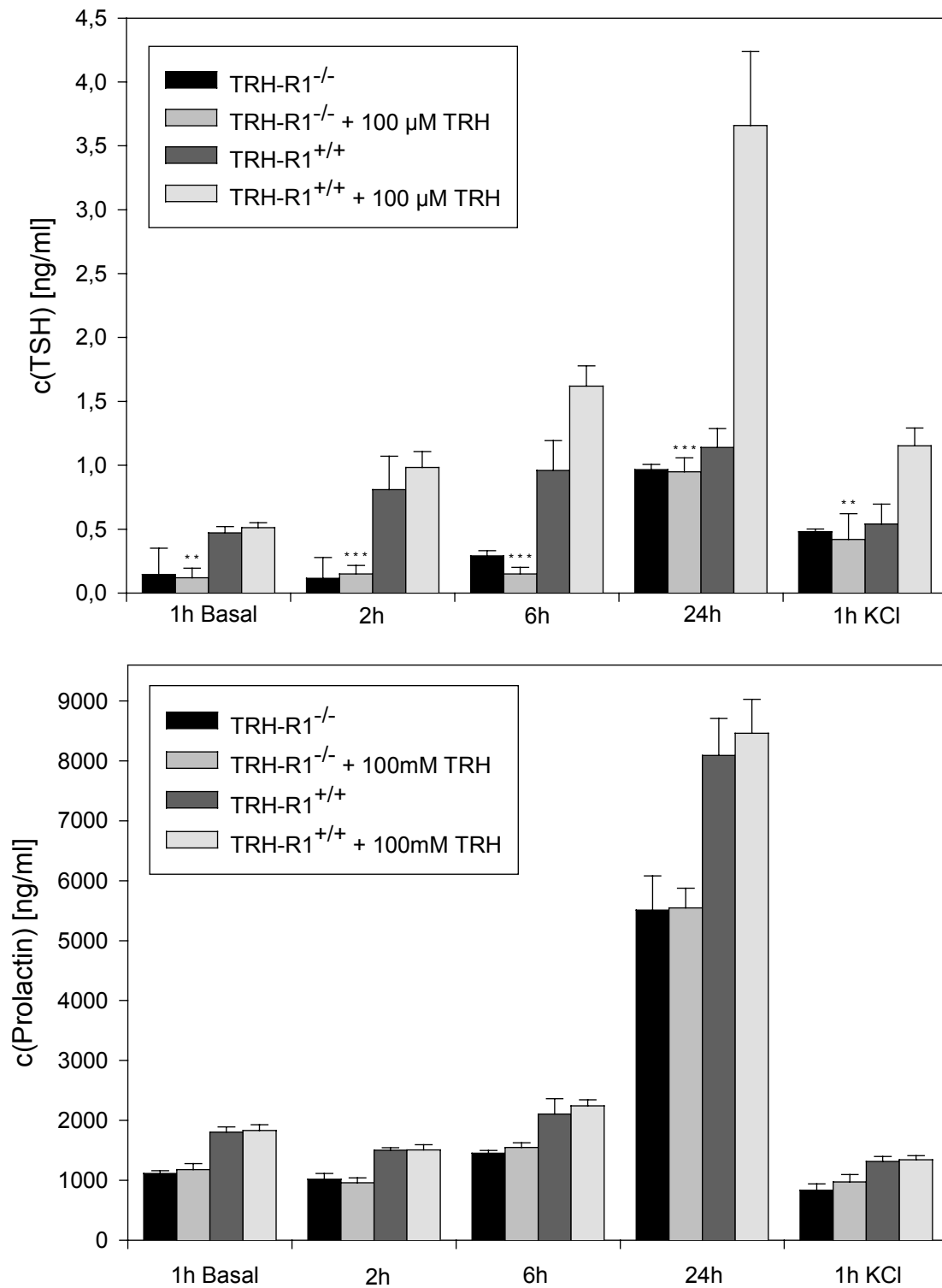


Abbildung 14: TRH-induzierte TSH- und Prolactin-Sekretion in Maus-Hypophysenzell-Kultur: Nach einstündiger Vorinkubation in Serum-freiem Medium (Basal) wurden die wildtyp- bzw. TRH-R1-defizienten Hypophysenzellen für die dargestellten Zeitperioden in Serum-freiem Medium mit/ohne Zusatz von final 100 μM nicht markiertem TRH inkubiert. Anschließend wurde das Medium jeweils abgenommen, bei -20 °C eingefroren und durch neues Medium ersetzt. Um die Hormonspeicher zu entleeren, wurde im Anschluss an die Induktionsversuche für eine Stunde 55 mM KCl hinzugegeben. Die jeweiligen Balken entsprechen den Mittelwerten ± SEM. **, P < 0,01; ***, P < 0,001 vs. Wildtyp.

Um zu untersuchen, ob die TRH-Responsivität von einem intakten Zell-Verband abhängig ist, wurde das Induktionsexperiment in Hypophysen-Hälften wiederholt (in denen bereits eine TRH-induzierte Stimulation der TSH-Sekretion gezeigt werden konnte). Verwendet wurden hierfür zum einen Hypophysen von männlichen, zum anderen von weiblichen, laktierenden Mäusen (Abb. 15).

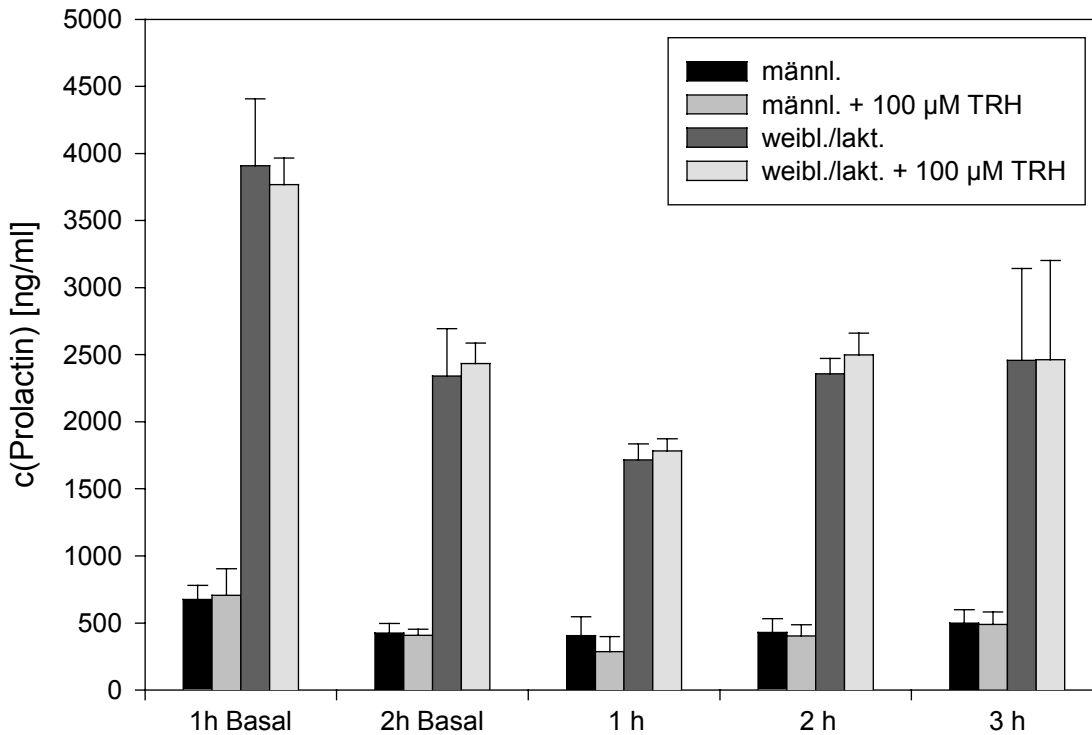


Abbildung 15: TRH-induzierte Prolactin-Sekretion in Maus-Hypophysenhälften: Nach zweimaliger Vorinkubation in Serum-freiem Medium (Basal) wurden die männlichen bzw. weiblichen Hypophysenhälften für die angegebenen Zeitperioden in Serum-freiem Medium mit/ohne Zusatz von final 100 µM TRH inkubiert. Anschließend wurde jeweils das Medium abgenommen und durch Neues ersetzt. Um die Hormon-Speicher zu entleeren, wurde für eine Stunde 55mM KCl hinzugegeben. Die Balken repräsentieren Mittelwerte ± SEM. lakt., laktierend.

Zwar wurde im Vergleich zu männlichen Mäusen eine drastische Zunahme der basalen Prolactin-Sekretion in Hypophysen aus laktierenden Mäusen festgestellt. Jedoch konnte auch in intakten Hypophysenhälften keine TRH-induzierte Stimulation der Prolactin-Sekretion beobachtet werden.

3.3.11 Hormon-TRH-R1-Kolokalisierung

Um einen Anhaltspunkt auf die Verteilung und Expressionstärke der TRH-Rezeptor 1 mRNA in der Adenohypophyse der Maus zu bekommen, wurde zunächst eine *in situ*-Hybridisierung mit der TRH-R1 cRNA-Sonde durchgeführt. Im Gegensatz zu einer Kontroll-Hybridisierung auf Ratten-Schnitten, auf denen im Bereich der Adenohypophyse eine gleichmäßige Verteilung starker Signale beobachtet wurde, zeigten sich in der Maus vereinzelte, starke Signale (nicht gezeigt). Diese waren nicht gleichmäßig in der Adenohypophyse verteilt, sondern traten in Clustern auf, die vor allem im zentralen Bereich des Vorderlappes gefunden wurden. Ein Vergleich mit der Lokalisation hormonproduzierender Zellen auf benachbarten Schnitten derselben Hypophyse zeigte, dass die beobachtete Verteilung der TRH-R1 mRNA gut mit der Verteilung TSH-positiver, thyrotroper Zellen korrelierte. Dagegen waren Prolactin-positive, lactotrope Zellen deutlich häufiger und in einer gleichmäßigeren Verteilung zu detektieren, die auch die Randbereiche der Hypophyse umfasste.

Doppel-*in situ*-Hybridisierung:

Um die TRH-R1-exprimierenden Zellen direkt zu identifizieren, wurde eine Doppel-*in situ*-Analyse des Rezeptors mit den jeweiligen hormonproduzierenden Zellen durchgeführt.

Hierbei ließ sich TRH-Rezeptor 1 mRNA weder in corticotropen (POMC) noch in gonadotropen (FSH und LH) lokalisieren.

Eine Analyse der Doppel-*in situ*-Hybridisierung mit TRH-R1 und GH (somatotrope Zellen) ergab für den weitaus größten Teil der Wachstumshormon-produzierenden Hypophysenzellen keine überlappende Expression (Abb. 16). Dennoch konnte in einer kleinen Subpopulation schwach GH-exprimierender Zellen (weniger als 1 %) auch eine schwache Rezeptor-Expression beobachtet werden.

Ein identisches Bild ergab sich bei den lactotropen Zellen (Abb. 17). Während der Großteil der Prolactin-exprimierenden Zellen frei von TRH-R1 mRNA war, konnte auch hier in einer kleinen Subpopulation eine schwache Rezeptorexpression detektiert werden.

Die mit Hilfe der Röntgenfilm-Exposition identifizierten, vereinzelten und Cluster-artig angeordneten Zellen mit hohen Rezeptor 1-Transkriptspiegeln konnten eindeutig als thyrotrope Zellen identifiziert werden (Abb. 18). Alle Zellen mit hoher TRH-R1-Expression zeigten gleichzeitig eine hohe TSH-Expression und umgekehrt.

Daneben war jedoch auf allen Doppel-*in situ*-Schnitten eine schwache bis mittlere TRH-Rezeptor-1-Expression in einer Vielzahl von Zellen nachweisbar, bei denen es sich nicht bzw.

nicht nur um Hormonproduzierende handeln konnte. Die Signale waren auf Zellen detektierbar, die vor allem in den Zwischenräumen der hormonproduzierenden Zellen zu finden waren. So konnte weder zahlenmäßig, noch aufgrund des morphologischen Erscheinungsbildes angenommen werden, dass GH- oder Prolactin-sekretierende einen größeren Anteil dieser schwach TRH-R1-exprimierenden Zellpopulation ausmachen.

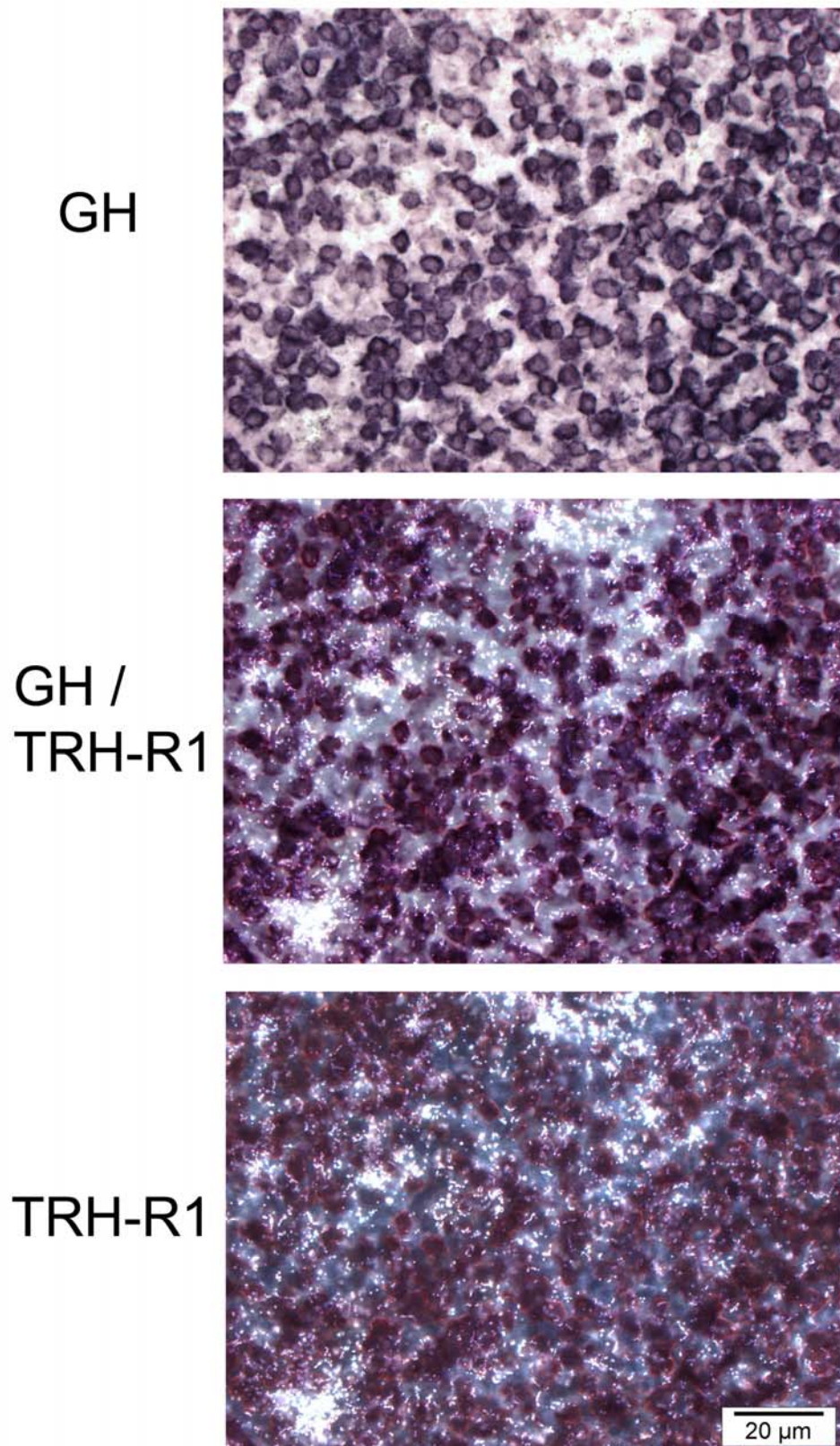
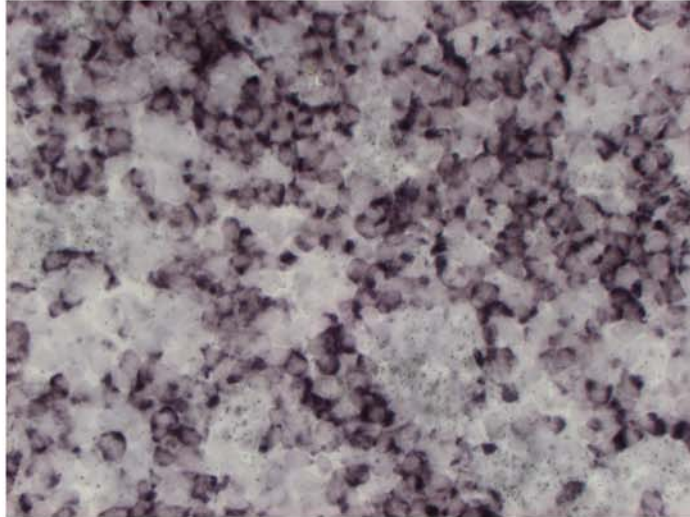
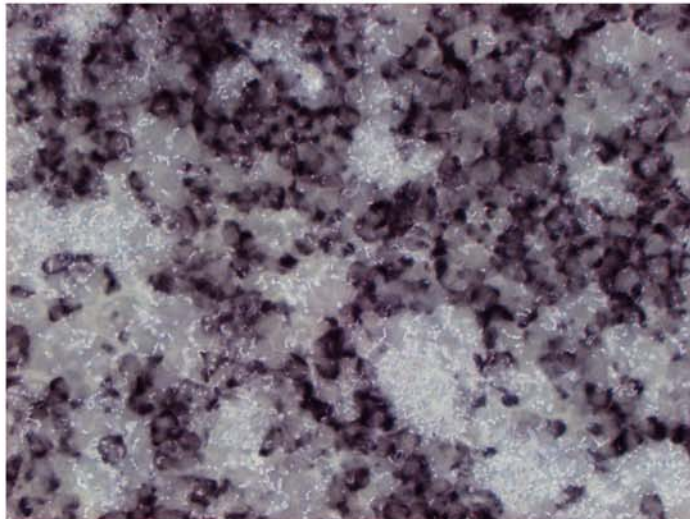


Abbildung 16: TRH-R1/Wachstumshormon (GH)-Doppel-in situ Hybridisierung: Detailaufnahme der Signale für GH (oberes Bild, DIG-ISH, Hellfeld) und TRH-R1 (unteres Bild, radioaktiv markiert, Dunkelfeld). In der Mitte ist eine Überlagerung der beiden Aufnahmen dargestellt. Nahezu alle GH-positiven Zellen sind frei von TRH-R1-Hybridisierungssignalen.

Prl



Prl /
TRH-R1



TRH-R1

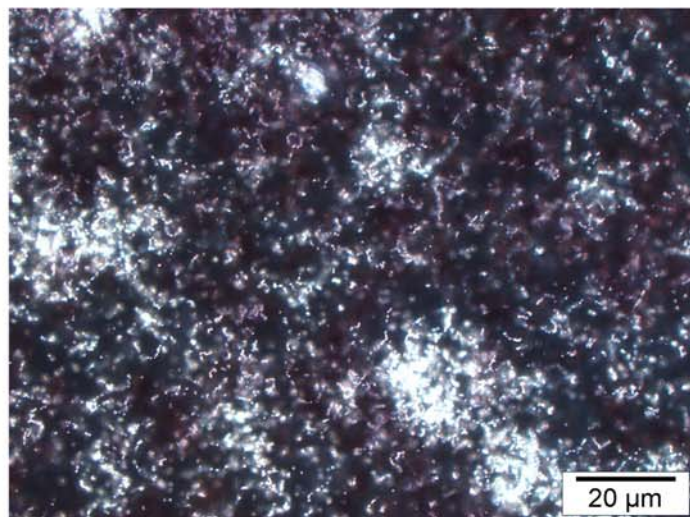


Abbildung 17: TRH-R1/Prolactin-Doppel-in situ Hybridisierung: Detailaufnahme der Signale für Prolactin (oberes Bild, DIG-ISH, Hellfeld) und TRH-R1 (unteres Bild, radioaktiv markiert, Dunkelfeld). In der Mitte ist eine Überlagerung der beiden Aufnahmen dargestellt. Nahezu keine der Prl-positiven Zellen weist ein TRH-R1-Hybridisierungssignal auf.

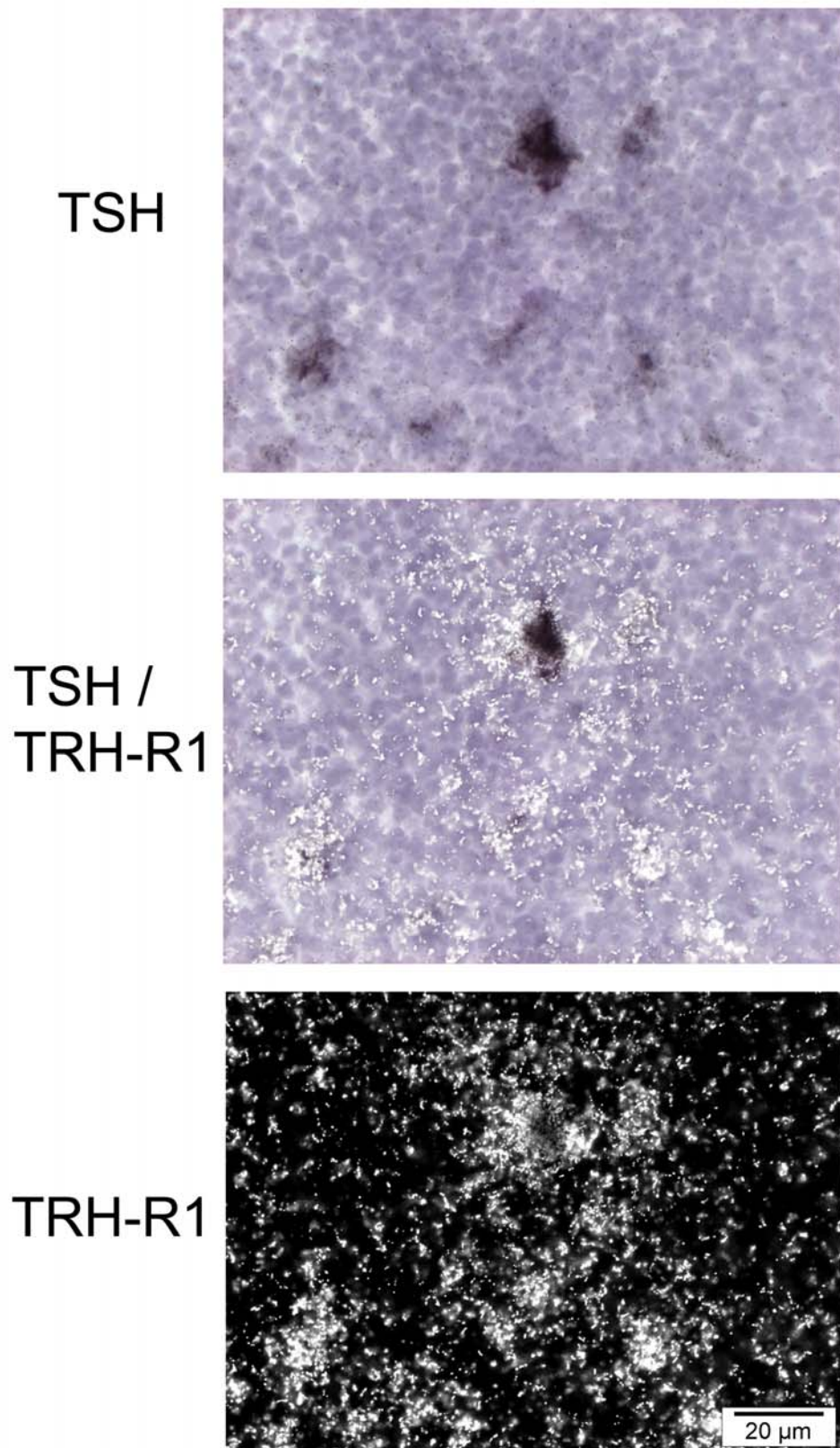


Abbildung 18: TRH-R1/TSH-Doppel-in situ Hybridisierung: Detailaufnahme der Signale für TSH (oberes Bild, DIG-ISH, Hellfeldaufnahme) und TRH-R1 (unteres Bild, radioaktiv markiert, Dunkelfeldaufnahme). In der Mitte ist eine Überlagerung der beiden Aufnahmen dargestellt. Deutlich erkennbar weisen alle TSH-positiven Zellen auch eine starke Rezeptor-Expression auf.

3.4 Ontogenie des TRH-Signalsystems

Um einen Überblick über die Entwicklung des TRH-Signalsystems zu gewinnen, wurde eine *in situ*-Hybridisierungsanalyse durchgeführt. Hierzu wurden Sagittalschnitte bzw. Horizontalschnitte der Embryonalstadien E12,5, E14,5, E16,5 und E18,5 und der Postnatalstadien P0, P3, P14, P21 sowie adulter Mäuse (fünf Wochen bzw. fünf Monate alt) verwendet. Die Hybridisierung erfolgte mit cRNA-Sonden gegen ppTRH, TRH-DE und die TRH-Rezeptoren 1 und 2. Fokussiert war die Analyse auf das erste Auftreten TRH exprimierender Zellen in verschiedenen Bereichen des Embryos und auf das Verteilungsmuster TRH-Rezeptor 1 bzw. 2 exprimierender Zellen im Vergleich zueinander bzw. zum adulten Expressionsmuster.

Tag der Embryonalentwicklung 12,5 (E12,5)

Am Tag 12,5 war eine relativ starke TRH-Expression im Trigeminal-Ganglion sichtbar. Im Bereich des Hypothalamus war nur eine schwache Expression in sehr wenigen Zellen nachweisbar. Im übrigen ZNS wurden kein TRH-Transkripte detektiert.

Auch das TRH-DE war am stärksten im Trigeminal-Ganglion exprimiert. Daneben war eine schwächere Expression im neopallialen Cortex (späterer cerebraler Cortex), im Bereich des Striatums und im Mesencephalon detektierbar. Eine sehr starke Expression war zudem in der Leber zu finden.

TRH-Rezeptor 1 mRNA war in diesem Stadium im Gehirn nicht nachweisbar. Im Rückenmark dagegen war der Rezeptor relativ stark exprimiert, wobei die Signale homogen über alle Schichten vom ventralen bis zum dorsalen Horn verteilt waren.

TRH-Rezeptor-2-Transkripte waren am Tag 12,5 nicht nachweisbar.

Tag der Embryonalentwicklung 14,5 (E14,5)

Am Tag 14,5 war die stärkste Expression von TRH wiederum im Trigeminalganglion zu finden.

Auch TRH-DE war im Trigeminalganglion vorhanden. Daneben ließen sich mittlere mRNA-Konzentrationen im Neopallium und im Bereich des Striatums nachweisen.

TRH-R1 zeigte hohe Expressionswerte in der dorsalen (im Bereich des Hypoglossal nucleus) und ventralen Medulla oblongata, im Hypothalamus und in der Rathke Tasche. Daneben wurde erstmals eine Expression in der medialen Schicht des neopallischen Cortex sichtbar.

TRH-R2 wurde vor allem im medialen Bereich der retikulären Formation der Medulla oblongata exprimiert. Daneben zeigte sich eine schwache Expression im Bereich des Caudatus-putamen (CPu). Der Cortex war hingegen frei von TRH-R2 mRNA.

Tag der Embryonalentwicklung 16,5 (E16,5)

Am Tag 16,5 war die TRH-Expression im Trigeminal-Ganglion vor allem auf Zellen im basalen Teil beschränkt (Abb. 19, oben). Gleichzeitig war eine Abnahme der Signalintensität von lateralen zu medialen Schnittebenen festzustellen. Eine sehr starke Expression war im Bereich des Hypothalamus, v. a. im dorsomedialen und paraventriculären Nucleus zu erkennen. Daneben zeigte sich eine starke Expression in der glomerulären Schicht des olfaktorischen Bulbus (OB), im spinalen Trigeminal-Nucleus (DMSp5) und in der retikulären Formation sowie in vereinzelt Zellen des basalen CPu. Im Cortex war erstmalig eine Expression in der tiefen Subplate-Schicht zu beobachten (Abb. 19, oben). Zusätzlich ließen sich einzelne stark exprimierende Zellen in der Niere nachweisen (Abb. 21). Diese renale Expression konnte in keinem anderen Embryonalstadium gezeigt werden.

TRH-DE wies eine starke Expression in allen corticalen Schichten, im OB (v. a. in der externen plexiformen Schicht), im Thalamus, im Bereich der retikulären Formation und im Trigeminalganglion auf.

TRH-R1 war mit mäßigen Transkriptspiegeln in einer mittleren (Schicht V) und in einer tiefen Schicht (Subplate) des Cortex nachweisbar. Daneben konnten starke Signale im akzessorischen olfaktorischen Bulbus (AOB), im lateralen parabrachialen Nucleus (LPB) und im ventralen Horn des Rückenmarks beobachtet werden.

TRH-R2 mRNA wurde vor allem in thalamischen Kerngebieten und im Bereich der retikulären Formation gefunden. Im Rückenmark zeigte sich eine gleichmäßige Transkriptverteilung vom ventralen Horn bis in den tiefen dorsalen Bereich.

Tag der Embryonalentwicklung 18,5 (E18,5)

Am Tag 18,5 ließ sich eine starke TRH-Expression im olfaktorischen Bulbus, im Hypothalamus, im basalen Bereich des Trigeminalganglions und in den preoptischen Nuclei beobachten. Im basalen Bereich des CPu und in der Subplate des Cortex zeigten Zellen mittlere Expressionsstärken.

TRH-DE war stark im lateralen (LSD) und intermedialen septalen Nucleus (LSI), in der CA2/3-Region des Hippocampus, im Trigeminalganglion sowie im OB exprimiert. Mittlere Signalintensitäten ließen sich im Thalamus, im Cortex und in den Colliculi nachweisen.

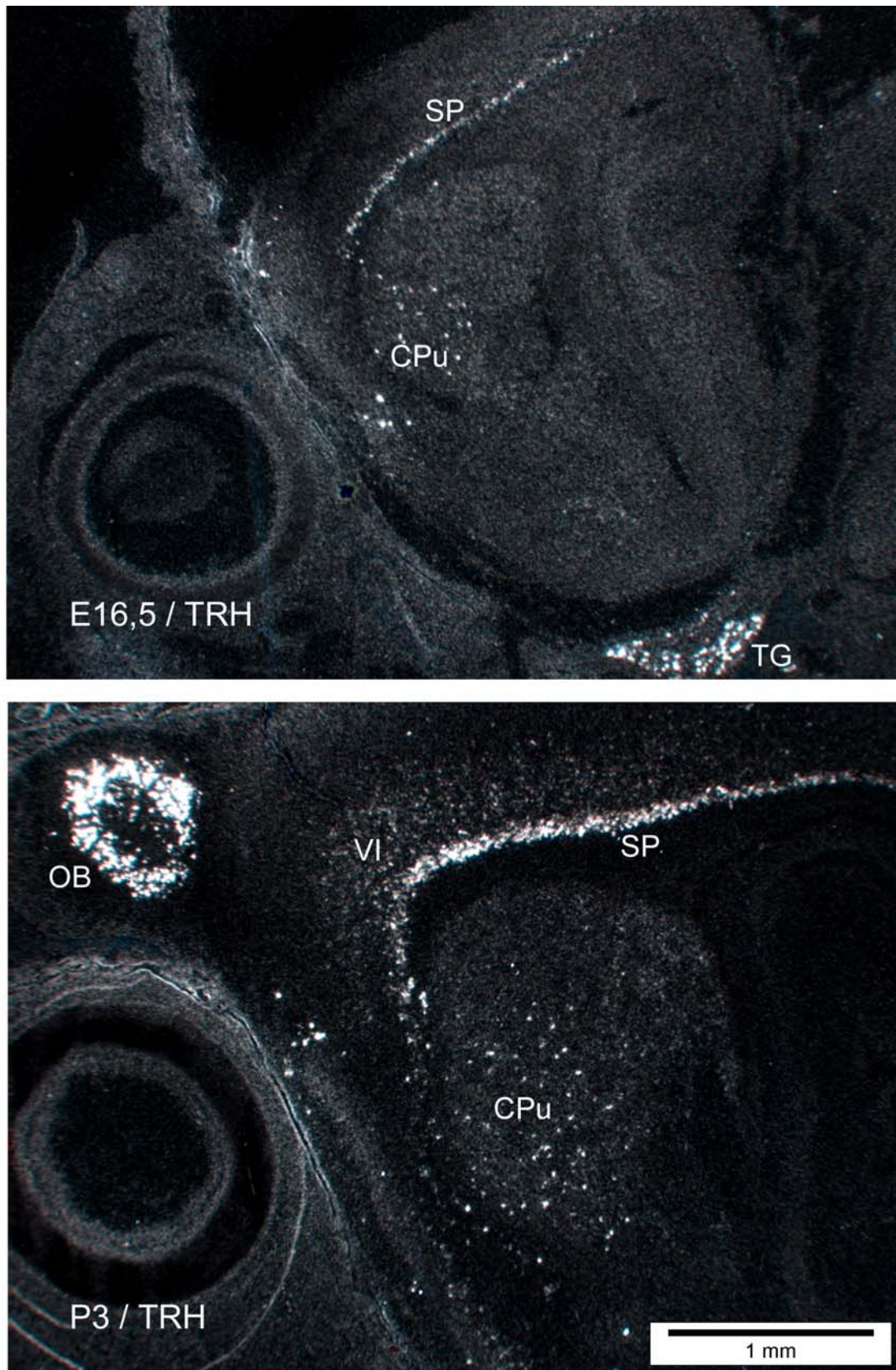


Abbildung 19: Corticale TRH-Expression an den Tagen E16,5 und P3: Im oberen Bild ist das *in situ*-Hybridisierungssignal (Dunkelfeldaufnahme(DF)) der TRH-Expression im Kopfbereich am Emybryonaltag 16,5 dargestellt. Die stärksten Signale lassen sich im basalen Teil des Trigeminal-Ganglions (TG) detektieren. Im cerebralen Cortex ist die Expression auf die Subplate-Schicht (SP) beschränkt. Daneben sind Signale im basalen Teil des Caudatus/Putamen (CPu) und des beginnenden olfaktorischen Bulbus (OB) sichtbar. Am dritten Tag nach der Geburt (unteres Bild, DF) ist neben einer starken Expression in der Subplate-Schicht auch in Zellen der darüberliegenden Schicht VI TRH-mRNA nachweisbar. Sehr stark ist die Expression im OB.

TRH-R1 war stark in der mittleren corticalen Schicht, im anterioren dorsalen preoptischen Nucleus (ADP), im Subiculum (S), im akzessorischen trigeminalen Nucleus (Acs5) und im ventralen Gyrus dentatus (vDG) exprimiert. Im trigeminalen Motor-Nucleus (Mo5), im dorsomedialen periaquäduktalen Grau (DMPAG) sowie im Bereich des oculomotorischen Nucleus (3) ließen sich mittlere Expressionstärken beobachten.

Die TRH-R2-Expression war dagegen auf verschiedene Thalamus-Kerngebiete, auf den lateralen Bereich des superfiziellen Grau des superioren Colliculus (SuG), auf den Motor-Nucleus des Trigemini (Mo5) sowie den tiefen mesencephalen Nucleus (DpMe) beschränkt. In den Schichten des cerebralen Cortex war keine TRH-R2 mRNA nachweisbar.

Tag der Geburt (P0)

Die TRH-Expression am Tag P0 stimmte in den meisten Bereichen mit der adulten Expression überein. Eine starke Expression ließ sich im olfaktorischen Bulbus, in den preoptischen Nuclei und in verschiedenen Hypothalamus-Kerngebieten nachweisen. Auch im dorsalen Motor-Nucleus des Vagus und im Raphe obscurus und magnus konnten hohe Signalintensitäten gezeigt werden. Stark exprimierende Zellen im Trigeminalganglion waren erneut auf basale Bereiche beschränkt. Die Expression im retikulären thalamischen Nucleus war deutlich nachweisbar, hatte aber noch nicht die adulte Signalintensität. Mittlere Expressionsstärken wurden in der Subplate des Cortex, in vereinzelt Zellen im basalen Bereich des CPU und im inneren Teil der Lamina glomerulosa (Lamina II) der rostralen Medulla oblongata detektiert.

TRH-DE war stark im olfaktorischen Bulbus, im Bereich des Septums/lateralen Septums, im Cortex und in der CA2/3-Schicht des Hippocampus exprimiert. Auch in bestimmten thalamischen Kerngebieten (ventraler posteriorer thalamischer Nucleus (VPM/L), dorsolateraler Genuculat-Nucleus (DLG)) sowie im Nucleus der Habenulae und im medialen amygdaloiden Nucleus konnten hohe Signalintensitäten beobachtet werden.

TRH-R1 zeigte hohe Expressionswerte im AOB, im Subiculum und im ventralen Gyrus dentatus des Hippocampus, im medialen amygdaloiden Nucleus und im Bereich des paraventriculären hypothalamischen Nucleus (PVN). Im Hirnstamm und verlängerten Mark konnten hohe Transkriptspiegel im Motor-Nucleus des Trigemini (Mo5) und im hypoglossalen Nucleus (12) gefunden werden. Mittelstark exprimierende Zellen ließen sich im Cortex in einer mittleren Schicht und vereinzelt in der tiefen Subplate-Schicht detektieren. Auch im dorsalen Bereich des periaquäduktalen Grau (DMPAG) sowie im paraventriculären thalamischen Nucleus (PV) konnten mittlere Expressionswerte beobachtet werden. Im

Rückenmark wurden mittel bis stark exprimierende Zellen im äußeren Teil der Lamina glomerulosa sichtbar.

Die TRH-R2-Expression war vor allem auf thalamische Kerngebiete beschränkt. Die höchsten Konzentrationen fanden sich im lateralen posterioren thalamischen Nucleus und im subthalamischen Nucleus (STh). Im Rückenmark waren Zellen mit mittleren Transkriptspiegeln gleichmäßig vom ventralen Horn bis zu tiefen dorsalen Schichten verteilt. Im Cortex war TRH-Rezeptor 2 nicht nachweisbar.

Postnataltag 3 (P3)

Am Tag P3 wurde eine starke TRH-Expression im olfaktorischen Bulbus (OB), in hypothalamischen Kerngebieten und in der Subplate-Schicht des Cortex gefunden. Im Rückenmark konnten in der inneren Lamina II (Lamina glomerulosa) Zellen mit mittlerer bis starker TRH-Expression identifiziert werden (Abb. 20, links). Auch im spinalen Trigeminal-Nucleus waren hohe Intensitäten sichtbar. Mittlere mRNA-Konzentrationen ließen sich im retikulären thalamischen Nucleus, in den preoptischen Nuclei, in vereinzelt Zellen im CPu und im Bereich der inferioren Olive nachweisen. Im frontalen Bereich des Cortex war erstmalig auch eine TRH-Expression in höheren Schichten (Schicht VI A und B) nachweisbar (Abb. 19, unten).

TRH-DE war stark im OB, im Thalamus, in der CA2/3-Schicht und im Subiculum des Hippocampus sowie im Cortex exprimiert. Die höchsten Konzentrationen ließen sich hierbei im entorhinalen Cortex finden. Im übrigen Cortex war die Expression in mittleren Schichten am stärksten. Daneben zeigten sich hohe Expressionswerte im gesamten Bereich der Medulla oblongata und im Rückenmark.

TRH-R1 zeigte die stärkste Expression im entorhinalen Cortex, im Subiculum und ventralen Gyrus dentatus des Hippocampus sowie in der amygdalo-hippocampalen Übergangszone. Im frontalen Cortex waren die Signale vor allem auf Schicht V, die Schicht oberhalb der TRH-exprimierenden Zellen, beschränkt. Dagegen waren in der tiefen Subplate-Schicht nur vereinzelt Zellen mit mittleren Transkriptspiegeln zu beobachten. Im Rückenmark ließ sich eine starke TRH-R1-Expression in tiefen α -Motoneuronen zeigen. Im dorsalen Horn des Rückenmarks war die Expression auf Zellen in der äußeren Schicht der Lamina II beschränkt (Abb. 20, rechts)

TRH-R2 mRNA war in hohen Konzentrationen in thalamischen Kerngebieten, im Subiculum des Hippocampus und in weiten Teilen des Mesencephalons detektierbar. Auch in der Medulla oblongata und der Pons sowie im ventralen und tiefen dorsalen Horn des

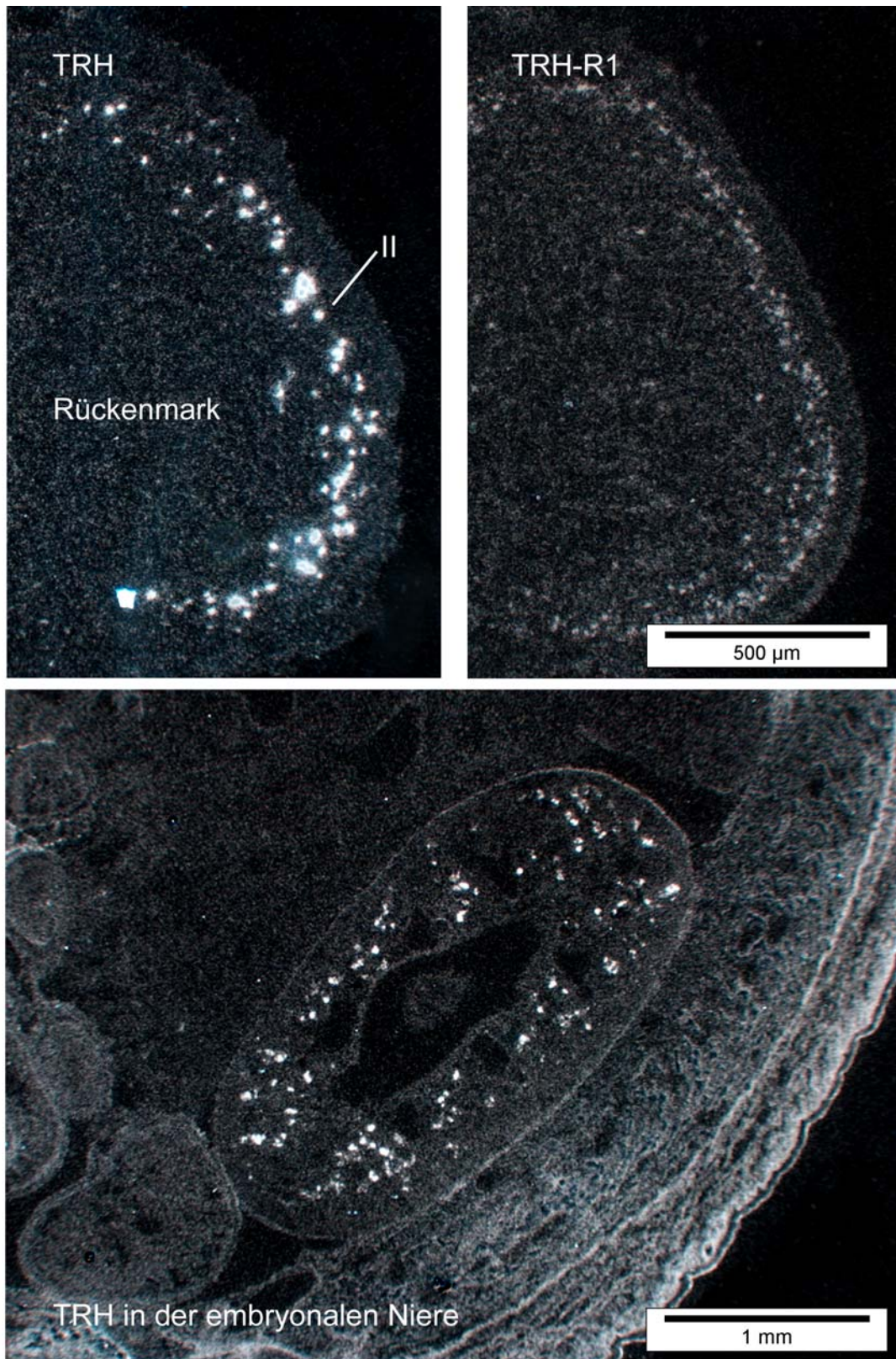


Abbildung 20: TRH und TRH-R1 im Rückenmark: Im Bild oben rechts ist die TRH-R1 *in situ* Hybridisierung auf einem sagittalen Schnitt im Bereich des Rückenmarks abgebildet. Schwache bis mittlere Transkriptspiegel können vor allem in der äußeren Schicht der Lamina II (L. glomerulosa) detektiert werden. Die TRH-Expression in diesem Bereich (links) ist dagegen vor allem auf die inneren Schicht der Lamina II beschränkt.

Abbildung 21: TRH-Expression in der embryonalen Niere: Am Embryonaltag 16,5 sind in der Niere Zellen mit mittlerer bis starker TRH-Expression detektiert. In allen anderen Stadien ist die Niere frei von Signalen.

Rückenmarks konnten hohe Expressionswerte gezeigt werden. Im Cortex war nur im retrosplenialen Bereich Rezeptor 2 nachweisbar.

Postnataltag 14 (P14)

Zwei Wochen nach der Geburt entsprachen das Verteilungsmuster und die Konzentration der TRH-mRNA (Übersicht: Abb. 22, oben) weitestgehend denen der adulten Maus. Die Signalintensität im retikulären thalamischen Nucleus hatte annähernd adulte Expressionsstärke erreicht. Im Cortex war eine starke Expression in der Subplate-Schicht zu beobachten. Daneben ließen sich, vor allem in frontalen corticalen Bereichen, mittelstark TRH-exprimierende Zellen in den Schichten VIA und B nachweisen.

Auch die Expression des TRH-DE (Übersicht: Abb. 22, unten) glich dem adulten Bild. Eine starke Expression war in der CA2/3-Schicht und im Subiculum des Hippocampus sowie in den Schichten III bis VI des cerebralen Cortex zu detektieren, wobei die cerebrale Expression die höchsten Werte im Cingulat-Cortex erreichte. Auch in verschiedenen Thalamus-Kerngebieten waren hohe Intensitäten zu beobachten.

Die TRH-R1 mRNA zeigte ebenfalls das adulte Verteilungsmuster (Übersicht: Abb. 23, oben). Höchste Konzentrationen ließen sich in den Schichten V und VI des cerebralen Cortex, in der Rinde des Nucleus accumbens (AcbSh), im Subiculum und im ventralen Gyrus dentatus des Hippocampus sowie in der amygdalo-hippocampalen Übergangszone nachweisen. Im Bereich des Thalamus war die Verbreitung des Rezeptor 1 auf den paraventriculären thalamischen Nucleus (PV) und den Reunion-Nucleus beschränkt. Im Rückenmark war eine Lokalisation in tiefen α -Motoneuronen und in der äußeren Schicht der Lamina II festzustellen.

TRH-R2-Transkripte wurden vorwiegend in thalamischen Kerngebieten gefunden. Daneben ließ sich im Cortex eine Expression in der Subplate-Schicht und in einem schmalen Streifen im Bereich zwischen Schicht V und VI nachweisen. Rezeptor 2 mRNA zeigte zudem eine gleichmäßige Verteilung im posterioren Colliculus und im ventralen bis tiefen dorsalen Rückenmark (Übersicht: Abb. 23, unten).

Postnataltag 21 (P21)

Nach drei Wochen zeigten alle Komponenten des TRH-Signalsystems das adulte Verteilungsmuster. Für die Expression des TRH-R2 im Cortex bedeutete dies, dass die Rezeptor-Signale bei mittlerer Intensität eine gleichmäßige Verteilung in den Schichten V und VIA/B aufwiesen.

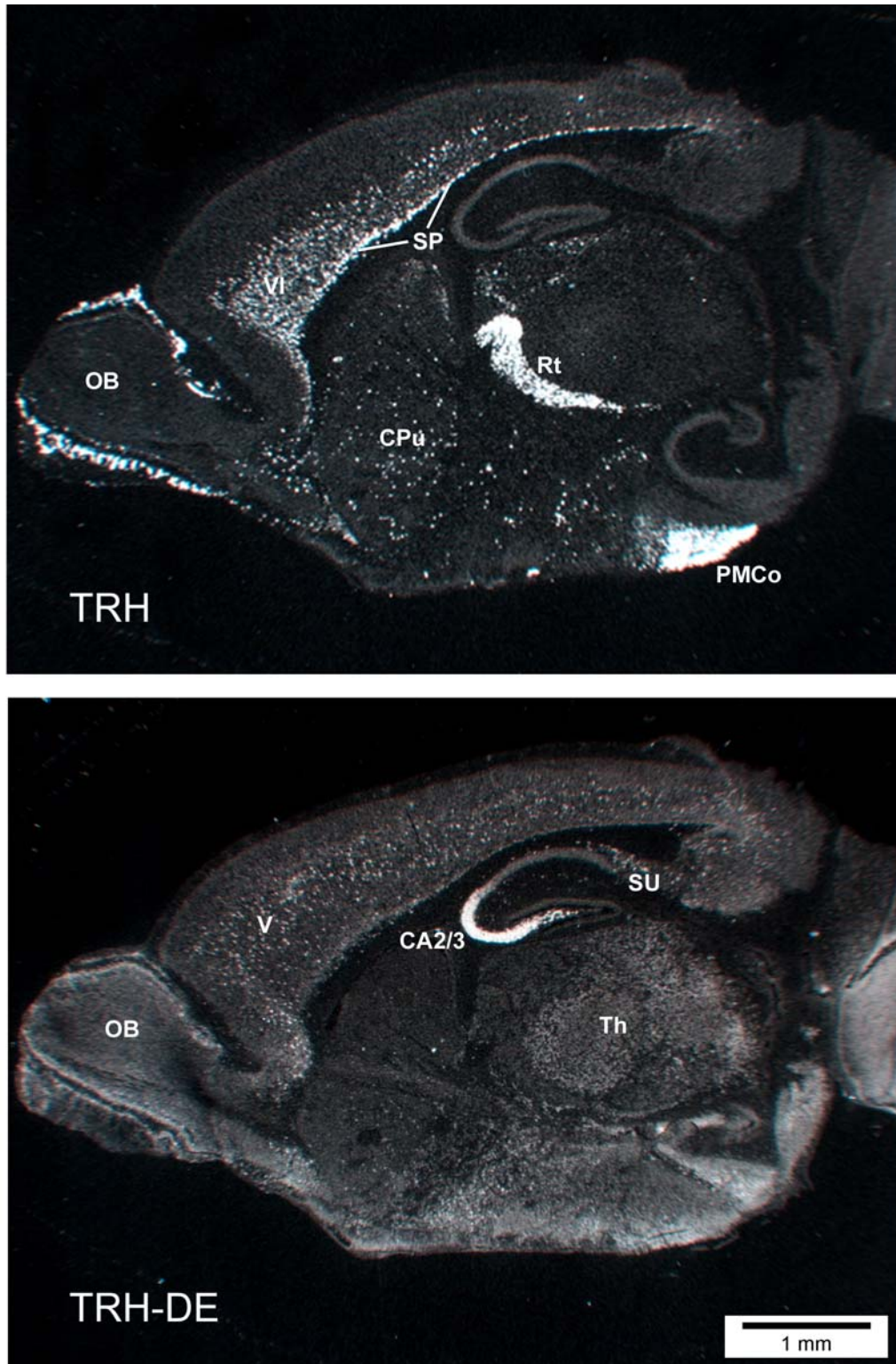


Abbildung 22: Expression des ppTRH und des TRH-DE in der zwei Wochen alten Maus: Dargestellt sind Dunkelfeldaufnahmen der *in situ*-Hybridisierung auf sagittalen Schnitten. TRH (oben) zeigt eine starke Expression in der Subplate (SP) und eine mittlere Expression in Schicht VI A/B des cerebralen Cortex. Starke Signale können auch in der glomerulären Schicht des olfaktorischen Bulbus (OB) und im retikulären thalamischen Nucleus (Rt) beobachtet werden. Im ventralen Bereich ist die Expression im amygdalo-hippocampalen Übergangsbereich (PMCo, posteromedialer corticaler Nucleus) am stärksten. TRH-DE ist dagegen stärker in der höheren corticalen Schicht V exprimiert. Die stärkste Expression kann in den hippocampalen Schichten CA2 und CA3 detektiert werden. Eine mittlere im OB, im Thalamus (Th) und in der amygdalo-hippocampalen Übergangszone bzw. im umgebenden Bereich.

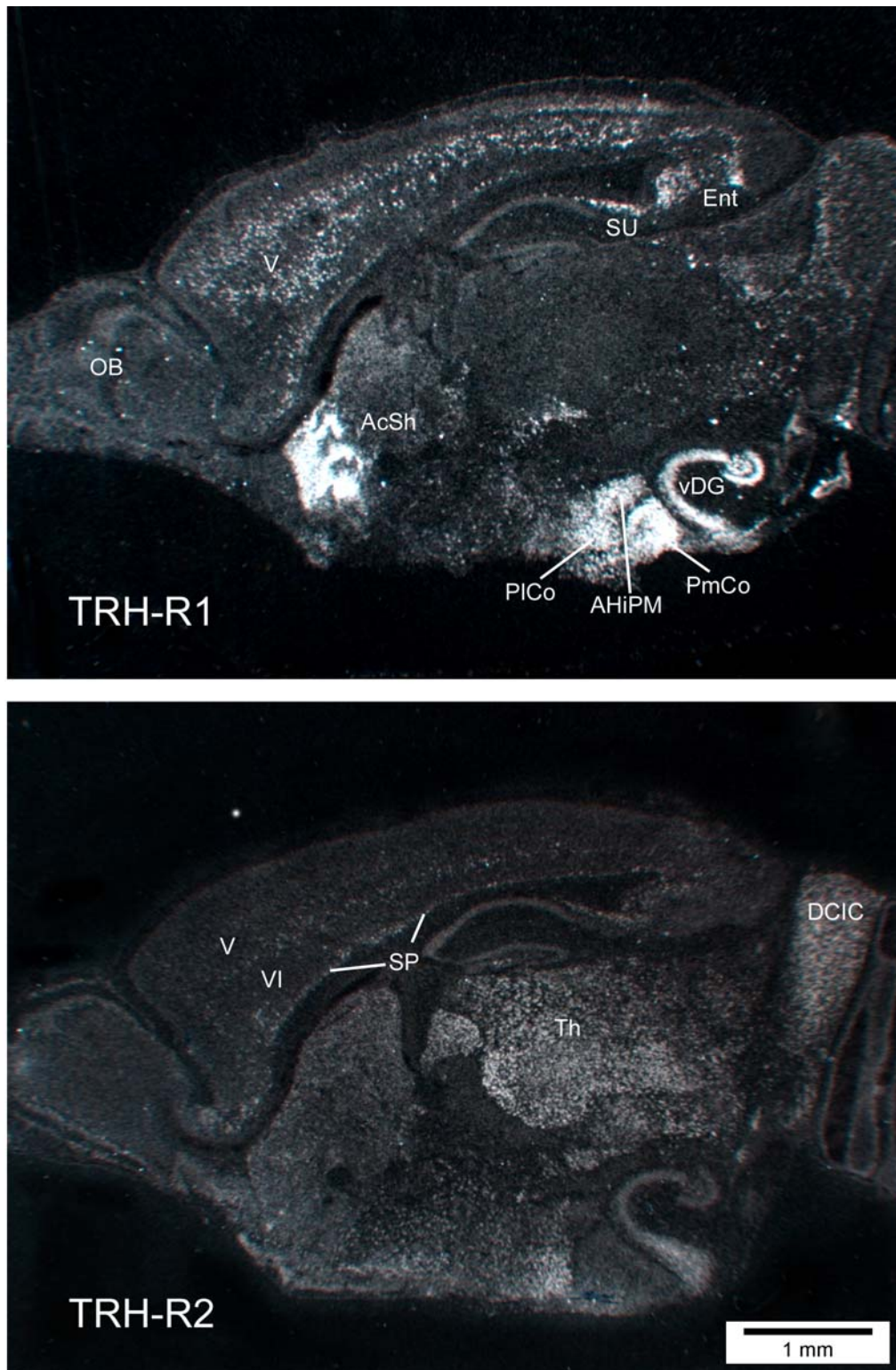


Abbildung 23: Expression der TRH-Rezeptoren 1 und 2 in der zwei Wochen alten Maus: Dargestellt ist die *in situ*-Hybridisierung auf sagittalen Schnitten. TRH-R1 (oben) zeigt eine starke Expression im cerebralen Cortex, und in der Rinde des Nucleus accumbens (AcSh). Das Subiculum (SU) und der ventrale Gyrus dentatus (vDG) des Hippocampus zeigen wie der amygdalo-hippocampale Übergangsbereich (PICo, posterolateraler corticaler Nucleus; AHIPM, postmedialer Teil der amygdalo-hippocampalen Region; PmCo, posteromedialer corticaler Nucleus) ebenso starke Signale. Die TRH-R2-Expression (unten) ist dagegen vor allem auf den Thalamus (Th) und den posterioren Colliculus (DCIC, dorsaler Cortex des inferioren Colliculus) beschränkt. Im cerebralen Cortex sind Signale in zwei schmalen Streifen zu beobachten, in einem tiefen Subplate-Streifen (SP) und in einem Streifen im mittleren Bereich zwischen Schicht V und VI. OB, olfaktorischer Bulbus; Ent, entorhinaler Cortex.

3.5 *LacZ*-Expression unter der Kontrolle des TRH-R1-Promotors

Um die Expression des TRH-Rezeptor 1 in der späten Embryonalphase und im adulten Tier zu untersuchen, wurden Cryoschnitte von Embryos des Stadiums E18,5 und von Gehirnen adulter Mäuse (mit jeweils heterozygotem Genotyp) verwendet. Die Tiere hatten einen NMRI-genomischen Hintergrund

Als Negativkontrolle dienten jeweils wildtyp-Embryos bzw. adulte Tiere aus demselben Wurf. Die Art der Fixierung und anschließenden Färbung ermöglichte es, jegliche endogene β -Galactosidase-Aktivität in adulten Gehirnen auf nicht detektierbare Werte zu reduzieren. Im Gastrointestinaltrakt von Embryonen bzw. in bestimmten Geweben adulter Tiere (Gastrointestinaltrakt und Testes bzw. Ovarien) war dies nicht möglich. Aufgrund der insgesamt niedrigen Expressionswerte führte die *lacZ*-Expression nicht zu einer gleichmäßigen Anfärbung der Zellen. Vielmehr ließen sich perinucleär lokalisierte, blaue Punkte detektieren.

3.5.1 Embryonale Verteilung der *lacZ*-Aktivität

In allen Gebieten, in denen mit Hilfe der *in situ*-Hybridisierung TRH-R1-Transkripte nachgewiesen worden waren, konnte auch β -Galactosidase-Aktivität detektiert werden. So wurden hohe Signalintensitäten in der mittleren cerebralen Schicht, im Subiculum (S) des Hippocampus, im hypoglossalen Nucleus (10) und in tiefen α -Motoneuronen gefunden. Eine mittlere Intensität ließ sich im lateralen Parabrachial-nucleus (LPB), im spinalen Vestibular-Nucleus und im submamillaren Nucleus (SuM) sowie im paraventrikulären Bereich des Hypothalamus detektieren. Auch in der Hypophyse und in Zellen der Lamina II des Rückenmarks waren Zellen mit mittlerer *lacZ*-Expression zu beobachten.

Eine Expression ließ sich aber neben diesen Gebieten auch in Geweben und Bereichen detektieren, die mit Hilfe der *in situ*-Hybridisierung nicht sichtbar gemacht werden konnten oder in denen eine unspezifische Bindung angenommen worden war (wegen gleichzeitig detektierter Signale der *sense*-Sonde). So konnten starke Signale im Ependym des lateralen Ventrikels (im Bereich der Fimbria des Hippocampus) und im Choroid Plexus (CP) des Aquädukts beobachtet werden (Abb. 24, unten). Auch im CP des dritten Ventrikels wurden mittlere Signalintensitäten sichtbar.

Eine kleine Population schwach *lacZ*-exprimierender Zellen konnte im Cochlearschen-Gang (DC) des Innenohrs, in enger räumlicher Nähe zur Tektorial-Membran detektiert werden (Abb. 24, oben). Die übrigen Bereiche des Corti-Organs waren dagegen frei von Signalen.

Zusätzlich konnten Zellen mit β -Galactosidase-Aktivität im frontalen Kopfbereich, vor allem in mandibulären Knorpelstrukturen, nachgewiesen werden (Abb. 25). Alle Knorpelgewebe außerhalb des Kopfbereichs zeigten keine Färbung.

Weder im Herzen, noch in der Leber, im Thymus oder im Pankreas war eine *lacZ*-Expression feststellbar. Im Gastrointestinaltrakt war aufgrund der hohen endogenen β -Galactosidase-Aktivität keine eindeutige Zuordnung möglich.

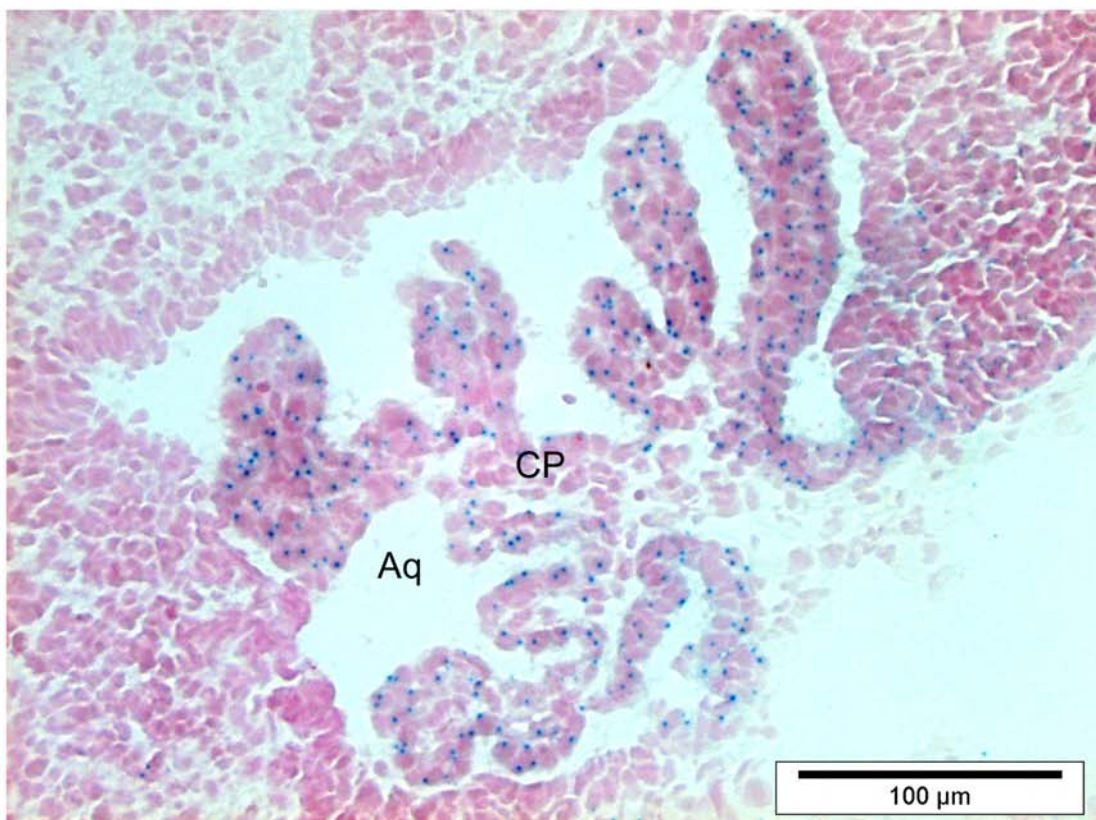
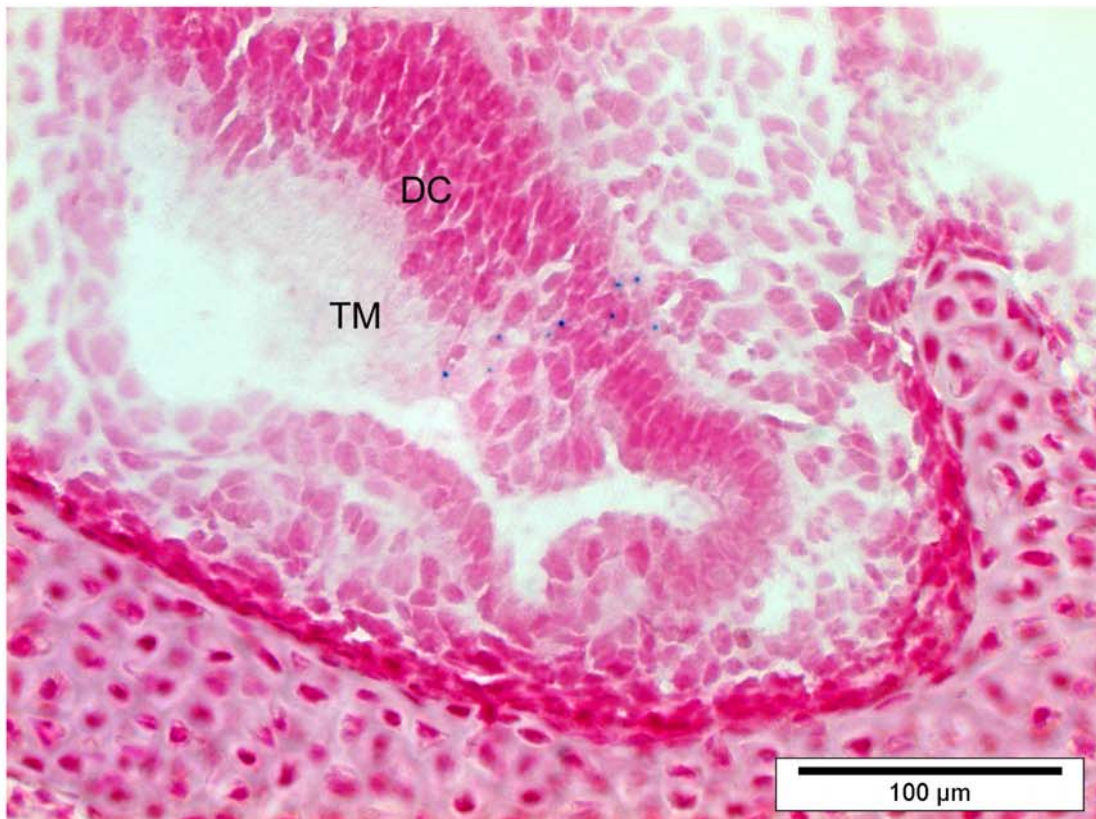
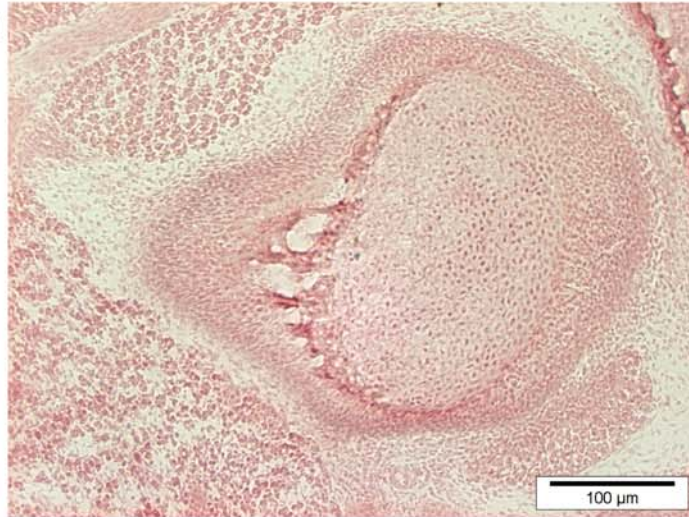


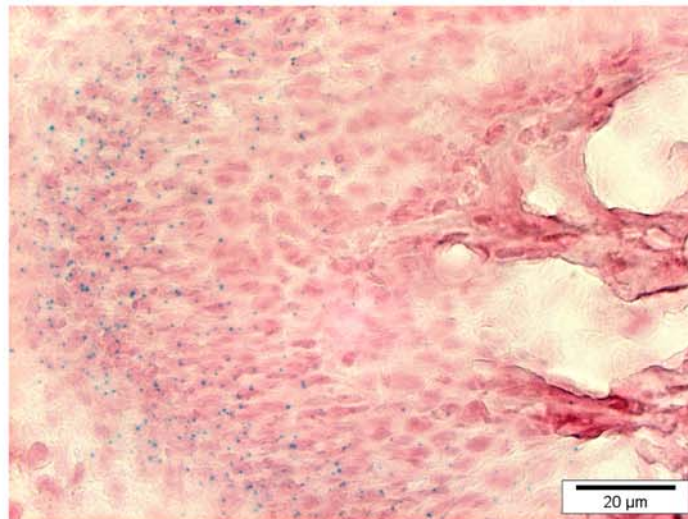
Abbildung 24: LacZ-Expression im Innenohr und Choroid-Plexus des späten Embryos (E18,5): Im Bild oben ist die lacZ-Färbung eines sagittalen Schnitts durch das cortische Organ gezeigt. Expressionsignale sind als perinucleäre, blaue Punkte auf dem roten Hintergrund der Gegenfärbung (*Nuclear Fast Red*) erkennbar. Im Bereich der Tektorial-Membran (TM) sind einzelne, in einem schmalen Streifen angeordnete Zellen zu erkennen, die eine schwache Färbung aufweisen. Auf dem unteren Bild wird die starke Färbung im embryonalen Choroid Plexus (CP) des Aquädukts gezeigt. Dieses Gewebe ist eine der am stärksten gefärbten Strukturen des Embryos.

LacZ im
Knorpel

10x



40x



100x

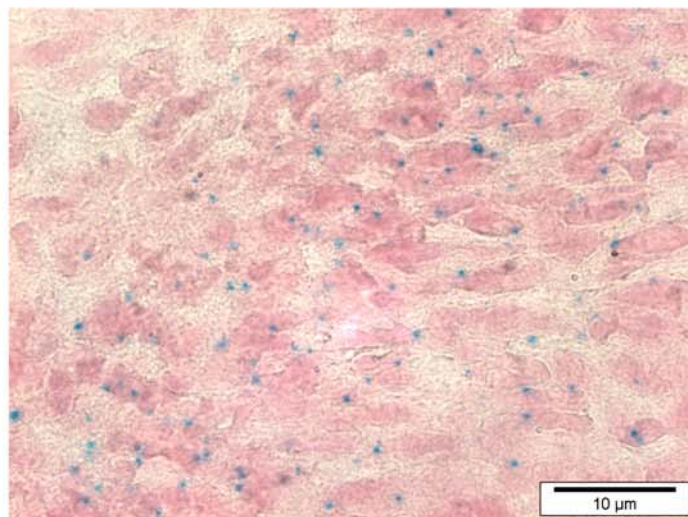


Abbildung 25: LacZ-Färbung in embryonalen Knorpelstrukturen: Die Bilder zeigen eine Knorpel-Struktur im vorderen Kopfbereich (mandibulär) am Embryonaltag 18,5. Im oberen Bild (Vergrößerung zehnfach) ist der grobe Aufbau der Struktur zu erkennen. Eine Ausschnittsvergrößerung im mittleren Bild (40-fach) zeigt die lacZ-Färbung in Randbereichen des Knorpels. Eine weitere Vergrößerung (100-fach) verdeutlicht, dass nahezu alle Zellen in diesem Rindenbereich das Transgen exprimieren.

3.5.2 Adulte Verteilung der lacZ-Aktivität

Auch auf adulten Gehirnschnitten konnten die *in situ*-Hybridisierungs-Daten bestätigt werden. Die hohe Spezifität bzw. das optimale Signal-Rausch-Verhältnis erlaubte eine Identifizierung auch sehr gering exprimierender Zellen und eine genaue Zuordnung der einzelnen Hirnarreale und Kerngebiete. Eine subjektive Einschätzung der Expressionsstärke in den einzelnen Hirnarrealen und Kerngebieten wurde in Tabelle 4 zusammengefasst.

Tabelle 4: TRH-R1-Promotor kontrollierte lacZ-Expression

Rhinencephalon		Mesencephalon	
Bulbus Olfactorius		Substantia grisea centralis mesencephali	
Lamina glomerulosa	-	pars dorsomedialis	++ (+) *
Lamina plexiforma externa	-	pars dorsolateralis	+++
Lamina mitralis	-	pars ventralis	+++ **
Lamina plexiforma interna	-	Darkschewitsch Ncl.	+++
Lamina granularis	-	Ncl. commissurae posterioris	+++
Ncl. olfactorius anterior, pars medialis	+++ *	Ncl. oculomotorius accessorius, p. med.	+++ *
Ncl. olfactorius anterior, pars ventralis	+++ *	Ncl. pretectalis olivaris	+++
Ncl. olfactorius anterior, pars externa	+++ *	Ncl. tractus opticus	+++ (+) *
Bulbus olfactorius accessorius	+++	Superior colliculi	
Telencephalon		Lamina grisea superficialis	+++ **
Cortex cerebri		Lamina grisea intermedialis	+++ (+) **
Lamina 1	-	Lamina grisea profunda	+++ **
Lamina 2	-	Stratum opticum	+++ (+) **
Lamina 3	-	Anterior colliculi	
Lamina 4	-	Cortex	++ (+) **
Lamina 5	++++	Stratum album mediale	+++ (+) **
Lamina 6	+++ (+)	Cerebellum	
Subplate	+++ *	Lobuli 1 – 8	-
Cortex agranularis insularis	+++	Lobulus 9, 10	
Cortex perirhinalis	+++	Lamina granularis	+++ (+) *
Cortex piriformis	(+)	Lamina molecularis	-
Septum		Purkinje Schicht	-
Diagonales Band von Broca	+++	Flocculus	++++ (+) *
Ncl. parastriatus	+++	Paraflocculus	++++ *
Ncl. septi lateralis, pars intermedialis	+++ **	Ncl. lateralis cerebelli	+++ (+) **
Ncl. septi lateralis, pars ventralis	+++ **	Ncl. interpositus cerebelli	+++ (+) **
Ncl. septi medialis	+++ (+)	Ncl. medialis cerebelli	+++ (+) **
Ncl. septi triangularis	++++ **	Medulla oblongata	
Ncl. septofimbrialis	+++ *	Area prostroma	+++
Ncl. septohippocampalis	+++ *	Barrington's Ncl.	+++
Ncl. striae medullaris	++++	Locus coeruleus	++ (+)
Basalganglien		Ncl. ambiguus	++++ *
Caudatus-Putamen	+++ **	Ncl. cochlearis dorsalis	+++ *
Ncl. parastriatus	+++	Ncl. cochlearis ventralis	+++ (+) *
Amygdala / erweiterte Amygdala		Ncl. nervi hypoglossi	++++ **
Area amygdalohippocampalis	+++ (+)	Ncl. prepositus hypoglossi	++++ **
Area transitoria cortico-amygdalaris	+++ *	Ncl. parabrachialis medialis	+++ (+)
Ncl. accumbens, core	-	Ncl. parabrachialis lateralis	+++
Ncl. accumbens, shell	+++ (+)	Ncl. raphe dorsalis	+++ *
Ncl. amygdaloideus basomedialis	+++ **	Ncl. raphe linearis	+++
Ncl. amygdaloideus centralis	-	Ncl. raphe medianus	++++ **
Ncl. amygdaloideus corticalis posterior	++ (+)	Ncl. raphe obscurus	+++
Ncl. amygdaloideus intercalatus	+++ *	Ncl. raphe paramedianus	++++ **
Ncl. amygdaloideus lateralis	+++	Ncl. reticularis lateralis	+
Ncl. amygdaloideus medialis	+++ (+) *	Ncl. spinalis nervi trigemini	++++ **
Ncl. interstitialis striae terminalis	+++ *	Ncl. tegmentalis laterodorsalis	+++ *
Ncl. commissurae anterior	+++ (+)	Ncl. tegmentalis dorsalis	-
Hippocampus		Ncl. tractus solitarius	+++ (+)
CA1	+++	Ncl. trigeminalis mesencephali	+++ (+) *
CA2	+++ *	Ncl. vestibularis medialis	+++ *
CA3	++	Ncl. vestibularis lateralis	+++ (+) *
Subiculum	+++ (+)	Ncl. vestibularis descendens (spinalis)	+++ (+)
Parasubiculum	+++	Paratrigeminal Ncl.	+++ *
Praesubiculum	++ (+)	Medulla spinalis	
Gyrus dentatus		Ncl. motorius dorsalis nervi vagi	++++ *
Lamina granulosa	(+)	Ncl. trigeminalis, pars spinalis	+++ (+)
Lamina moleculare	+	Columna dorsalis (Lamina 2)	++
Lamina polymorpha	+++ (+)	Columna ventralis	+++ **
ventraler Gyrus dentatus	++++	Columna intermediolateralis	+++ *
Diencephalon		α -Motoneuronen	++++ **
Habenula		Ventrikel und Circumventriculare Organe	
Ncl. habenulae lateralis	+++ *	Choroid Plexus	+(+) * ¹
Ncl. habenulae medialis	-	Ependym des	
Thalamus		lateralen Ventrikels	+++ ²
Ncl. reuniens thalami	+++	4. Ventrikels	-
Ncl. thalamicus centralis medialis	+++ *	3. Ventrikels	++ (+) ³
Ncl. thalamicus mediodorsalis	-	Aquädukt	++ * ⁴
Ncl. thalamicus paraventricularis	+++ (+)	Area postrema	+++
Ncl. thalamicus reticularis	-	Eminentia mediana	-
Ncl. thalamicus rhomboideus	++ *	Organum subcommissurale	+++ (+)
Ncl. thalamicus subparafascicularis	+++ (+) *	Organum subformicale	-
Ncl. thalamicus ventralis posterior	-	Organum vasculosum laminae terminalis	-
Ncl. thalamicus xiphoid	+++ *		
Hypothalamus			
Area hypothalamica anterior, pars centr.	++ (+) *		
Area hypothalamica lateralis	+++ *		
Area hypothalamica posterior	+++ (+) *		
Ncl. arcuatus hypothalami, pars dorsalis	++ (+) *		
Ncl. arcuatus hypothalami, pars ventralis	+++ *		
Ncl. hypothalamicus anterior, pars centr.	+++		
Ncl. hypothalamicus dorsomedialis	+++ *		
Ncl. hypothalamicus ventromedialis	+++ (+) *		
Ncl. paraventricularis hypothalami	++ (+)		
Ncl. periventricularis hypothalami	+++ *		
Ncl. praeopticus anterodorsalis	+++ *		
Ncl. praeopticus medialis	+++ (+) *		
Ncl. Supramammillaris	+++		
Ncl. Supraopticus	+++ *		

Färbintensität: -, kein Signal; +, sehr schwach; ++, gering; +++, mittel; +++++, stark; ++++++, maximal; *, vereinzelt (< 10 %); ** sehr vereinzelt (< 1 %); ***, 1 – 3 Zellen / Schnitt; D3V, dorsales 3. Ventrikel; 4V, 4. Ventrikel; ¹ v.a. medial im D3V und 4V; ² medial; ³ v.a. dorsal; ⁴ +++++ in Dach und Boden

Rhinencephalon

Im olfaktorischen Bulbus ließ sich eine mittelstarke Expression in der glomerulären Schicht des akzessorischen olfaktorischen Bulbus (Abb. 26) und vereinzelt in Zellen der anterioren olfaktorischen Nuclei detektieren.

Telencephalon

i) Cerebraler Cortex

Im cerebralen Cortex (Abb. 27) konnte die höchste Signalintensität in Schicht V detektiert werden. Geringe bis mittlere Expressionwerte entfielen auf die Schicht VIA/B und die Subplate-Schicht. Die übrigen Schichten des Cortex waren hingegen frei von Signalen. Nur im Bereich des agranulären Insular-Cortex konnte auch in höheren Schichten eine Färbung beobachtet werden. Vereinzelt wurden auch zwischen den Fasern des dorsalen und frontalen Cingulums mittelstark exprimierende Zellen gefunden. Diese waren zum Teil bahnenartig angeordnet. Im Piriform-Cortex war nur rostral und dort nur im dorsalen Teil eine schwache *lacZ*-Färbung nachweisbar.

ii) Septum

Im Bereich des diagonalen Band von Broca, im Nucleus des medialen Septums und im Nucleus der Stria medullaris konnte eine gleichmäßige Verteilung mittlerer bis starker Signale detektiert werden. Die übrigen Bereiche und Kerngebiete wiesen entweder vereinzelte oder gar keine Signale auf.

iii) Basalganglien

Im Caudatus-Putamen konnten nur sehr wenige, mit mittlerer Intensität gefärbte, Zellen detektiert werden. Die Anzahl lag bei etwa zwei bis vier Zellen pro Schnitt. Dagegen zeigte der parasubthalamische Nucleus eine gleichmäßige Verteilung von Zellen mit mittlerer *lacZ*-Expression.

iv) Amygdala, erweiterte Amygdala

Die Amygdala-Region gehörte zu den Bereichen des Gehirns mit der höchsten *lacZ*-Expressionsrate. Neben der amygdalohippocampalen Übergangszone konnte auch in der *shell*-Region des Nucleus accumbens und im Nucleus der vorderen Commissur eine mittlere bis starke Färbung nachgewiesen werden. In fast allen Kerngebieten der Amygdala wurden zudem vereinzelte Zellen gefunden, die das Transgen mit mittlerer Stärke exprimierten.

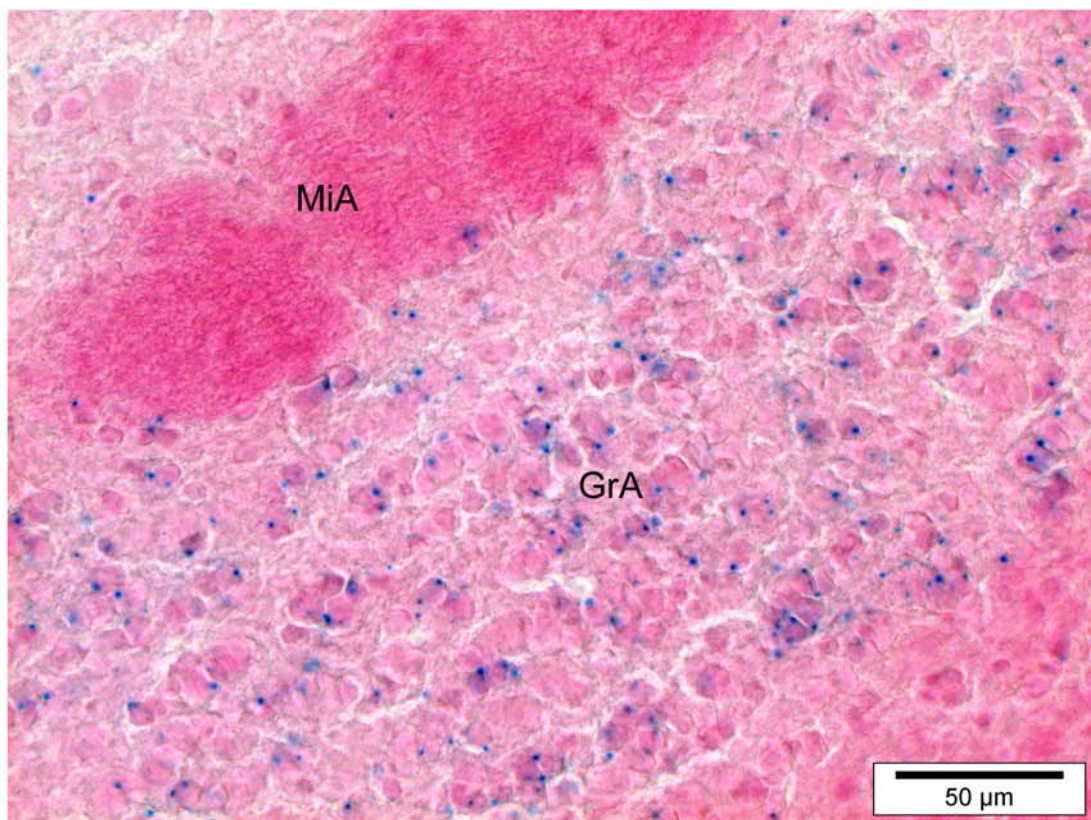
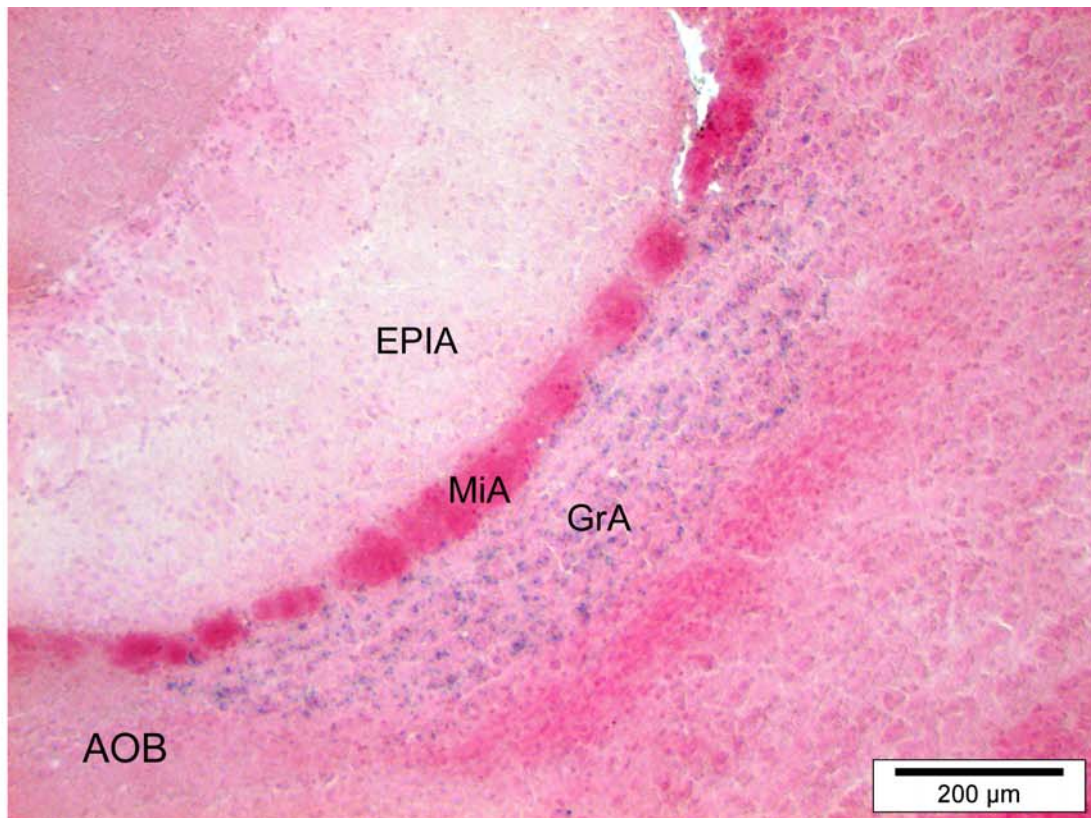


Abbildung 26: LacZ-Expression im akzessorischen olfaktorischen Bulbus: Die Expression der bakteriellen β -Galactosidase ist auf die granuläre Schicht (GrA) des akzessorischen olfaktorischen Bulbus (AOB) beschränkt. Hier zeigt sich eine mittlere bis starke Färbung. Die Mitral-Zellschicht des AOB (MiA) und die externe plexiforme Schicht des AOB (EPIA) sind dagegen weitestgehend frei von Signalen.

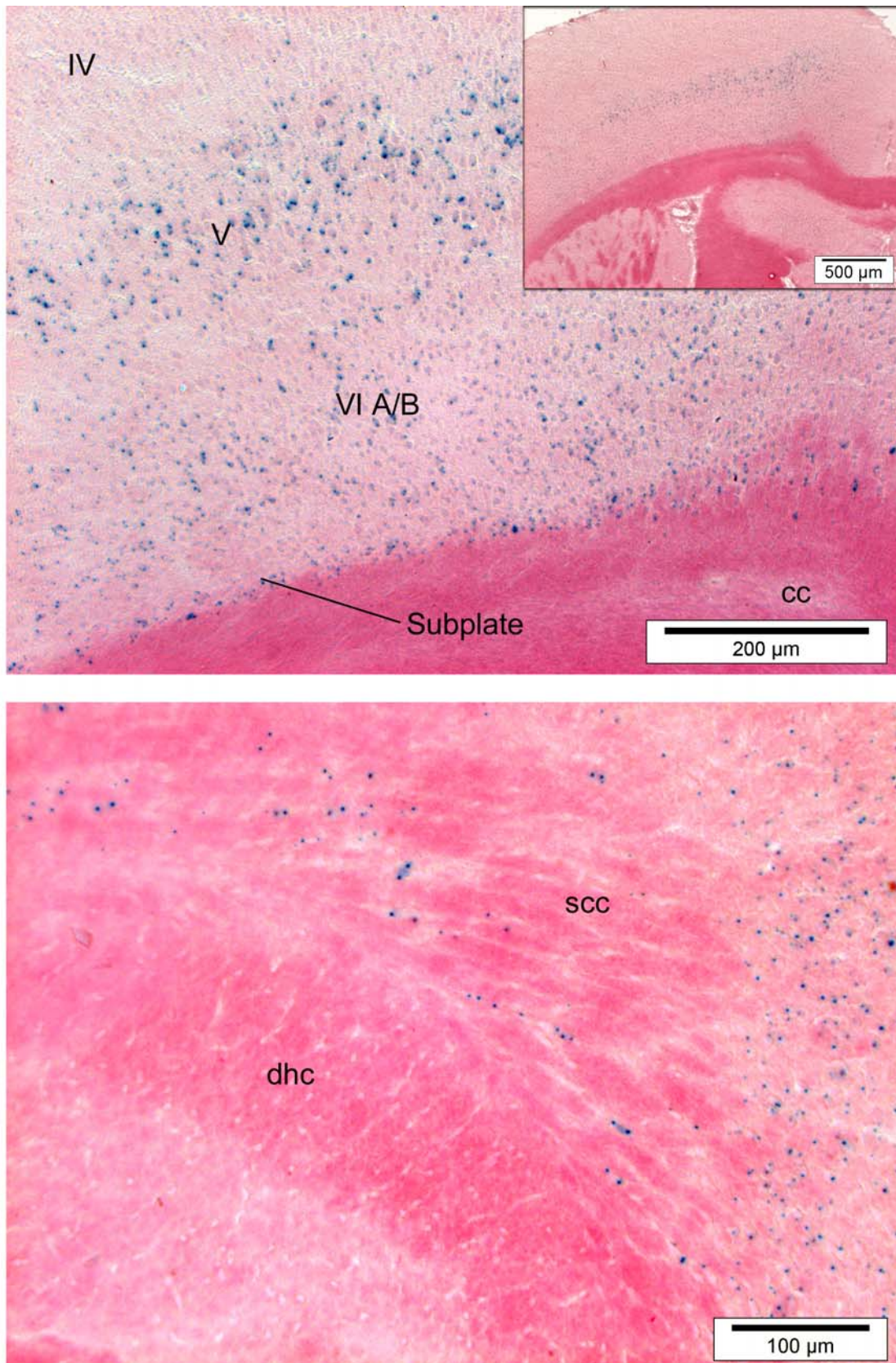


Abbildung 27: LacZ-Expression im cerebralen Cortex: Im kleinen Bild oben rechts ist die Übersicht, im großen Bild der Ausschnitt eines frontalen Schnitts des Cortex dargestellt. Die Schichten I bis IV sind frei von Signalen. In Schicht V sind starke, in Schicht VI A/B mittlere Signalintensitäten zu erkennen. Im unteren Bild ist der spleniale Bereich des Corpus callosum (scc) auf einem horizontalen Schnitt gezeigt. Deutlich ist zwischen den Fasern eine bahnenartige Anordnung lacZ-gefärbter Zellen erkennbar. cc, Corpus callosum; dhc, dorsale hippocampoale Commissur.

v) Hippocampus

Im Hippocampus (Abb. 28) war eine deutliche räumliche Gewichtung der Färbeintensitäten zu beobachten. In frontalen und medialen Bereichen war nur im Subiculum eine mittelstarke Färbung zu detektieren, wohingegen die Pyramidenzellen der CA1, CA2 und CA3-Region sowie alle Schichten des Gyrus dentatus keine Signale aufwiesen. In posterioren und lateralen Regionen dagegen konnte in der CA3-Region eine schwache, in der CA1- und CA2-Region eine mittelstarke Expression gezeigt werden, die allerdings in der CA2-Region auf den Randbereich beschränkt war. Die Färbung im Subiculum war in diesen Bereichen stark bis sehr stark. Gleichzeitig konnten mittlere Signalintensitäten im Prä- und Parasubiculum beobachtet werden. Sehr vereinzelte mittel bis stark gefärbte Zellen konnten zudem im Stratum radiatum und im Stratum lacunare detektiert werden.

Die höchste Signalintensität im Hippocampus zeigten der Gyrus dentatus und das Subiculum im ventralen Teil des posterioren Hippocampus. Hier konnten in allen Schichten des Gyrus mittlere bis starke Signale nachgewiesen werden.

Diencephalon

i) Hypothalamus

Im Hypothalamus konnten nur zwei Kerngebiete gefunden werden, in denen eine gleichmäßig verteilte, mittlere Signalintensität zu beobachten war: der zentrale Teil des anterioren hypothalamischen Nucleus und die supramammillären Kerne. Daneben konnte im paraventriculären hypothalamischen Nucleus eine gleichverteilte schwache bis mäßige Expression detektiert werden. In allen übrigen Arealen konnte eine schwache bis mäßig starke Färbung nur in vereinzelten Zellen nachgewiesen werden.

ii) Thalamus und Habenulae

Im Thalamus beschränkte sich die lacZ-Expression vornehmlich auf den dorsal gelegenen paraventriculären Nucleus mit einer mittleren bis starken Intensität und den ventralen Nucleus Reuiens mit mittelstarken Signalen. Daneben ließen sich vereinzelte mittel bis stark exprimierende Zellen im Rhomboid-Nucleus, im zentralen medialen thalamischen Nucleus und im medialen Aspekt des suprafasciculären thalamischen Nucleus erkennen. In allen übrigen thalamischen Kerngebieten war keine Färbung vorhanden.

Während in den medialen Habenulae keine Anzeichen einer Expression detektierbar waren, konnten in den lateralen Habenulae vereinzelte Zellen mit mittlerer Färbeintensität beobachtet werden.

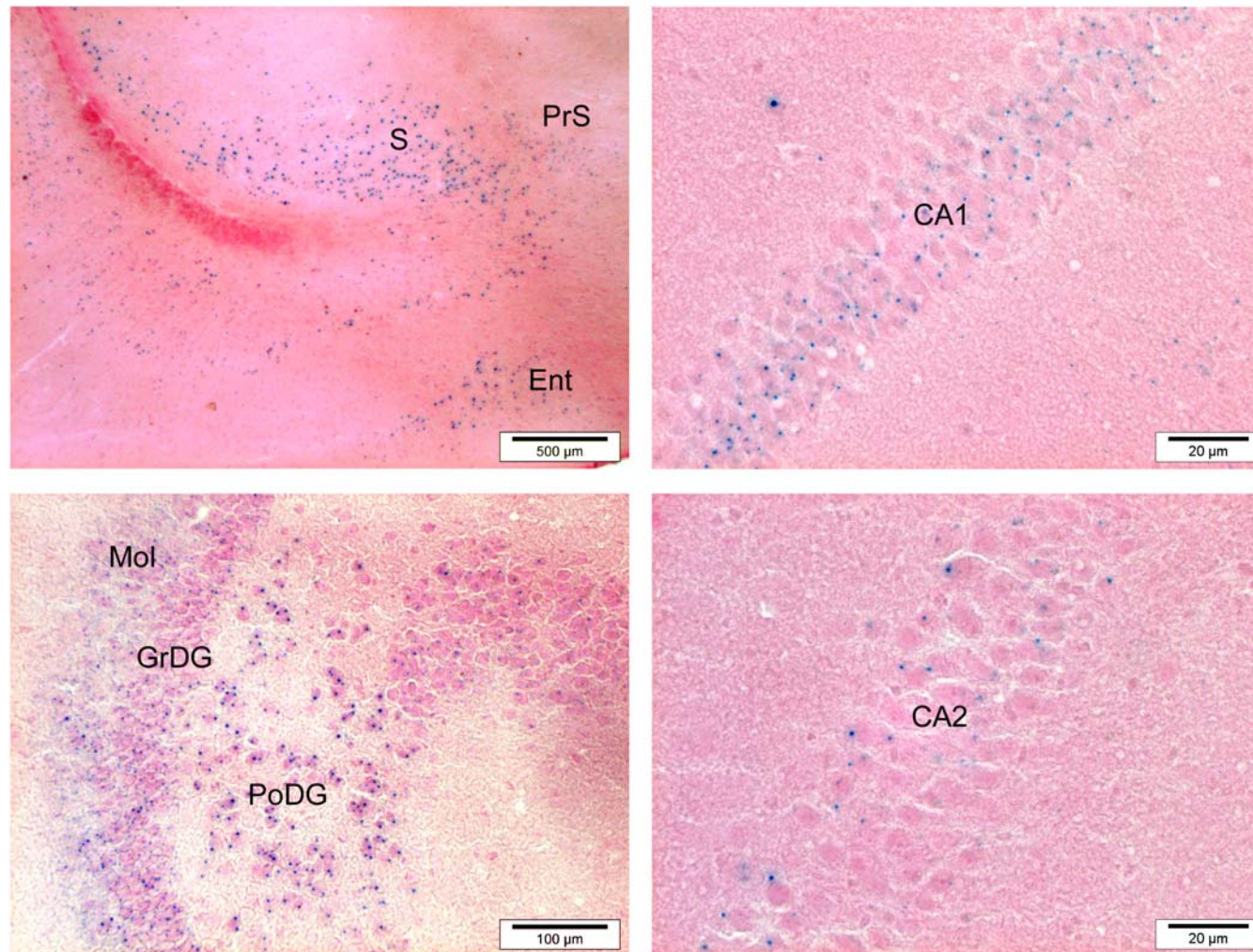


Abbildung 28: LacZ-Expression im Hippocampus: Im Bild links oben ist eine horizontale Übersicht des hippocampal-corticalen Übergangsbereichs abgebildet. Eine starke Expression ist in den Zellen des Subiculum (S) sichtbar. Im Präsubiculum (PrS) und im entorhinalen Cortex (Ent) zeigt sich eine mittlere Expression. Im Bild oben rechts ist die lacZ-Färbung der Pyramidalschicht CA1 dargestellt, die eine gleichmäßige Verteilung der Signale aufweist. Dagegen sind in der CA2-Schicht (rechts unten) vor allem Zellen im Randbereich gefärbt. Links unten ist ein Ausschnitt des ventralen Gyrus dentatus abgebildet. In allen Schichten werden starke bis sehr starke Signale sichtbar. Mol, molekulare Schicht des DG; GrDG, granuläre Schicht des DG; PoDG, polymorphe Schicht des DG.

Mesencephalon

Vor allem im dorsolateralen, vereinzelt auch im dorsomedialen periaquäduktalen Grau (PAG) wurden mittelstark lacZ-exprimierende Neuronen gefunden. Mit Ausnahme sehr vereinzelter Signale im tiefen ventralen Bereich war das übrige PAG frei. Drei Kerngebiete zeigten eine gleichmäßige Verteilung mittelstarker Signale: der Darkschewitsch Nucleus, der prätectale olivare Nucleus und der Nucleus der posterioren Commissur. Ansonsten ließen sich mittel bis stark exprimierende Zellen nur vereinzelt bis sehr vereinzelt in bestimmten Schichten der Colliculi, im akzessorischen okkulomotorischen Nucleus und im Nucleus des optischen Trakts nachweisen.

Cerebellum

Die cerebellaren Lobuli 1 bis 8 waren weitestgehend frei von Signalen. In der granulären Schicht der Lobuli 9 und 10 dagegen konnten vereinzelte Zellen gefunden werden, die eine mittlere bis mäßig starke Expression aufwiesen (Abb. 29, oben). Diese Zellen traten zumeist in der äußerern Schicht auf, oft in direktem Kontakt zu Purkinje-Zellen. Zum Teil waren die Zellen in der Purkinje-Schicht detektierbar. Dagegen konnte weder in der molekularen Schicht noch in Purkinje-Zellen selbst eine lacZ-Färbung gezeigt werden. In den tiefen cerebellaren Kerngebieten wurden sehr vereinzelt Zellen mit zum Teil starker Färbung gefunden.

Die stärkste cerebellare Expression wurde jedoch im Flocculus bzw. Paraflocculus beobachtet (Abb. 29, unten), die zusammen das so gennante Paläo- oder auch Archäe-Cerebellum bilden. Im Gegensatz zu der Expression in Lobulus 9 und 10 waren die Signale jedoch nicht in der granulären Schicht, sondern hauptsächlich in der Lamina alba und in den Pedunkeln zu finden. Es konnten stark bis sehr stark gefärbte, langgezogene Zellen identifiziert werden, die zum Teil bahnenartig angeordnet waren.

Medulla oblongata

Die stärksten lacZ-Signale im Bereich des Hirnstamms wurden in vereinzelt Neuronen des hypoglossalen und des spinalen trigeminalen Nucleus beobachtet. Auch im spinalen vestibulären Nucleus waren einzelne stark exprimierende Zellen sichtbar. Zu Kerngebieten mit gleichmäßig verteilten, mittleren bis starken Signalen gehörten der Barrington's Nucleus, der mediale und laterale parabrachiale Nucleus und der Nucleus des Tractus solitarius. In allen Raphe-Kerngebieten waren mittlere bis starke Signale zu beobachten, die zum Teil

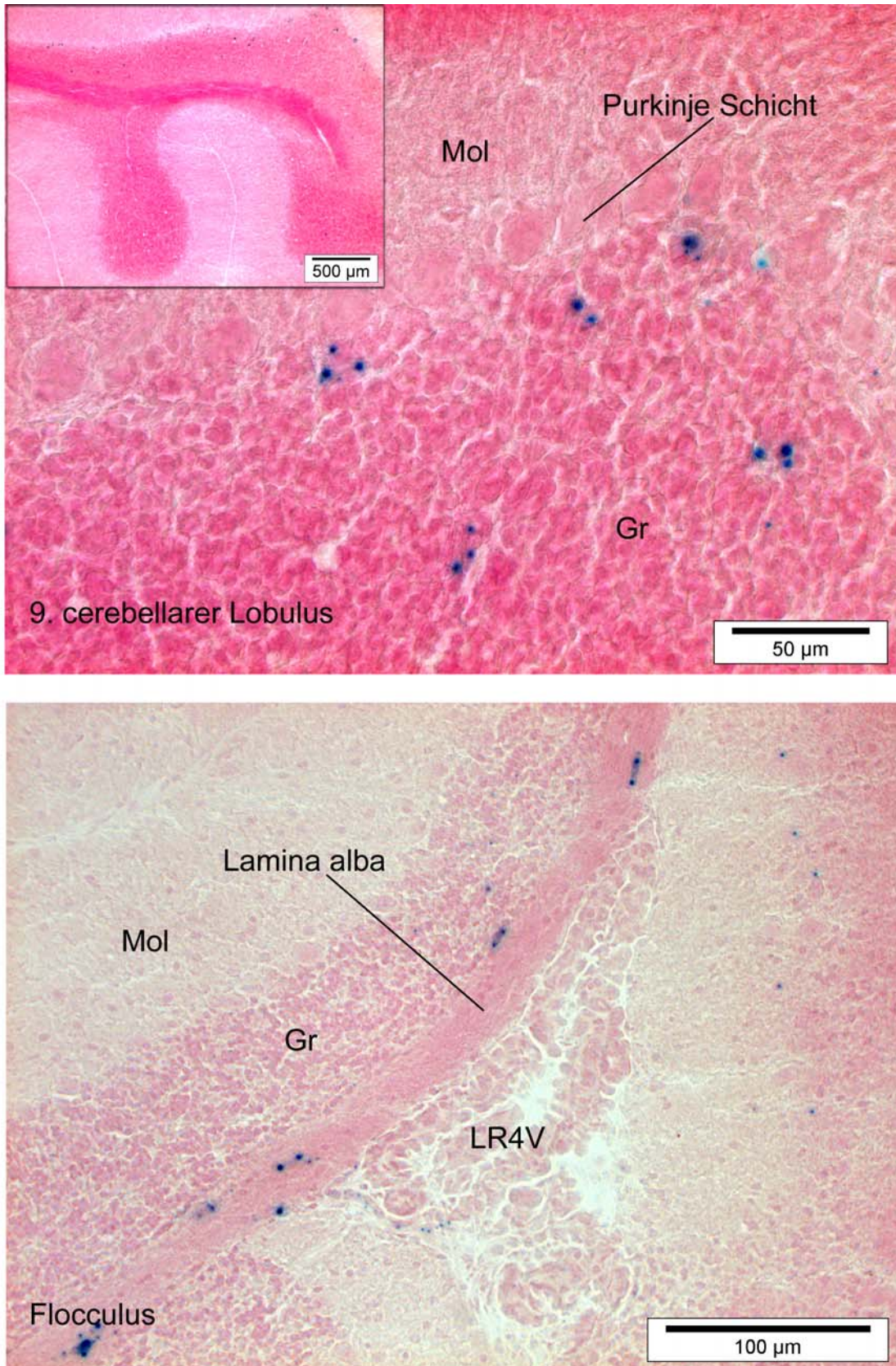


Abbildung 29: LacZ-Expression im Cerebellum: Im kleinen Bild oben ist eine lacZ-Färbung des neunten cerebellaren Lobulus dargestellt. Das große obere Bild zeigt eine Ausschnittsvergrößerung. Sowohl die molekulare Schicht (mol) als auch die Purkinje-Schicht sind frei von Signalen. In der granulären Schicht (Gr) sind einzelne Zellen mit mittleren Signalen beobachtbar. Diese sind oft in enger räumlicher Nähe zu den Purkinje-Zellen anzutreffen. Im Flocculus des Cerebellums (unteres Bild) ist die Expression dagegen fast vollständig auf zum Teil langezogene Zellen in der Lamina alba beschränkt. LR4V, lateraler Rezzess des vierten Ventrikels.

gleichmäßig verteilt, zum Teil vereinzelt auftraten. In allen Zellen der Area postrema war zudem eine geringe bis mittlere Färbung zu erkennen.

Medulla spinalis

Im dorsalen Motor-Nucleus des Vagus und im Trigeminal-Nucleus des Rückenmarks konnten starke bis sehr starke lacZ-Signale beobachtet werden. Im dorsalen Horn waren schwach exprimierende Zellen auf den Bereich der äußeren Lamina glomerulosa beschränkt (Abb. 30, unten). Vereinzelt wurden in mittleren und ventralen Schichten mittelstark gefärbte Zellen sichtbar. Die stärkste auf adulten Hirnschnitten detektierbare Färbung zeigte eine Subpopulation tiefer α -Motoneuronen (Abb. 30, oben).

Ventrikel und circumventriculäre Organe

Im Gegensatz zur Signalintensität und -verteilung im Embryo, war die lacZ-Expression im adulten Choroid Plexus (CP) meist schwach und auf bestimmte Bereiche beschränkt. So ließ sich im medialen Teil des dorsalen dritten Ventrikels (D3V) und im zentralen und lateralen vierten Ventrikel eine Subpopulation von CP-Zellen identifizieren, die das Transgen sehr schwach bis gering exprimierte. Zum Teil waren die Signale bahnenartig angeordnet. Im Choroid Plexus der übrigen Ventrikelbereiche wurde hingegen keine Färbung gefunden.

Sehr heterogen war auch die beobachtete Signalverteilung in den Ependymzellen, die die Ventrikelhöhlräume auskleiden. Im lateralen Ventrikel konnte nur in der medialen Wand (im Bereich der Fimbria hippocampi, fi) eine Expression detektiert werden (Abb. 31, oben). Das gegenüberliegende Ependym, das der so genannten subependymalen Zone (SEZ) aufliegt, war dagegen frei von Signalen. Im dritten Ventrikel war der mittlere und ventrale Bereich ohne Signale, dagegen konnte in Zellen des dorsalen Teils eine geringe bis mittlere Expression beobachtet werden. Das Ependym des vierten Ventrikels zeigte weitestgehend keine Färbung. Nur im lateralen Rezess waren schwache Signale sichtbar. Auch im Ependym des Aquädukts ließen sich nur vereinzelt schwache Signale detektieren. Eine Ausnahme bildeten Zellen in der ventralen und dorsalen Begrenzung (Dach und Boden) des Aquädukts, in denen eine stärkere Expression und eine gleichmäßige Verteilung beobachtet werden konnten.

In den circumventriculären Organen konnte ein ähnlich divergierendes Expressionsmuster festgestellt werden. Sowohl in der Area postrema als auch im Subcommissural-Organ (Abb. 31, unten) waren mittlere bzw. starke Signale in allen Zellen nachweisbar. Dagegen konnte in der medianen Eminenz, im Subfornical-Organ und im Organum vasculosum der Lamina terminalis keine Färbung beobachtet werden.

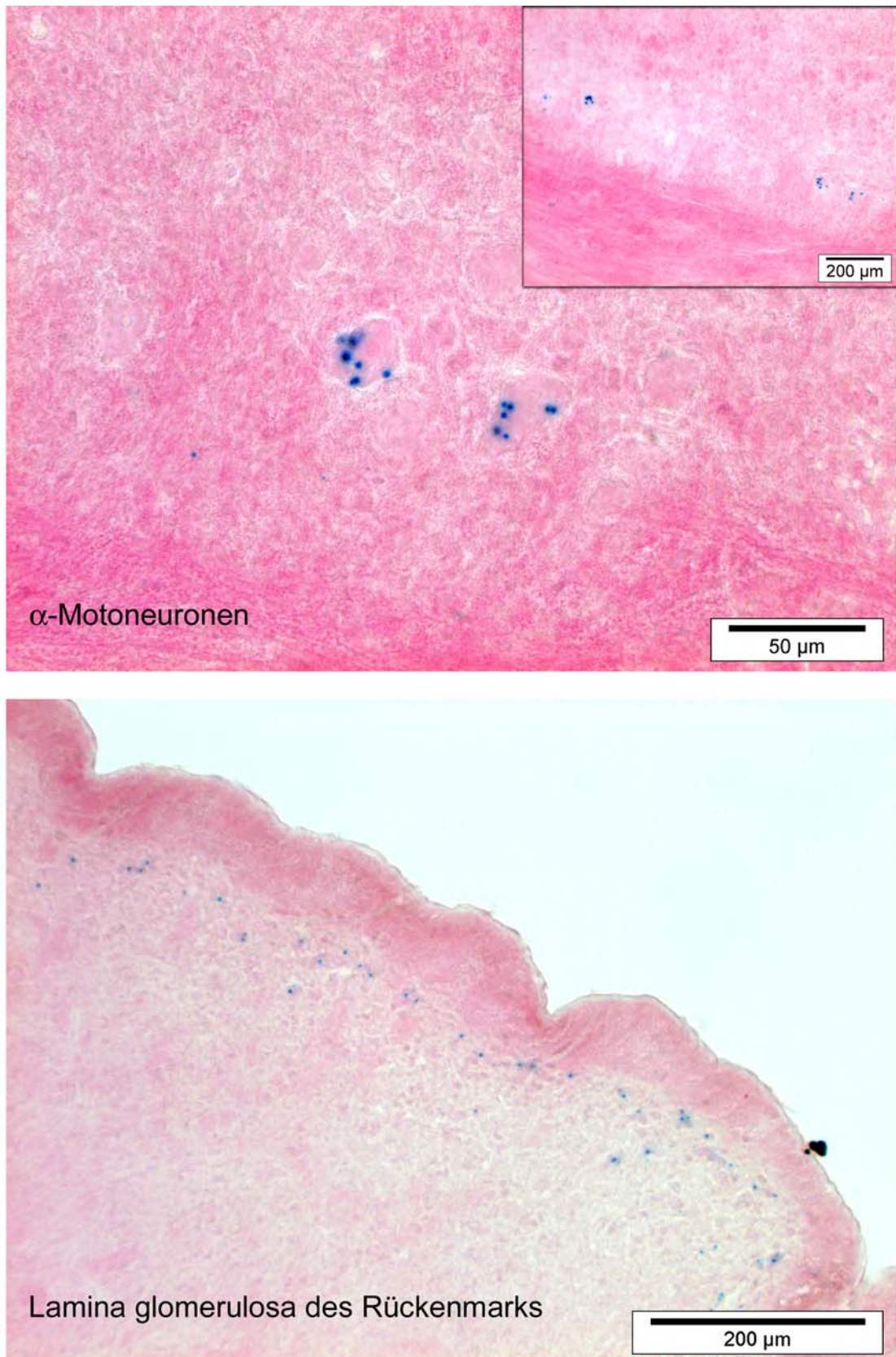


Abbildung 30: LacZ-Expression im Rückenmark: Im kleinen Bild oben rechts ist die lacZ-Färbung eines sagittalen Schnitts durch das Rückenmark dargestellt. Das große Bild zeigt eine Ausschnittsvergrößerung mit zwei sehr stark gefärbten α -Motoneuronen. Es ist deutlich erkennbar, dass andere Motoneuronen in diesem Bereich keine Expression aufweisen. Im unteren Bild ist die lacZ-Färbung eines sagittalen Schnitts durch den dorsalen Bereich des Rückenmarks gezeigt. Die Expression in dieser Region ist fast vollständig auf die äußere Schicht der Lamina glomerulosa (Lamina II) beschränkt, während Lamina I und tiefere Schichten frei von Signalen sind.

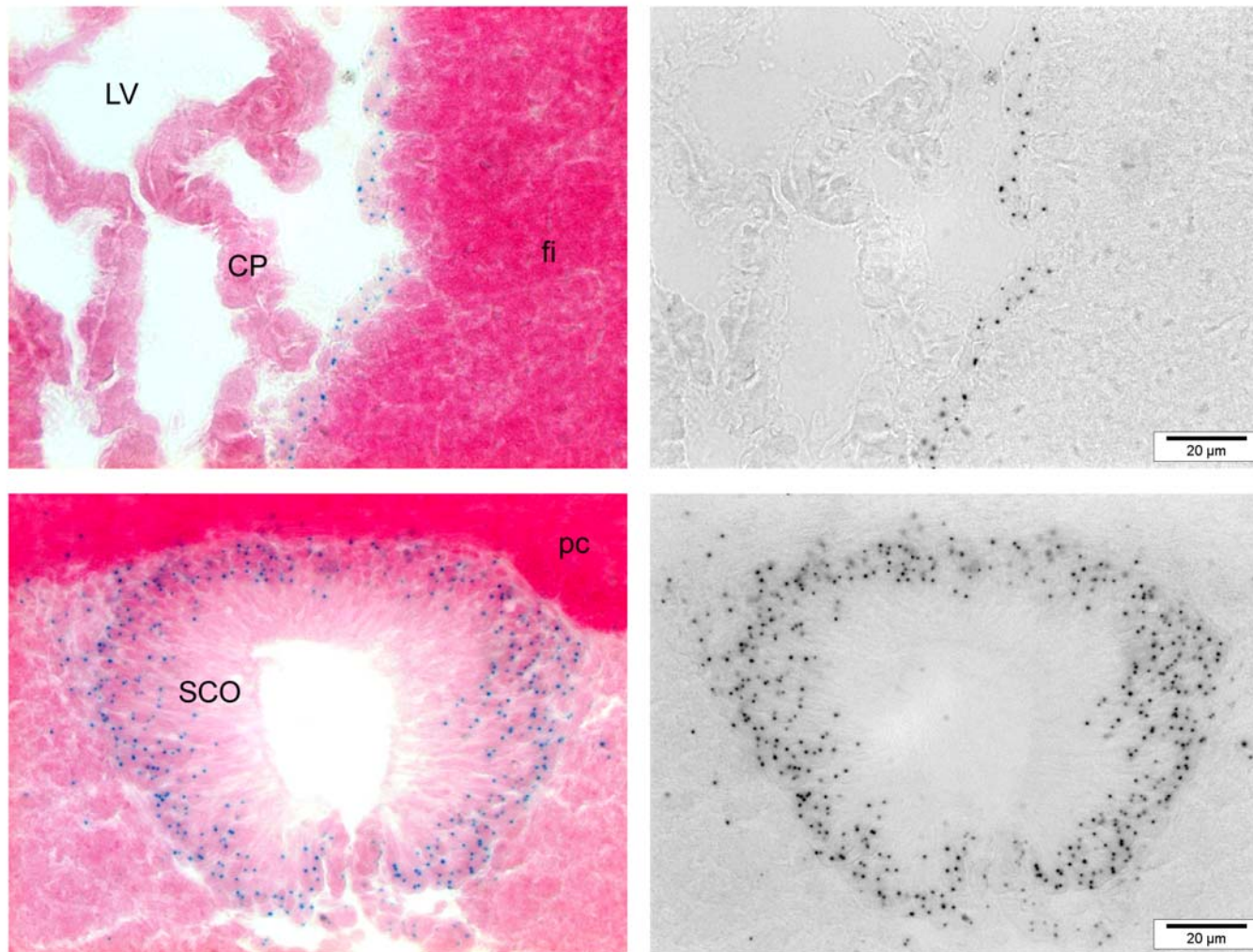


Abbildung 31: LacZ-Expression im Ventrikel-Ependym und im Subcommissural-Organ: Im oberen Bild links ist die lacZ-Färbung der Ependymzellen des lateralen Ventrikels (LV) dargestellt. Die Expression ist auf den medialen Bereich des Ependyms, der der Fimbria des Hippocampus (fi) aufliegt, beschränkt. Das Ependym im Bereich der SEZ und der Choroid-Plexus (CP) in diesem Ventrikel sind frei von Signalen. Im unteren Bild links ist die Expression im Subcommissural-Organ (SCO) dargestellt. Gut sichtbar ist die starke Expression in den Tanyzyten, die dieses Organ bilden. Um die Lokalisation zu erleichtern, wurden in den Bildern auf der rechten Seite jeweils die Farbauszüge dargestellt. pc, posteriore Commissur.

3.6 Das TRH-Signalsystem in der Ratte und in der Maus

In Tabelle 2 wurde, exemplarisch für drei Hirnregionen, ein Vergleich der detektierten lacZ-Signale mit den Ergebnissen der *in situ*-Hybridisierungs-Analyse von TRH und den TRH-Rezeptoren 1 und 2 in Maus und Ratte dargestellt. Die Expressionswerte aus der Ratte wurden hierbei der Doktorarbeit bzw. den Veröffentlichungen von Dr. H. Heuer entnommen (Heuer, Ehrchen et al. 1998; Heuer, Schafer et al. 2000).

Tabelle 5: Vergleich der lacZ-Expression und der *in situ* Analyse des TRH-Signalsystems in der Maus (m) und der Ratte (r) (Heuer, Ehrchen et al. 1998) in ausgewählten Hirnregionen.

	lacZ-Färbung	mTRH-R1	rTRH-R1	mTRH-R2	rTRH-R2	mTRH	rTRH	mTRH-DE	rTRH-DE
Cortex cerebri									
Layer 1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Layer 2	-	-	++	++	++	-	-	+++	+++++
Layer 3	-	-	+	+++	++	-	-	+++++	+++++
Layer 4	-	-	+	-	-	-	-	+++	++++
Layer 5	++++	++++	+	+++	++++	-	-	+++++	++++
Layer 6	++ (+)	++	+	+++	+++	+++	-	++++	+++++
Subplate	++ *	++ *	-	++ *	-	++++	-	-	-
Hippocampus									
CA1	+++	-	+ *	-	-	-	-	+++	+++
CA2	+++ *	-	+ *	-	-	-	-	+++++	+++++
CA3	++	-	+ *	-	-	-	-	+++	+++
Subiculum	++++ (+)	++++	-	+++ *	+++++	-	++ *	+++	++++
Gyrus dentatus									
Lamina granulosa	(+)	-	++	-	-	-	++	-	-
Lamina moleculare	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Lamina polymorpha	+++ (+)	++	-	+++ *	-	-	-	++	+
ventraler Gyrus dentatus	++++	++++	++++	-	-	-	-	+	keine Aussage
Cerebellum									
Lamina granularis	+++ (+) * (9, 10)	-	-	-	+++ *	-	++++ *	+++++	+++++
Lamina molecularis	-	-	-	-	++++ *	-	-	-	-
Purkinje Schicht	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Flocculus	++++ (+) *	+++ *	-	-	-	-	-	+++++ ¹	keine Aussage
Paraflocculus	++++ *	+++ *	-	-	-	-	-	+++++ ¹	keine Aussage

Färbeintensität: -, kein Signal; +, sehr schwach; ++, gering; +++, mittel; ++++, stark; +++++, maximal; *, vereinzelt (< 10 %); (9, 10), Lobulus cerebellaris 9 und 10; ¹, in der Lamina granularis

Cerebraler Cortex

Im cerebralen Cortex ist ein deutlich divergierendes Expressionsmuster festzustellen. Während für TRH-Rezeptor 1 in der Ratte nur eine sehr schwache bis geringe Expression vor allem in höheren Schichten detektiert wurde, zeigte sowohl die lacZ-Färbung als auch die *in situ*-Analyse in der Maus starke Signale in Schicht V und geringe bis mittlere in den tieferen Schichten (VI und Subplate). Die Schichten I bis IV waren hingegen frei von Färbesignalen. Für TRH-Rezeptor 2 konnte ein übereinstimmendes Expressionsmuster festgestellt werden. Dagegen zeigte die Verteilung der TRH mRNA extreme Unterschiede. So konnte in der Ratte kein TRH-Signal im Cortex festgestellt werden. In der Maus wurden jedoch mittlere Transkriptspiegel in Schicht VI und hohe in der Subplate-Schicht gefunden.

Hippocampus

Im Hippocampus konnte mit Hilfe der lacZ-Färbung in den Pyramidenzellen der CA1-, CA2- und CA3-Region eine geringe bis mittlere Signalintensität beobachtet werden. Hingegen konnten weder in der Maus noch in der Ratte (vereinzelte Signale nur im Stratum lacunare bzw. radiatum) mit Hilfe der *in situ*-Hybridisierung Transkripte in diesen Regionen nachgewiesen werden.

Im Subiculum des Hippocampus wurden sowohl eine starke lacZ-Färbung als auch hohe TRH-R1 mRNA-Spiegel detektiert. Im Subiculum der Ratte war hingegen keine Expression nachweisbar. Im Gyrus dentatus (DG) der Ratte konnten in der glomerulären Schicht mäßige Transkriptspiegel beobachtet werden. Dagegen zeigte diese Schicht in der Maus kaum detektierbare (*lacZ*) oder keine Signale (*in situ*). Sowohl die molekulare als auch die polymorphe Schicht des DG der Ratte waren frei von Signalen. Ein deutlich anderes Bild ergab sich in der Maus. Während nur mit Hilfe der lacZ-Färbung in der molekularen Schicht Signale detektiert werden konnten, konnte in der polymorphen Schicht mit beiden Methoden eine mäßige (*in situ*) bzw. starke (*lacZ*) Expression gezeigt werden.

Eine TRH-Rezeptor-2-Expression konnte in der Ratte nur im Subiculum des Hippocampus beobachtet werden, dort allerdings mit sehr starker Intensität. Die Analyse der Expression in der Maus zeigte dagegen nur eine mittlere Stärke in diesem Bereich. Zudem schienen nicht alle Zellen diesen Rezeptor zu exprimieren. Zusätzlich konnte auch in vereinzelt Zellen der polymorphen Schicht des DG eine mittlere Expression gezeigt werden.

TRH-Transkripte konnten im Hippocampus der Maus nicht nachgewiesen werden. Dagegen konnten in der Ratte geringe Transkriptspiegel sowohl in vereinzelt Zellen des Subiculus als auch in der glomerulären Schicht des Gyrus dentatus gezeigt werden.

Cerebellum

Weder in der Maus, noch in der Ratte konnte mit Hilfe der *in situ*-Hybridisierung TRH-Rezeptor 1 mRNA in den cerebellaren Lobuli gezeigt werden. In der Maus war jedoch im Pedunkel und zum Teil in der Lamina alba des Flocculus und Paraflocculus in vereinzelt Zellen eine mittlere bis starke TRH-R1-Expression nachweisbar. Diese Expression konnte mit Hilfe der lacZ-Färbung bestätigt werden (Abb. 32). Zum Teil langgestreckte Zellen mit starker β -Galactosidase-Aktivität waren in der Lamina alba und im Pedunkel erkennbar. Zusätzlich konnten mit dieser Methode vereinzelt Zellen mit mittleren bis starken Signalen in der granulären Schicht der Lobuli 9 und 10 sichtbar gemacht werden.

TRH-Rezeptor 2 wurde in der Ratte in vereinzelt Zellen der molekularen und granulären Schicht nachgewiesen. Im Cerebellum der Maus war TRH-R2 mRNA nicht nachweisbar.

Auch TRH-Transkripte wurden in Zellen der granulären Schicht in der Ratte gefunden. In der Maus dagegen war das ganze Cerebellum frei von TRH mRNA.

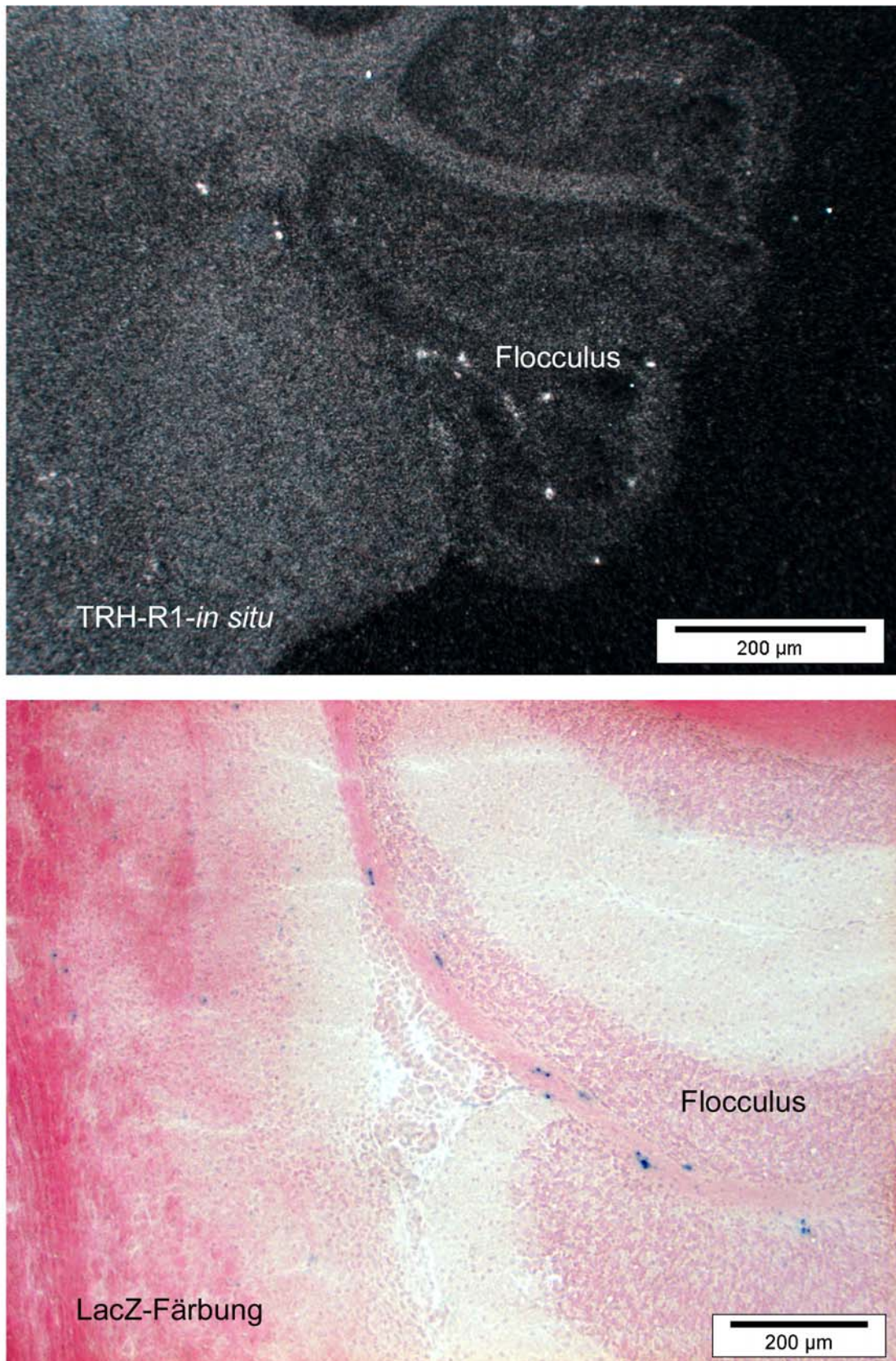


Abbildung 32: Vergleich der TRH-R1-*in situ*-Hybridisierung und der lacZ-Analyse des cerebellaren Flocculus: Im oberen Bild ist die TRH-R1-*in situ*-Hybridisierung eines frontalen Schnittes gezeigt. Deutlich lassen sich in langgestreckten Zellen in der Lamina alba starke Signale detektieren. Zum Vergleich ist im unteren Bild die lacZ-Färbung eines horizontalen Schnittes gezeigt. Auch hier lassen sich langgestreckte Zellen mit Färbesignalen in der Lamina alba detektieren. Hingegen ist die molekulare Schicht völlig und die granuläre weitestgehend frei von lacZ-Signalen.

4 Diskussion

4.1 Einleitung

TRH war das erste hypothalamisch-hypophysäre Releasing-Hormon, das isoliert und charakterisiert wurde. Seine Entdeckung, die es der namensgebenden biologischen Aktivität verdankte, begründete eine neue Ära der endokrinologischen Forschung. In der Folge wurden weitere Signale und endokrine Regulationswege analysiert und die Grundmechanismen dieses komplexen Systems aufgeklärt.

Die Möglichkeit der gezielten Einführung von Mutationen in das Genom der Maus erlaubt es, die genaue Funktion von Signalmolekülen und ihre postulierte Wirkung zu untersuchen. Ziel dieser Arbeit war es, die TRH-Rezeptor-1-vermittelte Wirkung von TRH in der endokrinen Regulation und außerhalb des Endokriniums zu analysieren.

Die namensgebende Aktivität gehört zu den wenigen Funktionen des TRH, die genau untersucht und verstanden worden sind: Das im paraventriculären Nucleus des Hypothalamus von neurosekretorischen Neuronen synthetisierte TRH gelangt nach seiner Freisetzung über das hypothalamisch-hypophysäre Pfortadersystem in die Hypophyse (Schally 1978). Im Vorderlappen der Hypophyse bindet TRH an seinen Rezeptor, den TRH-Rezeptor 1. Dieser G-Protein gekoppelte Rezeptor befindet sich auf der Plasmamembran der TSH-produzierenden thyrotropen Zellen. Die Bindung des TRH bewirkt über die Aktivierung der G-Proteine eine Signalkaskade, die zu einer Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration und zu einer Aktivierung der Proteinkinase C führt (Hinkle 1989). Das Resultat dieser Ereignisse ist die Verschmelzung TSH-haltiger Vesikel mit der Plasmamembran und somit die Freisetzung der gespeicherten Hormone in den Körperkreislauf. Über das Blut gelangt TSH in die Schilddrüse, wo es Rezeptor-vermittelt die Produktion und Freisetzung von Schilddrüsen-Hormon induziert. Die Regulation der Schilddrüsen-Hormonproduktion erfolgt vor allem durch das negative Feedback des Schilddrüsen-Hormons auf die TSH-Bildung und Sekretion in der Hypophyse. Die enge Kopplung zwischen der Hormon-Konzentration und der TSH-Freisetzung ermöglicht es dem Organismus, die für die Entwicklung und Homöostase essentiellen Schilddrüsen-Hormone auf einem konstanten Niveau zu halten. Die Aufgabe des TRH ist es dabei, eine Reaktion auf veränderte Bedingungen innerhalb oder außerhalb des Körpers zu ermöglichen. So führt in Nagern der plötzliche Eintritt in eine kalte Umgebung zu einer drastischen Erhöhung der TRH-Sekretion und in der Folge zu einer

Erhöhung der TSH- und Schilddrüsen-Hormonkonzentration. Letztere ermöglicht durch die Steigerung des Grundumsatzes und durch die Induktion von Entkopplungsproteinen im Fettgewebe und in der Muskulatur die Aufrechterhaltung der Körpertemperatur.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die endokrine Funktion des TRH gut verstanden und dokumentiert ist.

Unumstritten ist aber auch, dass TRH, wenn es in bestimmte Bereiche des Gehirns injiziert wird, zahlreiche zentrale Effekte hervorrufen kann. Diese Effekte sind so vielfältig, dass sie es nicht erlauben, TRH einer pharmakologischen Substanzklasse zuzuordnen. Stattdessen wurde es, aufgrund seiner allgemein zentral anregenden Eigenschaften als ergotrope Substanz bezeichnet.

Überraschend war die Beobachtung zentraler Effekte nicht. Schon kurz nachdem TRH identifiziert worden war, machten immunhistochemische Analysen deutlich, dass der größte Teil des TRH außerhalb des Hypothalamus lokalisiert ist. Autoradiographische Untersuchungen mit markiertem TRH zeigten zudem, dass es hochaffine Bindungsstellen in weiten Teilen des Gehirns und in der Peripherie gibt. Somit war eine wichtige Voraussetzung für die postulierte Neurotransmitter- oder Neuromodulatorfunktion des TRH erfüllt. Unterstützt wurde diese Annahme durch die Tatsache, dass es ein hochspezifisches TRH-abbauendes Ektoenzym (TRH-DE) gibt, für das sowohl eine weiträumige Verteilung im Gehirn als auch eine Lokalisation auf synaptischen Membranen gezeigt werden konnte. Somit ist dieses Enzym in der Lage, die Funktion eines Signalterminators zu erfüllen.

Ein weiterer Hinweis auf eine Funktion außerhalb der endokrinen Regulation war die Identifizierung von authentischem TRH in einer Vielzahl von Spezies. Zum Teil sind dies Organismen, die keine Hypophyse besitzen. So gelang die Identifizierung der TRH-cDNA zuerst in Fröschen, bei denen es in großen Mengen in der Haut synthetisiert wird und eine regulative Funktion bei der Homöostase des Wasser- und Elektrolythaushalts erfüllt. Ebenso wie im Frosch, dessen Haut neuroektodermalen Ursprungs ist, finden sich auch in anderen Spezies Hinweise auf eine neuronale Funktion des TRH. Die endokrine Funktion als TSH-freisetzendes Hormon hat sich dagegen erst später in der Evolution herausgebildet.

Offen blieb, über welche Rezeptoren die TRH-Signale und Funktionen vermittelt werden. TRH-Bindungsstudien erlaubten zwar eine Identifizierung möglicher TRH-Wirkorte, aber keine Unterscheidung zwischen verschiedenen Rezeptor-Isoformen. Die Klonierung des TRH-Rezeptor 1 (Straub, Frech et al. 1990) und kürzlich die des TRH-Rezeptor 2 (Cao, O'Donnell et al. 1998; Itadani, Nakamura et al. 1998) ermöglichte zumindest eine *in situ*-

histochemische Lokalisierung der Perikaryen von Neuronen, die die Rezeptoren synthetisieren. Der neu identifizierte TRH-Rezeptor 2 und die in den meisten Bereichen beobachtete komplementäre Expression konnten zumindest zum Teil die auffallende Divergenz zwischen der TRH-Bindung und der TRH-R1-Expression in manchen Hirnbereichen erklären. Nur zum Teil, weil es weiterhin Bereiche gab (z. B. hippocampale Strukturen), in denen autoradiographisch eine hohe TRH-Bindung nachgewiesen worden war, in denen aber weder TRH-R1- noch TRH-R2-Transkripte gefunden werden konnten. Eine mögliche Erklärung dieses Phänomens war die Annahme weiter Projektionen und einer präsynaptischen Lokalisation der Rezeptoren oder das Postulat weiterer Rezeptoren.

4.2 TRH-defiziente Mäuse

Im Verlauf dieser Doktorarbeit wurden von einer japanischen Gruppe Mäuse mit einer Inaktivierung des TRH-Gens generiert (Yamada, Saga et al. 1997). Diese Mäuse zeigten einen milden tertiären Hypothyreoidismus mit Schilddrüsen-Hormonkonzentrationen von 50 bis 60 % der wildtyp-Werte. Sie waren lebensfähig, fertil und durchliefen eine normale Entwicklung. Eine transiente Wachstumsverzögerung war nach vier Wochen detektierbar, die durch eine Gabe von Schilddrüsen-Hormon verhindert werden konnte. Acht Wochen nach der Geburt war kein Gewichtsunterschied zwischen homozygoten Mäusen und ihren wildtyp-Geschwistern feststellbar, unabhängig von einer Schilddrüsen-Hormon-Gabe. Die TSH-Konzentrationen im Serum waren etwa um das Zweifache erhöht. Dagegen konnten bei den Prolactin- und GH-Konzentrationen keine Unterschiede festgestellt werden. Immunhistochemische Untersuchungen zeigten, dass die Zahl der thyrotropen Zellen in der mutanten Hypophyse deutlich reduziert waren. Diese Reduktion konnte durch eine TRH-Gabe, aber nicht durch die Gabe von Schilddrüsen-Hormon verhindert werden. Trotz des Fehlens offensichtlicher anatomischer oder physiologischer Unterschiede konnte in den mutanten Mäusen eine deutliche Erhöhung der Blut-Glucosekonzentration im Hungerzustand festgestellt werden. Diese Erhöhung konnte nicht durch eine Schilddrüsen-Hormon-Gabe korrigiert werden. Experimente zeigten, dass die Hyperglycämie aus einer verminderten Insulin-Sekretion nach Glucose-Stimulation resultiert.

In einer weiteren Studie mit diesen Tieren wurde untersucht, welche Auswirkungen die TRH-Defizienz auf die Entwicklung und Homöostase der hypophysären Zellen hat (Shibusawa, Yamada et al. 2000). Während die thyrotropen Zellen bis kurz nach der Geburt unverändert waren, konnte nach zehn Tagen und in allen weiteren Stadien eine drastische Reduktion der

Anzahl dieser Zellen festgestellt werden. Obwohl die Serum-TSH-Werte in den mutanten Mäusen erhöht waren, konnte festgestellt werden, dass neben dem TSH-Gehalt auch die TSH-mRNA-Konzentration in der Hypophyse vermindert war. Weder für die lactotropen Zellen, noch für die gonadotropen, corticotropen oder somatotropen Zellen konnte acht Wochen nach der Geburt eine Veränderung beobachtet werden. Dennoch wurde eine signifikante Abnahme der Prolactin- und GH-mRNA-Konzentrationen in der Hypophyse festgestellt. Diese Abnahme wurde auf den Hypothyreodismus zurückgeführt, da sie durch eine Gabe von Schilddrüsen-Hormon verhindert werden konnte.

4.3 Eine natürliche TRH-Rezeptor-1-Defizienz im Menschen

Im Verlauf dieser Doktorarbeit wurde die Untersuchung eines Jungen veröffentlicht, der auf beiden Allelen inaktivierende Mutationen im TRH-Rezeptor-1-Gen trug (Collu, Tang et al. 1997). Die Indikation für eine Analyse der endokrinen Regulation waren eine verminderte Körpergröße und unterdurchschnittliche schulische Leistungen. Eine genaue Untersuchung ergab eine verzögerte Knochenentwicklung, eine verringerte Herzfrequenz und eine verminderte Schilddrüsen-Hormonkonzentration (tertiärer Hypothyreodismus). Die TSH-Werte waren hingegen im normalen Bereich. Die intravenöse Gabe von TRH (TRH-Stimulationstest) zeigte, dass weder TSH noch Prolactin auf diesen Stimulus hin freigesetzt wurden.

Eine Expression der mutanten Rezeptoren in COS-1-Zellen zeigte, dass die maternale Mutation zu keiner nachweisbaren Reaktion, die paternale Mutation zu einer stark reduzierten TRH-Bindung und TRH-Stimulation der Inositoltriphosphat-Akkumulation führte.

Ein Einfluss der TRH-R1-Defizienz auf die intellektuellen Fähigkeiten konnte hingegen nicht nachgewiesen werden, obwohl ein Intelligenz-Test unterdurchschnittliche Ergebnisse (IQ 92) ergab. Die Brüder des Jungen, die nur ein oder gar kein mutiertes Allel trugen, erreichten bei diesem Test noch niedrigere Werte (IQ 76 bzw. 89).

Das Ziel dieser Doktorarbeit war es, herauszufinden, welche Rolle der TRH-Rezeptor 1 bei der Vermittlung der TRH-Wirkung in der endokrinen Regulation und im zentralen Nervensystem spielt. Da nur TRH-R1 in der Adenohypophyse exprimiert wird, konnte angenommen werden, dass das Fehlen des Rezeptors zu einem Ungleichgewicht der Achse Hypothalamus-Hypophyse-Schilddrüse führt. Als Resultat der fehlenden TRH-Stimulation der thyrotropen Zellen der Hypophyse wurde erwartet, dass eine unzureichende TSH-

Sekretion zu einem Abfall der zirkulierenden Schilddrüsen-Hormone führt. Dieses wird als zentraler oder auch tertiärer Hypothyreodismus bezeichnet.

Sowohl im Menschen als auch in der Ratte konnte gezeigt werden, dass TRH mit gleicher Potenz die Prolactin-Freisetzung induzieren kann. In der Ratte konnte zudem das Vorhandensein von TRH-R1-Transkripten neben thyrotropen Zellen auch in somatotropen und in lactotropen Zellen nachgewiesen werden (Konaka, Yamada et al. 1997). Somit wurde eine direkte Wirkung des TRH auf lactotrope Zellen angenommen. Obwohl die Rolle des TRH bei der Regulation der Prolactin-Sekretion umstritten ist (Gautvik, Tashjian et al. 1974; Harris, Christianson et al. 1978), konnte ein Effekt der TRH-R1-Defizienz nicht ausgeschlossen werden. Die pulsatile Prolactin-Freisetzung in Nagern ist essentiell für die Aufrechterhaltung des Corpus luteum der Schwangerschaft (Arey and Freeman 1990). Sowohl bei Nagern als auch beim Menschen stimuliert Prolactin die Milchbiosynthese und steuert die Laktation. Somit war nicht auszuschließen, dass die TRH-R1-Rezeptor-Defizienz negative Auswirkungen auf die Schwangerschaft und/oder das Säugen hat.

Eine Veränderung verhaltensbiologischer Eigenschaften konnte aufgrund der vielfältigen, zum Teil Spezies-spezifischen pharmakologischen Wirkungen von TRH nicht vorhergesagt werden.

4.4 Der Phänotyp TRH-Rezeptor-1-defizienter Mäuse

TRH-R1-defiziente Mäuse wurden annähernd mit der erwarteten Mendel'schen Frequenz geboren und waren kurz nach der Geburt nicht von ihren wildtyp-Geschwistern zu unterscheiden. Weder aufgrund der Zahl der Nachkommen, noch aufgrund der Qualität der Laktation waren homozygot TRH-R1-defiziente Mäuse von ihren heterozygoten oder wildtyp-Geschwistern zu unterscheiden. Somit konnte ausgeschlossen werden, dass das Fehlen des Rezeptors essentielle Auswirkungen auf die Entwicklung im Mutterleib oder die anschließende Laktationsperiode hatte.

Wie vermutet, zeigten homozygote Mäuse einen tertiären Hypothyreodismus. Die Konzentration von T₄ und T₃ im Blut erreichte nur noch 50 % der Werte, die in heterozygoten oder wildtyp-Mäusen gemessen werden konnten. Diese Änderungen waren weder Geschlechts- noch Tierstamm-spezifisch.

Als Folge der Hypothyreose konnten etwa zwei Wochen nach der Geburt homozygote Nachkommen von ihren heterozygoten und wildtyp-Geschwistern anhand der Körpergröße unterschieden werden. Eine Analyse des Körpergewichts zeigte eine statistisch signifikante

Reduktion der Gewichtszunahme nach 25, 35 und 42 Tagen. Auch in der Folgezeit blieb die Gewichtskurve der homozygoten Tiere unterhalb der ihrer wildtyp-Geschwister. Die Differenz war jedoch geringer und nicht mehr statistisch signifikant.

Regulation der Körpertemperatur

Auch die Körpertemperatur war in den mutanten Mäusen herabgesetzt. So konnte in männlichen Mäusen eine statistisch signifikante Reduktion um etwa 0,7 °C beobachtet werden. Ob es sich bei dieser Reduktion um eine Folge der Hypothyreose und damit eines verminderten Grundumsatzes handelt oder um eine Sollwertverstellung der Temperaturregulation, kann nicht unterschieden werden.

Frühe Untersuchungen in verschiedenen Spezies haben gezeigt, dass durch eine periphere oder zentrale Gabe von TRH die Körpertemperatur steigt. Daneben konnte gezeigt werden, dass die Gabe von TRH die hypotherme Wirkung bestimmter Substanzen antagonisieren kann, so z. B. von Naloxon und Somatostatin (Morley, Levine et al. 1982), von Neurotensin (Hernandez, Nemeroff et al. 1984) und von β -Endorphin (Holaday, Tseng et al. 1978).

Das zentrale Regulationssystem für die Körpertemperatur befindet sich im anterioren Hypothalamus/preoptischen Nucleus. Hier konvergieren die afferenten Temperatursignale aus der Haut und dem Körperkern. Zusätzlich befinden sich in diesem Bereich temperatursensitive Neurone. Eine TRH-Injektion in den Bereich des preoptischen Nucleus der Ratte führt zu einer Hyperthermie, unabhängig von der Umgebungstemperatur (Lin 1982). Verursacht wird die Hyperthermie durch eine Vasokonstriktion in der Haut und eine Zunahme des Grundumsatzes.

Der anteriore Hypothalamus/preoptische Nucleus enthielt hohe TRH-Rezeptor-1-Transkriptspiegel. Auch die TRH-R1-Promotor-vermittelte LacZ-Färbung zeigte mittlere bis starke Signale in diesem Gebiet. Um zu untersuchen, ob die TRH-Rezeptor-1-Defizienz zu einer veränderten Reaktion auf eine tiefe Umgebungstemperatur führt, wurde eine Kälteexposition durchgeführt. Hierbei stellte sich heraus, dass homozygot mutante Mäuse nicht in der Lage waren, kalte Umgebungstemperaturen zu tolerieren. Während sich die Körpertemperatur in den wildtyp-Mäusen bei etwa 35 °C stabilisierte, war sie in den homozygoten Tieren nach drei Stunden (bei 4 °C) im Mittel auf 31 °C abgesunken. Nach vier Stunden war ein Tier bereits tot, die beiden anderen hatten Körpertemperaturen unterhalb von 18 °C. In Nagern führt eine plötzliche Kälteexposition unter anderem zu einer massiven TRH-Freisetzung aus dem Hypothalamus, die über die induzierte TSH-Freisetzung zu einem drastischen Anstieg der Schilddrüsen-Hormonkonzentration führt (Holaday, Tseng et al.

1978). Die Serum-Konzentration von Schilddrüsen-Hormon in den Kälte-exponierten Tieren wird zurzeit bestimmt. Zu erwarten ist, dass die Konzentration in den homozygoten Knockout-Tieren um ein Vielfaches geringer ist als die in ihren wildtyp-Geschwistern. Eine unzureichende Schilddrüsen-Hormon-Freisetzung allein kann den dramatischen Effekt jedoch nicht erklären. Aufgrund des schnellen Zeitverlaufs der Körpertemperatur-Abnahme ist zu schließen, dass hauptsächlich die fehlende Modulation durch TRH im preoptischen Nucleus zu der ungenügenden Temperatur-Regulation führt.

4.5 Endokrinologische Analyse

TSH und Schilddrüsen-Hormon

Wie bereits erwähnt, zeigten TRH-R1-defiziente Mäuse einen tertiären Hypothyreodismus. Diese Reduktion der Schilddrüsen-Hormonkonzentration war unabhängig vom Geschlecht und vom genetischen Hintergrund der Tiere. Ein Teil der Blut-Seren, die für die T₃/T₄-Bestimmungen verwendet wurden, wurden auch auf ihren TSH- und Prolactin-Gehalt hin untersucht.

Im Gegensatz zu den geringen Abweichungen der Schilddrüsen-Hormonkonzentration innerhalb der Genotypen konnten beim TSH-Gehalt erhebliche Varianzen detektiert werden. Dabei traten Konzentrationsunterschiede um den Faktor Zehn auf. Da diese Unterschiede in einer Kontroll-Messung bestätigt werden konnten, wurden alle Werte für die statistische Auswertung verwendet. Daraus resultierten erhebliche Standardabweichungen. Im Mittel konnte trotz dieser Abweichungen eine unveränderte TSH-Konzentration in den Knockout-Tieren festgestellt werden. Weitere Messungen müssen dies bestätigen.

Prolactin

Auch bei den Prolactin-Werten konnten innerhalb der einzelnen Genotyp-Gruppen größere Abweichungen festgestellt werden. Obwohl für die Prolactin-Bestimmung ausschließlich Tiere verwendet wurden, die nicht vor der Dekapitierung betäubt worden waren, kann nicht ausgeschlossen werden, dass die Unterschiede aus einer stressinduzierten Prolactin-Sekretion resultieren (Gala 1990). Da die Prolactin-Konzentration in der weiblichen Maus zudem Zyklus-abhängigen Schwankungen unterliegt, wurden für die statistische Auswertung nur Seren männlicher Mäuse verwendet. Hierbei ließ sich eine statistisch signifikante Reduktion der Prolactin-Konzentration auf etwa 50 % des wildtyp-Wertes feststellen. Trotz der großen

Schwankungen konnte auch in den weiblichen Mäusen eine Reduktion des Prolactin-Gehalts festgestellt werden. Dieser Abfall war jedoch nicht statistisch signifikant.

Wie bereits beschrieben, war in den TRH-Knockout-Mäusen keine Reduktion der Serum-Prolactin-Konzentrationen feststellbar (Yamada, Saga et al. 1997). Die dennoch detektierte Abnahme der Prolactin mRNA in diesen Mäusen konnte durch eine Gabe von Schilddrüsen-Hormon verhindert werden (Shibusawa, Yamada et al. 2000). Daraus lässt sich schließen, dass die Reduktion der Prolactin-Konzentration eher auf den Hypothyreodismus als auf die fehlende TRH-Stimulation zurückzuführen ist. Unklar ist, warum in den TRH-Knockout-Mäusen keine verringerten Serum-Werte detektiert wurden.

4.6 Die Hypophyse

Morphologie

Wie im TRH-Knockout konnten auch in den TRH-Rezeptor-1-defizienten Mäusen keine Unterschiede bei den somatotropen, corticotropen und gonadotropen Zellen festgestellt werden, weder bei der Anzahl, noch bei der Expressionsstärke.

Lactotrope Zellen

Die Anzahl der lactotropen Zellen war hingegen acht Wochen nach der Geburt deutlich reduziert. Diese Abnahme war in beiden Geschlechtern und sowohl auf einem C57Bl/6- als auch einem 129Sv-genomischen Hintergrund festzustellen. Um langfristige Auswirkungen zu untersuchen, wurden exemplarisch die Hypophysen von zwei eineinhalbjährigen Maus-Böcken präpariert und analysiert. Wieder konnten weder bei den somato-, noch bei den gonado- oder corticotropen Zellen Unterschiede detektiert werden. Bei den lactotropen Zellen war jedoch eine dramatische Reduktion sowohl der Zellzahl als auch der Expressionsstärke feststellbar. Ob es sich hierbei um das Resultat einer progressiven Abnahme der Prolactin-produzierenden Zellen handelte, muss dagegen in weiteren Experimenten bestätigt werden. Da die Reduktion der Prolactin mRNA in der Hypophyse TRH-defizienter Mäuse durch Schilddrüsen-Hormongabe verhindert werden konnte, ist zu schließen, dass auch die beobachtete Abnahme der Zahl der lactotropen Zellen auf den Hypothyreodismus oder auf sekundäre Effekte der niedrigen Schilddrüsen-Hormonkonzentrationen zurückzuführen ist.

Wie bereits erwähnt, konnten in homozygot Rezeptor-defizienten Mäusen keine Probleme während der Schwangerschaft oder der Laktation beobachtet werden. Während dieser Phasen kommt es in der Hypophyse der Mutter zu einer starken Proliferation lactotroper Zellen.

Um die Auswirkung der Laktation auf die lactotropen Zellen TRH-R1-defizienter Mäuse zu untersuchen, wurden Hypophysen aus lactierenden Mäusen präpariert und analysiert. Weder die Anzahl der Zellen, noch die Stärke der Prolactin-Expression war von der wildtyp-Hypophyse unterscheidbar. Somit lässt sich zusammenfassen, dass das Fehlen des TRH-Rezeptor 1 in der Hypophyse aufgrund der fehlenden TRH-Wirkung oder wegen sekundärer Effekte (z. B. Hypothyreodismus) zu einer Reduktion der lactotropen Zellen führt. Die Estradiol-induzierte Hyperproliferation Prolactin-produzierender Zellen während der Schwangerschaft wird dagegen nicht durch das Fehlen von TRH-Signalen beeinflusst.

Thyrotrope Zellen

Bei den thyrotropen Zellen war in beiden Geschlechtern und auf beiden genomischen Hintergründen (C57Bl/6 und 129Sv) eine massive Reduktion der Zellzahl feststellbar. In homozygoten Hypophysen war nur ein Fünftel bis ein Zehntel der in wildtyp-Hypophysen detektierbaren Zellen zu beobachten. Diese Reduktion der Zellzahl konnte auch mit Hilfe der LacZ-Färbung nachgewiesen werden. Zurückzuführen ist die Hypoplasie der thyrotropen Zellen vermutlich auf das Fehlen der trophischen Wirkung von TRH. Die stimulatorische Wirkung niedriger Schilddrüsen-Hormonkonzentrationen kann dieses Defizit offensichtlich nicht kompensieren. Es kann somit geschlossen werden, dass die TRH-Rezeptor-1-vermittelte TRH-Wirkung essentiell für die postnatale Aufrechterhaltung der normalen Funktion thyrotroper Zellen ist, inklusive der normalen Feedback-Regulation des TSH-Gens durch Schilddrüsen-Hormon.

Der TRH-Rezeptor der Hypophyse

Für die Analyse, ob es in der Hypophyse weitere Rezeptoren gibt, die TRH-Signale vermitteln können, wurden Bindungsstudien mit hypophysären Membranpräparationen durchgeführt. Es konnte in Hypophysen TRH-R1-defizienter Mäuse keine TRH-Bindung mehr festgestellt werden. Somit ist bewiesen, dass nur TRH-Rezeptor 1 in der Lage ist, TRH-Signale in der Hypophyse der Maus zu vermitteln.

Um zu verifizieren, dass hypophysäre Zellen TRH-R1-defizienter Mäuse nicht in der Lage sind, auf einen TRH-Stimulus zu reagieren, wurde in einer Hypophysen-Zellkultur bzw. in Hypophysen-Hälften die TSH- bzw. Prolactin-Sekretion nach TRH-Stimulation untersucht.

Wie erwartet, konnte im Überstand homozygoter Hypophysenzellen keine Zunahme der TSH-Sekretion festgestellt werden. In wildtyp-Zellen war dagegen eine Zunahme der Sekretion um den Faktor Drei detektierbar.

Die Prolactin-Freisetzung in TRH-R1-defizienten Zellen war unbeeinflusst von einer TRH-Gabe. Im Gegensatz zur TSH-Sekretion war jedoch auch die Prolactin-Sekretion in wildtyp-Zellen nicht durch TRH stimulierbar. Um zu untersuchen, ob die TRH-Responsivität lactotroper Zellen von einem intakten Zellverband abhängig ist (z. B. bei einer sekundären Induktion über parakrine Substanzen), wurde das Induktionsexperiment in Hypophysen-Hälften wiederholt. Auch in intakten Hypophysen-Hälften konnte keine TRH-induzierte Stimulation der Prolactin-Sekretion festgestellt werden.

Sowohl im Menschen als auch in der Ratte und vielen anderen Spezies wurde die Prolactin-freisetzende Wirkung des TRH beschrieben (Jacobs, Snyder et al. 1971; Hu and Lawson 1994). Um die Diskrepanz zwischen der TRH-Wirkung im Menschen (oder der Ratte) und den Ergebnissen in der Maus zu verstehen, wurde mittels einer Doppel-*in-situ*-Hybridisierung die Kolokalisation des TRH-Rezeptor 1 mit den Hormon-produzierenden Zellen der Hypophyse durchgeführt.

In der Ratte konnte TRH-Rezeptor-1-mRNA neben thyrotropen Zellen auch auf lactotropen und somatotropen Zellen lokalisiert werden (Konaka, Yamada et al. 1997). Diese weitverbreitete Expression des Rezeptors bewirkt, dass bei einer *in situ*-Hybridisierung auf Hypophysenschnitten der Ratte starke Signale zu beobachten sind, die eine nahezu ubiquitäre Verteilung im Vorderlappen aufweisen. In der Maus dagegen zeigten sich nur vereinzelte starke Signale. Diese waren nicht gleichmäßig im Vorderlappen verteilt, sondern traten in Clustern auf und waren vor allem im zentralen Vorderlappen zu finden. Eine solche Verteilung ist typisch für TSH-produzierende Zellen. Die Vermutung einer vor allem thyreotropen Lokalisation des TRH-Rezeptor 1 konnte in den Kolokalisierungsexperimenten bestätigt werden. Alle starken Rezeptor-Expressionssignale ließen sich thyrotropen Zellen zuordnen. Auch umgekehrt zeigten alle thyrotropen Zellen starke TRH-R1-Signale.

Wie erwartet, konnte weder auf gonadotropen, noch auf corticotropen Zellen ein Rezeptor-Signal beobachtet werden.

Dagegen wurde auch auf den meisten somatotropen und lactotropen Zellen keine Rezeptor-Expression gefunden. Nur in einer kleinen Subpopulation (< 1%) dieser Hormon-produzierenden Zellen konnten schwache Rezeptor-Signale detektiert werden. Daneben war auf diesen Kolokalisierungsschnitten eine schwache, aber gleichverteilte Expression auf Zellen zu detektieren, die die Zwischenräume zwischen den großen runden GH- und Prolactin-produzierenden Zellen auszufüllen schienen. Da es sich bei diesen Zellen offensichtlich nicht um Hormon-produzierende handelte, könnten dies Follikulostellar- (FS-)

Zellen sein. Diese Zellen vereinigen Charakteristika von Gliazellen und Makrophagen. Ihren Namen erhielten sie, weil sie follikelartige Strukturen in der Hypophyse bilden. FS-Zellen stellen eine heterogene Population von Zellen dar und können unter anderem durch Phagozytose apoptotischer Zellen zum Umbau der Hypophyse nach Östradiolentzug beitragen (Drewett, Jacobi et al. 1993).

Aufgrund des engen räumlichen Kontakts zu den Hormon-produzierenden Zellen wird eine modulative Funktion der FS-Zellen bei der parakrinen Regulation der Hormon-Sekretion in der Hypophyse diskutiert (Cónsole, Jurado et al. 1999). So konnte gezeigt werden, dass NO, welches von gonadotropen und von FS-Zellen gebildet wird, die Prolactin-Sekretion inhibieren kann (Duvilanski, Zambruno et al. 1995). Sollte die Annahme richtig sein, dass der TRH-Rezeptor 1 von FS-Zellen exprimiert wird, so wäre dies eine Möglichkeit, die Effekte der TRH-Rezeptor-1-Defizienz auf lactotrope Zellen auf eine veränderte parakrine Modulation zurückzuführen.

Ein zweites Phänomen könnte damit ebenfalls erklärt werden: Hypophysen-Schnitte homozygoter Mäuse zeigten im Vergleich zu heterozygoten oder wildtyp-Hypophysen eine veränderte Morphologie. Die Zwischenräume zwischen den Hormon-produzierenden Zellen schienen in einer *Nuclear Fast Red*-Färbung auffallend vergrößert. Ursache dieser Veränderungen könnte eine Hyperproliferation von FS-Zellen sein. Entsprechende Untersuchungen mit FS-Zellmarkern werden zurzeit vorbereitet.

Gegen die Annahme einer TRH-Rezeptor-1-Expression auf FS-Zellen spricht allerdings, dass keine LacZ-Färbung in diesen Zellen sichtbar war. Nur in thyrotropen Zellen ließen sich Färbungssignale detektieren. Es ist zwar nicht auszuschließen, dass die fehlende Detektion auf eine extrem geringe Expression zurückzuführen ist (z. B. bei einer Annahme FS-Zell-spezifischer, stabilisierender Elemente im 3-Strich-nichttranslatierten Bereich des TRH-R1). Nicht auszuschließen ist jedoch auch, dass es sich bei den detektierten *in situ*-Signalen um Artefakte handelt.

Neben der Generierung eines Modellsystems für zentralen Hypothyreodismus sollte durch die homologe Rekombination das Gen der bakteriellen β -Galactosidase anstelle der TRH-R1-Sequenzen in das Genom integriert werden. Die Expression der Galactosidase unter der Kontrolle des endogenen Promotors des TRH-Rezeptor-1-Gens ermöglicht eine hochauflösende Lokalisation TRH-R1-exprimierender Zellen.

4.7 Das TRH-Signalsystem während der Entwicklung

Um einen Eindruck zu gewinnen, welche Funktion TRH während der Entwicklung hat, und welche Rolle TRH-R1 bei der Vermittlung dieser Funktion haben könnte, wurde ergänzend eine *in situ*-Analyse des TRH-Systems zu definierten Zeitpunkten der Embryonalentwicklung durchgeführt. Aus der Literatur war bekannt, dass TRH bzw. seine mRNA sehr früh während der Embryonalentwicklung detektierbar ist. So konnte in der Maus bereits am Tag 12 der Embryonalentwicklung (E12) TRH-Immunreaktivität im Hypothalamus nachgewiesen werden (Faivre-Bauman, Grouselle et al. 1978). In der Ratte wurde ein Auftreten TRH-immunoreaktiver hypothalamischer Neurone in Wellen beschrieben: die erste am Tag E12,5, die zweite und dritte Welle an E13,5 bis 14,5 bzw. E16,5 bis 17,5 (Okamura, Kawano et al. 1991). Die späteren hypophyseotropen Neurone des paraventriculären Nucleus werden hierbei während der dritten Welle (E16,5 bis 17,5) gebildet.

Obwohl die Expression der TSH-Untereinheiten in der sich entwickelnden Adenohypophyse bereits am Tag E11,5 (α -GSU) bzw. E14,5 (β -TSH) detektierbar ist (Japón, Rubinstein et al. 1994), ist eine Beteiligung endogenen TRHs bei der Regulation der basalen TSH-Regulation in der embryonalen und frühen postnatalen Phase sehr unwahrscheinlich. So konnte nachgewiesen werden, dass die erhöhten Plasma-TSH-Werte in hypothyreoten Mäusen bis zum achten Tag nach der Geburt (P8) durch eine Gabe von anti-TRH-Antikörpern nicht beeinträchtigt werden (Theodoropoulos, Braverman et al. 1979). Gleichzeitig konnte gezeigt werden, dass die TRH-mRNA-Konzentration im paraventriculären Nucleus des Hypothalamus bis Tag P7 durch Schilddrüsen-Hormon unbeeinflusst war (Taylor, Gyves et al. 1990). Zusammen mit der Tatsache, dass das hypothalamisch-hypophysäre Portalsystem erst eine Woche nach der Geburt vollständig ausgebildet ist (Fisher, Dussault et al. 1976), kann somit postuliert werden, dass die Hypothalamus-Hypophyse-Schilddrüsenachse frühestens sieben Tage nach der Geburt funktionsfähig ist, und somit keine Auswirkung der TRH-R1-Defizienz auf die Schilddrüsen-Hormonkonzentration in der frühen postnatalen Periode zu erwarten ist.

In situ-Analyse

TRH mRNA konnte bereits am Tag 12,5 der Embryonalentwicklung (E12,5) in einer kleinen Subpopulation hypothalamischer Neurone detektiert werden. In allen anderen Bereiche des Gehirns konnten zu diesem Zeitpunkt keine Signale nachgewiesen werden. Die höchsten Transkript-Konzentrationen wurden jedoch im Trigeminal-Ganglion gefunden. Während der gesamten Embryonalentwicklung konnten starke Signale in diesem Bereich beobachtet

werden. Die Expression in hypothalamischen Bereichen nahm während der Entwicklung kontinuierlich zu und zeigte bereits am Tag E16,5 hohe Transkriptspiegel. Zu diesem Zeitpunkt wurde erstmalig eine Expression von TRH in der tiefen Subplate-Schicht des cerebralen Cortex sichtbar. Bis zum Tag der Geburt (P0) waren nur in dieser cerebralen Schicht TRH-Transkripte detektierbar. Am dritten Tag nach der Geburt konnten, vor allem in frontalen Bereichen, schwach TRH-exprimierende Neuronen auch in der darüber liegenden Schicht VI nachgewiesen werden. Zwei Wochen nach der Geburt zeigte TRH das adulte Verteilungsmuster.

Nur am Tag 16,5 der Embryonalentwicklung konnten auch in der Niere Zellen mit einer starken TRH-Expression beobachtet werden. Zu keinem anderen Zeitpunkt wurden dort Signale detektiert.

TRH-Rezeptor 1 war am Tag E12,5 nur im Rückenmark nachweisbar. Zwei Tage später (E14,5) konnten erste Signale im Cortex beobachtet werden, in dem der Rezeptor in einer medialen Schicht exprimiert wurde. Am Tag E16,5 war neben der medialen auch in der tiefen Subplate-Schicht des Cortex TRH-R1-mRNA nachweisbar. Auch drei Tage nach der Geburt war diese Aufteilung feststellbar: Stark TRH-R1-exprimierende Zellen wurden in der Schicht V und vereinzelt in der tiefen Subplate-Schicht detektiert. Erst zwei Wochen nach der Geburt zeigte der Cortex das adulte Verteilungsmuster mit einer starken Expression in Schicht V und einer mittleren Expression in Schicht VI und der Subplate. Im Subiculum des Hippocampus war ab Tag E16,5 eine Expression nachweisbar.

Eine TRH-Rezeptor-2-Expression wurde erstmalig am Tag E14,5 detektiert und war auf die Medulla und den Caudatus-Putamen-Bereich beschränkt. Am Tag E16,5 wurden die ersten Signale in thalamischem Kerngebieten und im Rückenmark beobachtet. Zwei Tage später konnten auch im Bereich der Colliculi mittlere Hybridisierungssignale gefunden werden. Während der gesamten Embryonalentwicklung und am Tag der Geburt war eine TRH-R2-Expression im Cortex nicht nachweisbar. Drei Tage nach der Geburt (P3) wurden nur im retrosplenialen Bereich des Cortex Transkripte gefunden. Zwei Wochen nach der Geburt (P14) war die corticale Expression auf Zellen in der Subplate-Schicht und einen schmalen Streifen im Bereich zwischen Schicht V und Schicht VI beschränkt. Erst eine Woche später (P21) zeigte TRH-R2 das adulte Verteilungsmuster, das heißt eine gleichmäßige Verteilung mittlerer Signalintensitäten in den Schichten V und VI.

Das TRH-abbauende Ektoenzym (TRH-DE) konnte während der gesamten Embryonalentwicklung und in den Postnatalstadien in all jenen Bereichen detektiert werden,

in denen auch die Rezeptoren gefunden wurden. Zusätzlich war TRH-DE auch im Trigeminalganglion und in einigen Organen nachweisbar.

TRH-R1-Promotor-induzierte β -Galactosidase-Expression in der späten Embryonalphase (E18,5)

In allen Schichten und Kerngebieten, in denen mit Hilfe der *in situ*-Hybridisierung TRH-R1-Transkripte nachgewiesen worden waren, konnte auch eine LacZ-Färbung detektiert werden. Zudem wurden in vereinzelt α -Motoneuronen im tiefen Rückenmark starke Signale beobachtet.

Neben diesen Bereichen, in denen das Vorhandensein von Rezeptortranskripten bereits bekannt war, wurden zusätzliche Expressionsorte gefunden. Die stärkste LacZ-Färbung in der späten Embryonalphase wurde im Choroid-Plexus des Aquädukts und in bestimmten Bereichen des Ependyms des dritten Ventrikels beobachtet. Daneben konnten in einer kleinen Subpopulation von Zellen im Cochlear'schen Gang des Innenohrs (im Bereich der Tektorialmembran) schwache Färbesignale beobachtet werden.

Auch in Randzonen von Knorpelstrukturen des vorderen Kopfbereichs (vor allem mandibuläre Knorpel) konnte eine weiträumige gleichmäßige Verteilung schwach LacZ-exprimierender Zellen gezeigt werden.

Dagegen war im Herzen, in der Leber, im Thymus und im Pankreas keine Färbung nachweisbar.

Funktion des TRH während der Embryonalentwicklung

Da die Hypothalamus-Hypophysen-Schilddrüsen-Achse in der Maus erst nach der Geburt funktionell wird, ist eine endokrine TRH-Funktion während der Embryonalphase unwahrscheinlich. TRH wird während der Entwicklung in der tiefen Subplate-Schicht des cerebralen Cortex exprimiert. Zugleich konnte gezeigt werden, dass auch TRH-Rezeptor-1-Transkripte und eine TRH-R1-Promotor-kontrollierte LacZ-Expression zuerst in einer medialen Schicht, später auch in der tiefen Subplate-Schicht des Cortex nachweisbar sind. Somit ist die Möglichkeit einer trophischen Funktion des cerebralen TRH auf Neuronen in medialen Schichten und/oder Neuronen in der Subplate selbst (autokrin/parakrin) gegeben. Eine solche trophische TRH-Wirkung ist in cerebellaren Neuronen nachgewiesen worden (Casabona, Bruno et al. 1992). Auch in kultivierten ventralen Horn-Zellen des Rückenmarks konnte eine trophische TRH-Wirkung gezeigt werden (Schmidt-Achert, Askanas et al. 1984).

Der in frühen Studien beschriebene positive Effekt einer TRH-Gabe auf Patienten mit amyotroper lateraler Sclerose (ALS) ließ sich hingegen nicht bestätigen (Bradley 1990).

Bei der Annahme, dass TRH im Cortex eine trophische Funktion hat, die über die Bindung an den TRH-Rezeptor 1 vermittelt wird, kann erwartet werden, dass das Fehlen des Rezeptors eine Auswirkung auf die Morphologie des Cortex hat. Es konnte jedoch keine makroskopische Veränderung festgestellt werden. Eine Möglichkeit, das Fehlen einer Veränderung zu erklären, ist die Annahme eines weiteren Rezeptors im Cortex. Da der TRH-Rezeptor 2 während der embryonalen Entwicklung dort nicht nachgewiesen werden konnte, wird diese Funktion eventuell von einem bisher unbekanntem TRH-Rezeptor vermittelt. Es ist aber auch nicht auszuschließen, dass es in den mutanten Mäusen zu subtilen Veränderungen kommt, die nur mit verfeinerten Untersuchungsmethoden nachzuweisen sind. Die wahrscheinlichste Ursache einer fehlenden Veränderung ist jedoch die Annahme einer redundanten TRH-Funktion, da auch in der TRH-Knockout-Maus keine morphologischen Abnormalitäten beschrieben worden sind.

Eine ähnliche Situation ergibt sich für die trigeminale TRH-Expression. Auch in der Forelle *Salmo trutta fario* konnte in sehr frühen Embryonalstadien und in einer hohen Konzentration TRH-Immunoreaktivität im Trigeminalganglion nachgewiesen werden (Diaz, Becerra et al. 2001). Studien in der Ratte haben gezeigt, dass eine TRH-Applikation in die Nähe trigeminaler Motoneuronen eine Zunahme der Masse und der oxidativen Kapazität der Kiefermuskulatur sowie Änderungen der mandibularen Skelett-Struktur hervorrufen kann (Byrd, Sukay et al. 1997; Byrd, Sukay et al. 1998). Deshalb postulierten die Autoren der Untersuchung, dass der trigeminale Motornucleus in der Forelle über eine Freisetzung von TRH direkt in die Morphogenese mastikatorischer Strukturen während der Entwicklung involviert ist. Da über die LacZ-Färbung nachgewiesen werden konnte, dass der TRH-R1 in mandibulären Knorpelstrukturen exprimiert wird, ist die Grundlage einer solchen Funktion prinzipiell gegeben. Dennoch konnte keine offensichtliche Veränderung der Knorpel- oder Skelett-Strukturen im vorderen Kopfbereich beobachtet werden, weder in TRH-R1-, noch in TRH-defizienten Tieren. Auch in diesem Fall erscheint die Annahme einer redundanten TRH-Funktion am wahrscheinlichsten.

Die höchste embryonale β -Galactosidase-Expression wurde im Choroid Plexus (CP) des Aquädukts und in bestimmten Ependym-Bereichen gefunden. Diese Expression ist um ein Vielfaches höher als in den jeweiligen adulten Geweben. Eine TRH-Rezeptorexpression wurde für beide Strukturen bisher nicht beschrieben. Der CP ist eine hochvaskularisierte nichtnervale Epithel-Struktur, die die Grenzfläche zwischen dem Blut und der Cerebrospinal-

Flüssigkeit (CSF) bildet, und somit für den Austausch von Faktoren zwischen dem Gehirn und der Zirkulation essentiell ist. Es konnten im CP Bindungsstellen für eine Reihe von Peptiden festgestellt werden, für die eine regulatorische Funktion postuliert wurde: Es wurden z. B. Bindungsstellen für Insulin (Werther, Hogg et al. 1987), für Vasopressin (Phillips, Abrahams et al. 1988) und für den atrialen natriuretischen Faktor (ANF)(Quirion, Dalpe et al. 1984) gefunden. Der Transport von Schilddrüsen-Hormon (TH) in das Gehirn wird unter anderem durch die Expression TH-bindender Proteine beeinflusst. Ein wichtiges Element dieser Proteine ist das so genannte Transthyretin (TTR). TTR ist hochkonserviert und das einzige TH-bindende Plasma-Protein, das im Gehirn exprimiert wird – von Zellen im Choroid Plexus (Schreiber, Southwell et al. 1995). Es ist vorstellbar, dass TRH durch seine Bindung an den TRH-R1 im CP die Expression von TTR bzw. von anderen TH-bindenden Proteinen moduliert und damit den Transport von Schilddrüsen-Hormon aus der Zirkulation in das Gehirn beeinflusst. Eine Unterversorgung des Gehirns mit Schilddrüsen-Hormon hat fatale Auswirkungen auf die Hirnentwicklung, die makroskopisch sichtbar unter anderem zu einer Veränderung der kortikalen Schichtung und zu einer retardierten cerebellaren Entwicklung führen (Neveu and Arenas 1996). Diese Veränderungen konnten in TRH-R1-defizienten Mäusen nicht detektiert werden. Auch in TTR-defizienten Mäusen konnten weder eine Reduktion des Transports von Schilddrüsen-Hormon in das Gehirn, noch morphologische Veränderungen beobachtet werden (Palha, Hays et al. 1997). Es ist daher anzunehmen, dass der essentielle Transfer von TH in das Gehirn über andere Wege sichergestellt werden kann. Dennoch ist nicht auszuschließen, dass TRH nicht nur die Synthese des Schilddrüsen-Hormons, sondern auch seinen Transport in das Gehirn moduliert.

TRH ist in der fötalen und frühen postnatalen Zirkulation in hohen Konzentrationen nachweisbar (Lombardi, Lupoli et al. 1978). Erst mit dem Auftreten TRH-abbauender Aktivität im Serum fallen die TRH-Konzentrationen drei bis vier Tage nach der Geburt auf nicht detektierbare Werte (Aratan-Spire and Czernichow 1980).

Die Lokalisation des Rezeptors und die Tatsache, dass größere Mengen TRH in der fötalen Zirkulation vorhanden sind, würden somit prinzipiell eine modulative Funktion des TRH auf den Choroid-Plexus (CP) erlauben. Anzeichen einer gestörten CP-Funktion konnten jedoch in TRH-R1-defizienten Mäusen bisher nicht detektiert werden.

Erste Hinweise auf die Funktion des TRH-Rezeptor 1 im Innenohr liegen vor. In Zusammenarbeit mit Dr. J. Smolders, Frankfurt, wurden in Vorexperimenten Hörtests und morphologische Analysen durchgeführt. Analysiert wurden sechs Monate alte weibliche NMRI-Mäuse. In einer TRH-Rezeptor-1-defizienten Maus konnten erhöhte Hörschwellen,

vor allem im hochfrequenten Bereich, festgestellt werden. Eine nachfolgende Analyse zeigte massive Defekte im basalen Bereich des Innenohrs. Zum Teil waren keine Haarzellen mehr nachweisbar. Dagegen wurden im medialen und apikalen Bereich keine Veränderungen gefunden. Da bei diesen Vorexperimenten nur eine homozygote Knockout-Maus untersucht wurde, ist eine Spekulation über die genaue TRH-Funktion während der Entwicklung des Hörapparates verfrüht. In Zusammenarbeit mit Dr. M. Knipper, Tübingen, wird zurzeit die Morphogenese des Innenohrs von TRH-Rezeptor-1-defizienten Mäusen und ihren wildtyp-Geschwistern (mit C57Bl/6 bzw. 129Sv-genetischem Hintergrund) analysiert.

4.8 Das TRH-Signalsystem im adulten ZNS

Bindungsstudien sowie immunhistochemische und immunocytochemische Studien zeigten eine weite Verbreitung der Komponenten des TRH-Signalsystems in extrahypothalamischen Bereichen des zentralen Nervensystems (ZNS). Die Annahme einer Neurotransmitter- bzw. Neuromodulatorfunktion wurde zusätzlich durch eine Reihe pharmakologischer Untersuchungen gestützt. Die auffallende Divergenz zwischen den TRH-Bindungsexperimenten und der *in situ*-Lokalisation des TRH-R1, vor allem in limbischen Strukturen der Ratte (Cortex und Hippocampus), führte zum Postulat einer präsynaptischen Rezeptorlokalisierung und weiter Projektionen des Rezeptors aus septalen Hirnregionen in den Cortex und in den Hippocampus (Calza, Giardino et al. 1992; Heuer, Ehrchen et al. 1998). Die Klonierung eines zweiten TRH-Rezeptors (TRH-R2) und die anschließende *in situ*-histochemische Lokalisierung in der Ratte zeigten ein größtenteils komplementäres Expressionsmuster (Heuer, Schafer et al. 2000). Die Expression des TRH-R2 im Cortex der Ratte (in dem kaum TRH-R1-Transkripte gefunden wurden), führte zu der Annahme, dass die Effekte des TRH auf höhere Hirnfunktionen vor allem durch TRH-R2 vermittelt werden, wohingegen TRH-R1 vor allem die endokrinen und vegetativen Effekte des TRH vermittelt (Heuer, Schafer et al. 2000).

Die Analyse des TRH-Systems in der Maus machte deutlich, dass es vor allem in limbischen Strukturen fundamentale Unterschiede zwischen diesen beiden Spezies gibt. Die Lokalisierung TRH-Rezeptor-1-exprimierender Zellen mittels der TRH-R1-Promotor-kontrollierten lacZ-Expression in heterozygoten Knockout-Mäusen bot dabei mehrere Vorteile: Die Färbung zeigte eine extrem hohe Spezifität. In keinem Bereich des Gehirns von wildtyp-Tieren wurde eine Färbung beobachtet. Aufgrund des farblichen Kontrasts zwischen dem blauen LacZ-Signal und der roten *Nuclear Fast Red* Gegenfärbung konnten auch extrem

schwach gefärbte Zellen detektiert werden. Die Spezifität erlaubte zudem die Unterscheidung zwischen Artefakten und echten Signalen in Regionen mit sehr vereinzelter Expression (z. B. CPU) oder mit einem sehr dichten Zellverband (der oftmals bei *in situ*-Hybridisierungen zu falsch positiven Ergebnissen führt). Ein weiterer Vorteil liegt in der Wahl des Targetingkonstrukts. Der mRNA, die vom mutierten TRH-R1-Gen abgelesen wurde, fehlte nicht nur das gesamte offene Leseraster des Rezeptors, sondern mit der 3-Strich-nichttranslatierten Region auch eine Reihe regulatorischer Elemente. Diese regulatorischen Sequenzen können zu einer Destabilisierung der TRH-R1 mRNA führen. So konnte in Zell-Lysaten gezeigt werden, dass TRH zelltypspezifisch in der Lage ist, den Abbau der TRH-Rezeptor-1-mRNA zu induzieren (Fujimoto, Narayanan et al. 1992). In der gleichen Arbeitsgruppe konnte nachgewiesen werden, dass diese Wirkung durch die Regulation einer RNase-Aktivität vermittelt wird, die spezifisch Sequenzen in der 3-Strich-nichttranslatierten Region erkennt. Die Entfernung dieser Sequenzen führte zu einer drastischen Reduktion der TRH-induzierten Abbaurate (Narayanan, Fujimoto et al. 1992).

Dies bedeutete für die Lokalisierung TRH-R1-exprimierender Zellen, dass Bereiche detektiert werden konnten, in denen aufgrund der induzierten Instabilität der Rezeptor-1-Transkripte kein *in situ*-Signal nachweisbar war. Ein Nachteil des Fehlens der regulatorischen Sequenzen war, dass kein eindeutiger Rückschluss von Färbungsintensitäten auf TRH-R1-Expressionswerte möglich war. Dennoch wurden in Gebieten mit einer hohen TRH-R1-Expressionsdichte auch starke Färbungssignale beobachtet.

Die *in situ*-Analyse der TRH-DE-Expression zeigte in allen ZNS-Bereichen eine sehr gute Übereinstimmung mit den an der Ratte durchgeführten Untersuchungen. Ist die Annahme richtig, dass die zelluläre Verteilung des Enzyms den Ort der TRH-Freisetzung widerspiegelt, so scheint eine übereinstimmende Ausdehnung des TRH-Signalsystems in der Maus und der Ratte vorzuliegen. Die nachfolgend diskutierten Expressionsdaten aus der Ratte wurden Veröffentlichungen entnommen (Calza, Giardino et al. 1992; Heuer, Ehrchen et al. 1998; Heuer, Schafer et al. 2000).

Cortex

Anders als bei der Ratte wird TRH im Cortex der adulten Maus exprimiert, und zwar in der tiefen Subplate-Schicht und in Schicht VI. Aufgrund des Vorkommens von TRH-Immunreaktivität im Cortex wurde für die Ratte postuliert, dass TRH im Cortex aus synaptischen Nervenendigungen freigesetzt wird. In der Maus wird dagegen TRH auch lokal produziert.

TRH-R1 konnte im Cortex der Ratte nur in vereinzelt Neuronen nachgewiesen werden. Aufgrund einer nachweisbaren TRH-Bindung wurde eine weite Projektion und präsynaptische Lokalisation dieses Rezeptors postuliert. Nach der Klonierung des TRH-R2 und seiner Lokalisierung im Cortex wurde angenommen, dass vor allem dieser Rezeptor die corticale TRH-Funktion vermittelt. Im Gegensatz dazu konnte im Cortex der Maus sowohl mit Hilfe der *in situ*-Hybridisierung als auch über die LacZ-Färbung eine starke TRH-R1-Expression beobachtet werden. Die corticale Verteilung der TRH-R2-mRNA in der Maus zeigte das gleiche Muster wie in der Ratte. Somit sind in der Maus beide Rezeptoren in der Lage, TRH-Wirkungen zu vermitteln.

Hippocampus

Frühe TRH-Bindungsstudien zeigten eine hohe Affinität hippocampaler Strukturen (Sharif 1989). Dagegen ist in der Ratte weder TRH-R1, noch TRH-R2 in den pyramidalen Schichten exprimiert. TRH-R1 konnte nur im ventralen Gyrus dentatus und in vereinzelt Neuronen der Stratum lacunare bzw. der Stratum radiatum nachgewiesen werden. TRH-R2 war ausschließlich im Subiculum exprimiert. In der Maus konnte TRH-R2 nur in einer Subpopulation der Zellen des Subiculus und dort nur in geringer Konzentration detektiert werden. Sehr vereinzelt zeigten Zellen in der polymorphen Schicht des Gyrus dentatus Signale. Allerdings war TRH-R1 stark im Subiculum exprimiert.

Ein TRH-R1-*in situ*-Signal ließ sich in den pyramidalen Schichten des Hippocampus nicht nachweisen. Dagegen konnten mit Hilfe der LacZ-Färbung sowohl in der CA1- als auch in der CA2- und CA3-Schicht geringe bis mittlere Signalintensitäten nachgewiesen werden. Somit ist in der Maus eine Projektion und präsynaptische Lokalisation der TRH-Rezeptoren keine notwendige Voraussetzung einer TRH-Wirkung im Hippocampus, und damit einer Modulation höherer Hirnfunktionen.

Cerebellum

Sowohl in der Maus als auch in der Ratte ließ sich eine hohe TRH-DE-Expressionsdichte in der granulären Schicht des Cerebellums nachweisen. Während in der Ratte in der granulären Schicht einzelne Zellen mit starker TRH-Expression beobachtet wurden, konnten in der Maus zu keinem Zeitpunkt und auf keinem Schnitt im Cerebellum TRH-Signale gesehen werden. Auch Signale für den TRH-Rezeptor 2 wurden in der Ratte in vereinzelt Zellen der granulären und molekularen Schicht gefunden. In der Maus war dieser Rezeptor dagegen nicht nachweisbar. TRH-R1 wiederum war im Cerebellum der Ratte nicht nachweisbar.

In der Maus wurde sowohl mittels der *in situ*-Analyse als auch mit Hilfe der LacZ-Färbung TRH-Rezeptor 1 im Flocculus und Paraflocculus des Cerebellums nachgewiesen. Zusätzlich konnten vereinzelte LacZ-Signale in der granulären Schicht der caudalen cerebellaren Lobuli 9 (Uvula) und 10 (Nodulus) und in tiefen cerebellaren Kernen gezeigt werden.

Ein Teil der Neurone aus den vestibulären Kernen projiziert als Moosfasern zum Cerebellum, deren Ausgang über Purkinje-Fasern auf die vestibulären Kerne zurückwirken. Flocculus, Nodulus und Uvula stehen fast ausschließlich im Dienst der vestibulären Informationsverarbeitung und ermöglichen unter anderem die unbewusste Kontrolle der Körperhaltung (Aufrechterhaltung des Gleichgewichts).

TRH ist in diskreten Neuronen des medialen vestibulären Nucleus der Ratte nachgewiesen worden (Calza, Giardino et al. 1992). Eine modulative Funktion von TRH bei der Verarbeitung vestibulärer Signale kann somit nicht ausgeschlossen werden. Im Ratten-Modell einer pharmakologisch-induzierten cerebellaren Ataxie (Instabilität der Körperhaltung) konnte gezeigt werden, dass TRH und TRH-Rezeptor-Agonisten diesen Effekt teilweise aufheben (Kinoshita, Watanabe et al. 1998). Vermittelt wird diese anti-ataxische Wirkung vermutlich über NMDA-Rezeptoren.

Fraglich ist, welche Aufgabe der TRH-Rezeptor 1 bei der Verarbeitung vestibulärer Signale hat. TRH-R1-defiziente Mäuse sind nicht ataxisch. Die ausschließliche Expression des TRH-R1 in Gebieten des Cerebellums, die vestibuläre Afferenzen aufweisen, und das Vorhandensein TRH-positiver Neuronen in vestibulären Kerngebieten legen eine modulative Funktion nahe. Offensichtlich ist diese Funktion jedoch unter normalen physiologischen Bedingungen redundant. Ob die anti-ataxische Wirkung von TRH bei einer pharmakologisch-induzierten Ataxie auf einer TRH-R1-vermittelten Modulation vestibulär-cerebellarer Signalverarbeitung beruht, muss in weiteren Experimenten untersucht werden.

Ventrikel und circumventriculäre Organe (CVOs)

Eine TRH-R1-Promotor-induzierte LacZ-Expression konnte in zwei circumventriculären Organen detektiert werden: der Area postrema und dem Subcommissuralorgan (SCO). Dagegen waren das Subfornicalorgan (SFO), das Organum vasculosum der Lamina terminalis (OVL), die mediane Eminenz und die Neurohypophyse frei von Signalen. Die Expression des TRH-R1 im SCO wurde bisher in keiner anderen Spezies beschrieben.

Das SCO ist eine ependymale Drüse, die unterhalb der posterioren Commissur am Eingang zum cerebralen Aquädukt liegt. Das SCO besteht aus spezialisierten Ependymzellen (Tanyzyten) und sekretiert hochmolekulare Glykoproteine in die Cerebrospinalflüssigkeit

(CSF), in der sie zum so genannten Reissner'schen Faden (RF) aggregieren. Die Blut-Hirn-Schranke ist in diesem CVO aufrechterhalten. Die Funktion des SCO ist weitestgehend obskur. Das Organ ist hochinnerviert durch serotoninerge und peptiderge Faserbahnen aus den Raphe-Kernen (Bouchaud and Bosler 1986). In Zellkulturexperimenten konnte gezeigt werden, dass der RF oder Moleküle, die aus dieser Struktur freigesetzt werden, eine neuronale Aggregation und das Auswachsen von Neuriten induzieren können (Monnerie, Dastugue et al. 1997). Es wurde postuliert, dass der RF-Komplex Zell-Zell-Wechselwirkungen während der Entwicklung des zentralen Nervensystems modulieren könnte. Im Menschen ist das SCO nur während der Embryonalphase vorhanden. Im Rind konnte die Expression von Transthyretin im SCO nachgewiesen werden (E. M. Rodriguez, persönliche Kommunikation). In der Ratte wurde gezeigt, dass die Feedback-Kontrolle der TRH-Expression durch Schilddrüsen-Hormon nicht nur auf den Hypothalamus beschränkt ist, sondern auch in den Raphe-Kernen nachweisbar ist (Yang, Yuan et al. 1999).

Somit wäre es möglich, dass TRH aus den Raphe-Kernen die RF-Produktion und/oder die Transthyretin-vermittelte Aufnahme von Schilddrüsen-Hormon in das Gehirn moduliert.

Eine spezifische und lokal begrenzte LacZ-Expression konnte zudem in bestimmten Bereichen des Ependyms beobachtet werden, das die Ventrikel auskleidet. Die prominenteste Färbung war im medialen Bereich des lateralen Ventrikels zu beobachten, im Ependym das der Fimbria des Hippocampus aufliegt. In diesem Bereich konnte auf sagittalen und frontalen Schnitten eine Ameisenspur-artige Expression aller Ependymzellen beobachtet werden. Dagegen war die gegenüberliegende Ependymschicht, die der so genannten Subependymalen Zone (SEZ) aufliegt, frei von Signalen. Die Bildung einer funktionellen Einheit dieses Ependymbereichs wurde bisher nicht beschrieben. Eine Funktion des Rezeptors bei der Modulation des Stoffaustauschs zwischen der CSF und bestimmten Gehirnbereichen erscheint wahrscheinlich. Warum der Rezeptor nur in bestimmten (vor allem hippocampalen) Regionen exprimiert wird, kann dagegen nicht erklärt werden.

4.9 Postscriptum

„Mäuse sind keine Ratten“. Diese Erkenntnis, die jeder seinem gesunden Menschenverstand entnehmen kann, gilt für endokrinologische Untersuchungen im Besonderen. Hinzuzufügen wäre, dass die Maus auch kein Mensch ist. Als hätte man es nicht geahnt...

Die Maus wird aufgrund der Möglichkeit, eine veränderte Genfunktion zu erzeugen und im lebenden Tier zu analysieren, immer mehr zum bevorzugten Modelltier der

endokrinologischen Forschung – nach Jahrzehnten der Ratten-Dominanz. Aus den beschriebenen Untersuchungen muss geschlossen werden, dass sich die Maus nur bedingt als Modell eignet, da es deutliche Unterschiede zwischen der Maus auf der einen und der Ratte (und dem Menschen) auf der anderen Seite gibt. Daraus resultiert, dass bestimmte Ergebnisse nicht oder nur bedingt von der Maus auf den Menschen (oder die Ratte) übertragbar sind.

Die Analyse der TRH-R1-Knockout-Mäuse konnte eine Reihe postulierter TRH-Funktionen bestätigen. Daneben hat sie neue Fragen aufgeworfen und neue Funktionen ins Spiel gebracht: TRH und der Hörapparat, TRH und die Körperhaltung, TRH und die Blut-Hirn-Schranke. Die biologische Bedeutung und potenzielle therapeutische Relevanz des Signalpeptids TRH bei der Modulation sensorischer, lokomotorischer und kognitiver Funktionen ist noch weit entfernt von einer klaren Definition. Das in dieser Arbeit generierte Modelltier und seine bisherige und zukünftige Analyse sind ein kleiner Schritt auf dem Weg dorthin.

5 Zusammenfassung

Thyrotropin-releasing hormone, TRH, stimuliert als hypothalamisch-hypophysäres Neuropeptidhormon die Freisetzung von Thyreotropin (TSH) und damit die Funktion der Schilddrüse. Im zentralen Nervensystem (ZNS) wirkt TRH außerhalb der hypophysiotropen Regionen des Hypothalamus als Neurotransmitter bzw. Neuromodulator. Während die endokrine Funktion des TRH durch den TRH-Rezeptor 1 vermittelt wird, werden TRH-Signale im ZNS durch TRH-Rezeptor 1 und den kürzlich entdeckten TRH-Rezeptor 2 vermittelt.

Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurde der TRH-Rezeptor 1 durch homologe Rekombination in embryonalen Stammzellen gezielt inaktiviert (Knockout). Homozygot TRH-R1-defiziente Mäuse werden annähernd mit der erwarteten Mendel'schen Frequenz geboren und sind nach der Geburt nicht von ihren wildtyp-Geschwistern zu unterscheiden. In ihrer weiteren Entwicklung zeigen sie eine verzögerte Gewichtszunahme und eine verminderte Körpertemperatur. Zurückzuführen ist dies vor allem auf einen milden tertiären Hypothyreodismus. Als Folge der ungenügenden Induktion von Schilddrüsen-Hormon und einer unzureichenden zentralen Temperatur-Regulation sind TRH-R1-Knockout-Mäuse nicht in der Lage, eine Kälteexposition (4 °C) zu tolerieren, sondern sterben nach wenigen Stunden. Im Gegensatz zu den Schilddrüsen-Hormonkonzentrationen ist der TSH-Serumgehalt homozygoter Mäuse unverändert. Dennoch lässt sich in Hypophysen mutanter Tiere eine drastische Reduktion der Zahl der thyotropen Zellen feststellen. Auch die Anzahl der lactotropen Zellen ist in solchen Hypophysen reduziert. Gleichzeitig ist die Prolactin-Serumkonzentration vermindert. Alle weiteren hormonproduzierenden Zellen sind dagegen unverändert. In Hypophysen mutanter Mäuse ist keine TRH-Bindung mehr festzustellen, d. h. TRH-R1 ist der einzige TRH-Rezeptor in der Hypophyse. Entsprechend sind TRH-R1-defiziente hypophysäre Zellen nicht mehr in der Lage, auf einen TRH-Stimulus mit der Freisetzung von TSH oder Prolactin zu reagieren. Überraschenderweise konnte selbst in wildtyp-Hypophysen keine Prolactin-Sekretion stimuliert werden. Die Ursache für dieses Phänomen lieferte eine nachfolgende Kollokalisations-Analyse: Im Gegensatz zu der Situation beim Menschen oder der Ratte konnte TRH-R1 fast ausschließlich auf thyotropen Zellen lokalisiert werden, wohingegen lactotrope und somatotrope Zellen weitestgehend ohne Signale waren.

Die Lokalisation des TRH-Rezeptor-1 im ZNS der Maus ergab deutliche Unterschiede zur Verteilung in der Ratte. Insbesondere konnte eine Expression in limbischen Arealen detektiert werden. Somit ist in der Maus eine funktionale Trennung der vermittelten TRH-Wirkungen durch TRH-R1 bzw. durch TRH-R2 in endokrine/vegetative Wirkungen (Rezeptor 1) und Modulation höherer Hirnfunktionen (Rezeptor 2) nicht möglich.

Während der Entwicklung und zum Teil auch im adulten Tier ließ sich TRH-R1 in Strukturen nachweisen, die die Grenze zwischen der Zirkulation und dem Gehirn bilden. So konnten starke TRH-R1-Signale im embryonalen Choroid Plexus und im Ventrikel-Ependym detektiert werden. Da TRH während der Entwicklung in hoher Konzentration in der fötalen Zirkulation nachweisbar ist, kann angenommen werden, dass TRH-Signale die Funktion dieser Strukturen modulieren.

Zusätzlich ist TRH in frühen Entwicklungsstadien im Trigeminalganglion der Maus exprimiert. Da gleichzeitig TRH-R1 in mandibulären Knorpelstrukturen nachgewiesen werden konnte, wäre es möglich, dass TRH-Signale bei der Modulation der Morphogenese des vorderen Kopfbereichs beteiligt sind. In der Ratte ist eine solche Modulation in TRH-Injektionsexperimenten nachgewiesen worden (Byrd et al., *J Dent Res* **76**(8): 1437-52 (1997) und Byrd et al., *Arch Oral Biol* **43**(9): 711-16 (1998)). Bisher konnten jedoch keine Hinweise auf eine pathologische Morphogenese in TRH-R1-defizienten Mäusen gefunden werden.

Auch im sich entwickelnden Innenohr konnte eine TRH-R1-Expression nachgewiesen werden. Erste Ergebnisse deuten auf eine Beteiligung von TRH-Signalen bei der Morphogenese oder Aufrechterhaltung cochlearer Strukturen, vor allem im basalen Bereich, hin.

Im Cerebellum ist die Expression von TRH-R1 auf Bereiche beschränkt, die eine vestibuläre Innervation aufweisen. Da TRH in vestibulären Kerngebieten nachgewiesen worden ist, könnte dies ein Hinweis darauf sein, dass TRH-Signale bei der Aufrechterhaltung der Körperhaltung beteiligt sind. In weiteren Experimenten muss untersucht werden, ob die anti-ataxische Wirkung von TRH (bei einer pharmakologisch induzierten Ataxie) auf einer TRH-R1-vermittelten Modulation vestibulär-cerebellarer Signalverarbeitung beruht.

Schlagnworte: TRH-Rezeptor-1-Knockout; tertiärer Hypothyreodismus; Kälteexposition; zentrales Nervensystem; Morphogenese

6 Abstract

Thyrotropin-releasing hormone (TRH) acts as a hypothalamic hypophyseotropic releasing factor that stimulates the release of the adenohipophyseal hormone *thyroid-stimulating hormone* (TSH) and thus the secretion of thyroid hormone. This action is mediated by the G-protein coupled receptor TRH-R1 localized on thyrotropic cells of the anterior pituitary. In the central nervous system (CNS) TRH acts as a neurotransmitter or neuromodulator. This central action is mediated by TRH-R1 and the newly discovered TRH-R2. The aim of this work was the generation and analysis of a mouse with a targeted deletion (knockout) of TRH-R1.

Homozygous TRH-R1-deficient mice were born at an approximately expected Mendelian frequency and were viable through adulthood. Initial inspection revealed no gross anatomical or functional abnormalities. Observed phenotypic characteristics included retarded weight gain and a reduced body temperature due to reduced thyroid hormone levels. As a consequence of their tertiary hypothyroidism and an impaired central temperature control homozygous mutant mice were unable to cope with cold exposure when exposed to 4 °C for 4 hours. In contrast to thyroid hormone levels TSH-serum levels are unaffected. Nevertheless, there is a 5- to 10-fold reduction in thyrotrope cell number. Lactotropic cells are also reduced although to a lesser degree. Consistent with this are the reduced serum-Prolactin levels. All other hormone producing cells seem to be unaffected. In homozygous TRH-R1-deficient pituitaries there is no TRH-binding. Thus, pituitary cells are unable to respond to a TRH-stimulus, as stimulated TSH or Prolactin-secretion was not detectable in cells of homozygous mice. Unexpectedly the same missing Prolactin-response was detectable in the wildtype. This could be explained by a colocalisation study that showed the preferential localisation of TRH-R1 on thyrotropes. On most lactotropes and somatotropes signals were missing.

TRH-R1-distribution in mouse brain showed major differences as compared to rat. In particular, receptor 1 expression signals were detected in limbic structures of mice but not of rats. It can be concluded that in mouse a differentiation between an endocrine/vegetative TRH-effect mediated by TRH-R1 and a modulation of higher brain functions mediated by TRH-R2 cannot be made.

During development and in the adult, TRH-R1 was detectable in structures forming the blood-brain-barrier. Strong signals were detected in the embryonal choroid plexus and in ventricular ependymal cells. As TRH is detectable in high concentrations during development in fetal circulation, it could be postulated that TRH signalling might modulate the function of these structures. This idea is supported by experiments in rat showing such modulation after TRH-injection (Byrd et al., *J Dent Res* **76**(8): 1437-52 (1997) and Byrd et al., *Arch Oral Biol* **43**(9): 711-16 (1998)). Nevertheless, up to now distorted morphogenesis could not be shown in TRH-R1-deficient mice. Certain structures of the inner ear showed weak TRH-R1 expression in the late embryonic stage. Preliminary data suggest participation of TRH-signals in inner ear development or function, especially in basal areas.

The observed expression of TRH-R1 in cerebellar structures exhibiting vestibular afferences points to a participation of TRH-signals in maintaining posture. This assumption is strengthened by the observation of TRH in vestibular nuclei. Further experiments have to show whether the anti-ataxic effect of TRH (in models of pharmacological induced ataxia) is based on a TRH-R1 mediated modulation of vestibulo-cerebellar signal processing.

Keywords: TRH-receptor-1 knockout; tertiary hypothyroidism; cold exposure; central nervous system; morphogenesis.

7 Literatur

- Aragay, A. M., A. Katz, et al. (1992). "The G alpha q and G alpha 11 proteins couple the thyrotropin-releasing hormone receptor to phospholipase C in GH3 rat pituitary cells." *J Biol Chem* **267**(35): 24983-8.
- Aratan-Spire, S. and P. Czernichow (1980). "Thyrotropin-releasing hormone-degrading activity of neonatal human plasma." *J Clin Endocrinol and Metabolism* **50**: 88-92.
- Aratan-Spire, S., B. Wolf, et al. (1984). "Developmental pattern of TRH-degrading activity and TRH content in rat pancreas." *Acta Endocrinologica* **106**: 102-108.
- Arey, B. J. and M. E. Freeman (1989). "Hypothalamic factors involved in the endogenous stimulatory rhythm regulating prolactin secretion." *Endocrinology* **124**(2): 878-83.
- Arey, B. J. and M. E. Freeman (1990). "Oxytocin, vasoactive-intestinal peptide, and serotonin regulate the mating-induced surges of prolactin secretion in the rat." *Endocrinology* **126**(1): 279-84.
- Banerji, A. and C. Prasad (1982). "In vivo autoregulation of rat adenohypophyseal thyrotropin-releasing hormone receptor." *Life Sci* **30**(26): 2293-9.
- Bauer, K. (1987). "Adenohypophyseal degradation of thyrotropin releasing hormone regulated by thyroid hormones." *Nature* **330**(6146): 375-7.
- Bauer, K. (1989). Multihormonal regulation of thyrotropin releasing hormone-degrading ectoenzyme from rat anterior pituitary. *Recent advances in basic and clinical neuroendocrinology*. F. F. C. a. C. Dieguez, Elsevier Science Publ.: 135-140.
- Bauer, K. (1994). "Purification and characterization of the thyrotropin-releasing hormone-degrading ectoenzyme." *Eur. J. Biochem.* **224**: 387-396.
- Bauer, K., P. Carmeliet, et al. (1990). "Regulation and cellular localization of the membrane-bound thyrotropin-releasing hormone-degrading enzyme in primary cultures of neuronal, glial and adenohypophyseal cells." *Endocrinology* **127**: 1224-1233.
- Bauer, K. and P. Nowak (1979). "Characterization of a thyroliberin-degrading serum enzyme catalyzing the hydrolysis of thyroliberin at the pyroglutamyl-histidine bond." *Eur J Biochem* **99**(2): 239-46.
- Benicky, J. and V. Strbak (2000). "Glucose stimulates and insulin inhibits release of pancreatic TRH in vitro." *Eur. J. Endocrinol.* **142**: 60-65.
- Boler, J., F. Enzmann, et al. (1969). "The identity of chemical and hormonal properties of the thyrotropin releasing hormone and pyroglutamyl-histidyl-proline amide." *Biochem Biophys Res Commun* **37**(4): 705-10.
- Bouchaud, C. and O. Bosler (1986). "The circumventricular organs of the mammalian brain with special reference to monoaminergic innervation." *Int Rev Cytol* **105**: 283-327.
- Bowers, C. Y., H. G. Friesen, et al. (1971). "Prolactin and thyrotropin release in man by synthetic pyroglutamyl-histidyl-prolinamide." *Biochem Biophys Res Comm* **45**(4): 1033-1041.
- Bradley, A. (1987). Production and analysis of chimeric mice. *Teratocarcinomas and embryonic stem cells, a practical approach*, Robertson EJ (ed). IRL Press, Oxford: pp 113 - 151.
- Bradley, W. G. (1990). "Critical review of gangliosides and thyrotropin-releasing hormone in peripheral neuromuscular diseases." *Muscle & Nerve* **13**(9): 833-842.
- Burgus, R., T. F. Dunn, et al. (1969). "[Molecular structure of the hypothalamic hypophysiotropic TRF factor of ovine origin: mass spectrometry demonstration of the PCA-His-Pro-NH₂ sequence]." *C R Acad Sci Hebd Seances Acad Sci D* **269**(19): 1870-3.
- Burt, D. R. (1979). "Thyrotropin releasing hormone: apparent receptor binding in retina." *Exp Eye Res* **29**(4): 353-65.
- Burt, D. R. and S. H. Snyder (1975). "Thyrotropin releasing hormone (TRH): apparent receptor binding in rat brain membranes." *Brain Res* **93**: 309-328.
- Burt, D. R. and R. L. Taylor (1980). "Binding sites for thyrotropin-releasing hormone in sheep nucleus accumbens resemble pituitary receptors." *Endocrinology* **106**(5): 1416-1423.
- Byrd, K. E., M. J. Sukay, et al. (1997). "Craniofacial and TMJ effects after glutamate and TRH microsphere implantation in proximity to trigeminal motoneurons of growing rats." *J Dent Res* **76**(8): 1437-52.
- Byrd, K. E., M. J. Sukay, et al. (1998). "Oxidative capacity of rat masseter muscle after implantation of thyrotropin-releasing hormone microspheres in proximity to trigeminal motoneurons." *Arch Oral Biol* **43**(9): 711-6.
- Calza, L., L. Giardino, et al. (1992). "Distribution of thyrotropin-releasing hormone receptor messenger RNA in the rat brain: an in situ hybridization study." *Neuroscience* **51**(4): 891-909.
- Cao, J., D. O'Donnell, et al. (1998). "Cloning and characterization of a cDNA encoding a novel subtype of rat thyrotropin-releasing hormone receptor." *J. Biol. Chem.* **273**: 32281-32287.
- Capecchi, M. R. (1989). "Altering the genome by homologous recombination." *Science* **244**(4910): 1288-92.

- Carnell, N. E., P. Feng, et al. (1992). "Preprothyrotropin-releasing hormone mRNA and TRH are present in the rat heart." *Neuropeptides* **22**(4): 209-12.
- Casabona, G., V. Bruno, et al. (1992). "Thyrotropin releasing hormone (TRH) and its analog, RGH-2202, accelerate maturation of cerebellar neurons in vitro." *Developmental Brain Research* **69**: 179-183.
- Collu, R., J. Q. Tang, et al. (1997). "A novel mechanism for isolated central hypothyroidism - inactivating mutations in the thyrotropin-releasing-hormone receptor gene." *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* **82**(5): 1561-1565.
- Cónsole, G. M., S. B. Jurado, et al. (1999). "Morphologic aspects of paracrine interactions between endocrine and folliculostellate cells in the rat adenohypophysis." *Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology* **7**(2): 142-149.
- Czekay, G. and K. Bauer (1993). "Identification of the thyrotropin-releasing-hormone-degrading ectoenzyme as a metallopeptidase." *Biochem J* **290** (Pt 3): 921-6.
- De la Pena, P., L. M. Delgado, et al. (1992). "Cloning and expression of the thyrotropin-releasing hormone receptor from GH₃ rat anterior pituitary cells." *Biochem J* **284**: 891-899.
- de la Pena, P., L. M. Delgado, et al. (1992). "Two isoforms of the thyrotropin-releasing hormone receptor generated by alternative splicing have indistinguishable functional properties." *J Biol Chem* **267**(36): 25703-25708.
- DeLean, A., L. Ferland, et al. (1977). "Modulation of pituitary thyrotropin releasing hormone receptor levels by estrogens and thyroid hormones." *Endocrinology* **100**(6): 1496-1504.
- Diaz, M. L., M. Becerra, et al. (2001). "Development of thyrotropin-releasing hormone immunoreactivity in the brain of the brown trout *Salmo trutta fario*." *J Comp Neurol* **429**(2): 299-320.
- Drewett, N., J. M. Jacobi, et al. (1993). "Apoptosis in the anterior pituitary gland of the rat: studies with estrogen and bromocriptine." *Neuroendocrinology* **57**: 89-95.
- Duthie, S. M., P. L. Taylor, et al. (1993). "Cloning and functional characterisation of the human TRH receptor." *Mol Cell Endocrinol* **95**: R11-R15.
- Duthie, S. M., P. L. Taylor, et al. (1993). "Characterization of the mouse thyrotrophin-releasing hormone receptor gene: an exon corresponds to a deletion in the rat cDNA." *J Mol Endocrinol* **11**(2): 141-9.
- Dutour, A., P. Giraud, et al. (1987). "Ontogenesis of TRH mRNA in the rat pancreas." *Biochemical and Biophysical Research Communications* **146**(1): 354-360.
- Duvilanski, B. H., C. Zambruno, et al. (1995). "Role of nitric oxide in control of prolactin release by the adenohypophysis." *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**(1): 170-4.
- Elmore, M. A., E. C. Griffiths, et al. (1990). "Further characterization of the substrate specificity of a TRH hydrolysing pyroglutamate aminopeptidase from guinea-pig brain." *Neuropeptides* **15**: 31-36.
- Emerson, C. H. and C. F. Wu (1987). "Thyroid status influences rat serum but not brain TRH pyroglutamyl aminopeptidase activities." *Endocrinology* **120**(3): 1215-1217.
- Faivre-Bauman, A., D. Grouselle, et al. (1978). "Ontogenesis of thyroliberin in the mouse hypothalamus." *Brain Res* **154**(2): 382-7.
- Fischer, W. H. and J. Spiess (1987). "Identification of a mammalian glutaminyl cyclase converting glutaminyl into pyroglutamyl peptides." *Proc Natl Acad Sci USA* **84**: 3628-3632.
- Fisher, D. A., J. H. Dussault, et al. (1976). "Ontogenesis of hypothalamic--pituitary--thyroid function and metabolism in man, sheep, and rat." *Recent Prog Horm Res* **33**: 59-116.
- Fomina, A. F. and E. S. Levitan (1995). "3 phases of trh-induced facilitation of exocytosis by single lactotrophs." *Journal of Neuroscience* **15**(7): 4982-4991.
- Friedman, T. C. and S. Wilk (1986). "Delineation of a particulate thyrotropin-releasing hormone-degrading enzyme in rat brain by the use of specific inhibitors." *J Neurochem* **46**: 1231-1239.
- Fujimoto, J., C. S. Narayanan, et al. (1992). "Mechanism of regulation of thyrotropin-releasing hormone receptor messenger ribonucleic acid in stably transfected rat pituitary cells." *Endocrinology* **130**: 1879-1884.
- Fukusumi, S., K. Ogi, et al. (1995). "Distribution of thyrotropin-releasing-hormone receptor messenger-rna in rat peripheral-tissues." *Regulatory Peptides* **57**(2): 115-121.
- Furusawa, A., K. Morise, et al. (1992). "Effect of luminal administration of thyrotropin-releasing hormone or somatostatin on gastric pH and interaction of these peptides in rats." *Gastroenterol Jpn* **27**(2): 165-71.
- Gala, R. S. (1990). "The physiology and mechanisms of the stress-induced changes in prolactin secretion in the rat." *Life Sciences* **46**: 1407-1420.
- Gautvik, K. M., A. H. Tashjian, Jr., et al. (1974). "Thyrotropin-releasing hormone is not the sole physiologic mediator of prolactin release during suckling." *N Engl J Med* **290**(21): 1162-5.
- Gershengorn, M. C. and R. Osman (1996). "Molecular and cellular biology of thyrotropin-releasing-hormone receptors." *Physiological Reviews* **76**(1): 175-191.
- Gossler, A. and J. Zachago (1993). Gene and enhancer trap screens in ES cell chimeras. *Gene Targeting, A Practical Approach*. A. L. J. (ed.): pp. 181 - 228.
- Grant, G., W. Vale, et al. (1973). "Characteristics of the pituitary binding sites for thyrotropin-releasing factor." *Endocrinology* **92**(6): 1629-1633.

- Griffiths, E. C. (1985). "Thyrotrophin releasing hormone: endocrine and central effects." *Psychoneuroendocrinol* **10**(3): 225-235.
- Harris, A. R., D. Christianson, et al. (1978). "The physiological role of thyrotrophin-releasing hormone in the regulation of thyroid-stimulating hormone and prolactin secretion in the rat." *J Clin Invest* **61**(2): 441-8.
- Hernandez, D. E., C. B. Nemeroff, et al. (1984). "Neurotensin-induced antinociception and hypothermia in mice: antagonism by TRH and structural analogs of TRH." *Regul Pept* **8**(1): 41-9.
- Heuer, H., J. Ehrchen, et al. (1998). "Region-specific expression of thyrotrophin-releasing hormone-degrading ectoenzyme in the rat central nervous system and pituitary gland." *Eur J Neurosci* **10**(4): 1465-78.
- Heuer, H., M. K. Schafer, et al. (2000). "Expression of thyrotrophin-releasing hormone receptor 2 (TRH-R2) in the central nervous system of rats." *J Comp Neurol* **428**(2): 319-36.
- Hinkle, P. M. (1989). "Pituitary TRH receptors." *Ann NY Acad Sci* **553**: 176-187.
- Hinkle, P. M., E. J. Nelson, et al. (1996). "Characterization of the calcium response to thyrotrophin-releasing-hormone in lactotrophs and gh cells." *Trends in Endocrinology and Metabolism* **7**(10): 370-374.
- Holaday, J. W., L. F. Tseng, et al. (1978). "Thyrotrophin releasing hormone antagonizes beta endorphin hypothermia and catalepsy." *Life Sci* **22**(17): 1537-44.
- Horita, A., M. A. Carino, et al. (1986). "Pharmacology of thyrotrophin-releasing hormone." *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **26**: 311-32.
- Hsieh, K. P. and T. F. J. Martin (1992). "Thyrotrophin-releasing hormone and gonadotropin-releasing hormone receptors activate phospholipase C by coupling to the guanosine triphosphate-binding proteins Gq and G11." *Molecular Endocrinology* **6**: 1673-1681.
- Hu, L. M. and D. Lawson (1994). "Prolactin-release from subpopulations of rat lactotrophs in response to thyrotrophin-releasing-hormone." *Endocrine* **2**(8): 703-708.
- Itadani, H., T. Nakamura, et al. (1998). "Cloning and characterization of a new subtype of thyrotrophin-releasing hormone receptors." *Biochem Biophys Res Commun* **250**(1): 68-71.
- Jacobs, L. S., P. J. Snyder, et al. (1971). "Increased serum prolactin after administration of synthetic thyrotrophin releasing hormone (TRH) in man." *J Clin Endocrinol* **33**: 996-998.
- Japón, M. A., M. Rubinstein, et al. (1994). "In situ hybridization analysis of anterior pituitary hormone gene expression during fetal mouse development." *Journal of Histochem & Cytochem* **42**(8): 1117-1125.
- Johnson, W. A., N. M. Nathanson, et al. (1989). "Receptor binding and characterization of TRH receptors." *Ann NY Acad Sci* **553**: 137-46.
- Joyner, A. L., W. C. Skarnes, et al. (1989). "Production of a mutation in mouse En-2 gene by homologous recombination in embryonic stem cells." *Nature* **338**(6211): 153-6.
- Kawano, H., S. Daikoku, et al. (1983). "Location of thyrotrophin-releasing hormone-like immunoreactivity in rat pancreas." *Endocrinology* **112**(3): 951-5.
- Kimura, N., K. Arai, et al. (1994). "Estradiol transcriptionally and posttranscriptionally up-regulates thyrotrophin-releasing hormone receptor messenger ribonucleic acid in rat pituitary cells." *Endocrinology* **134**(1): 432-40.
- Kinoshita, K., Y. Watanabe, et al. (1998). "TRH receptor agonists ameliorate 3-acetylpyridine-induced ataxia through NMDA receptors in rats." *European Journal of Pharmacology* **343**(2-3): 129-133.
- Konaka, S., M. Yamada, et al. (1997). "Expression of thyrotrophin-releasing-hormone (trh) receptor messenger-rna in somatotrophs in the rat anterior-pituitary." *Endocrinology* **138**(2): 827-830.
- Kulkarni, R. N., Z. L. Wang, et al. (1995). "Pyroglutamyl-phenylalanyl-proline amide attenuates thyrotrophin-releasing hormone-stimulated insulin secretion in perfused rat islets and insulin-secreting clonal beta-cell lines." *Endocrinology* **136**(11): 5155-64.
- Le Mouellic, H., Y. Lallemand, et al. (1990). "Targeted replacement of the homeobox gene Hox-3.1 by the Escherichia coli lacZ in mouse chimeric embryos." *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**(12): 4712-6.
- Le Mouellic, H., Y. Lallemand, et al. (1992). "Homeosis in the mouse induced by a null mutation in the Hox-3.1 gene." *Cell* **69**(2): 251-64.
- Lechan, R. M., P. Wu, et al. (1986). "Thyrotrophin-releasing hormone precursor: Characterization in rat brain." *Science* **231**: 159-161.
- Leduque, P., S. Aratan-Spire, et al. (1989). "Coexistence of thyrotrophin-releasing hormone and insulin in cultured fetal rat islets: a light and electron microscopic immunocytochemical study during islet neof ormation." *Biol Cell* **66**(3): 291-6.
- Leduque, P., B. Wolf, et al. (1985). "Immunocytochemical location of thyrotrophin-releasing hormone (TRH) in the B-cells of adult hypothyroid rat pancreas." *Regulatory Peptides* **10**: 281-292.
- Lin, M. T. (1982). Metabolic, respiratory and body temperature responses to TRH, angiotensin II, substance P, neurotensin, somatostatin, LHRH, beta-endorphin, oxytocin or vasopressin in the rat. *Current Status of Centrally Active Peptides*, ed. B. N. Dhawan, Oxford: Pergamon: pp. 229-51.
- Lombardi, G., G. Lupoli, et al. (1978). "Plasma immunoreactive thyrotrophin releasing hormone (TRH) values in normal newborns." *J Endocrinol Invest* **1**(1): 69-72.
- Manaker, S., A. Winokur, et al. (1985). "Autoradiographic localization of thyrotrophin-releasing hormone receptors in the rat central nervous system." *J Neurosci* **5**(1): 167-174.

- Mansour, S. L., K. R. Thomas, et al. (1988). "Disruption of the proto-oncogene int-2 in mouse embryo-derived stem cells: a general strategy for targeting mutations to non-selectable genes." *Nature* **336**(6197): 348-52.
- Mansouri, A. (1998). Gene Targeting by Homologous Recombination in Embryonic Stem Cells. *CELL BIOLOGY: A LABORATORY HANDBOOK*, Academic Press. **Vol. 3**.
- Mantyh, P. W. and S. P. Hunt (1985). "Thyrotropin-releasing hormone (TRH) receptors." *J Neurosci* **5**(2): 551-561.
- Matre, V., H. E. Karlsen, et al. (1993). "Molecular cloning of a functional human thyrotropin-releasing hormone receptor." *Biochem Biophys Res Commun* **195**(1): 179-85.
- Metcalf, G. and P. W. Dettmar (1981). "Is thyrotropin releasing hormone an endogenous ergotropic substance in the brain?" *The Lancet* **March 14**: 586-589.
- Monnerie, H., B. Dastugue, et al. (1997). "Reissner's fibre promotes neuronal aggregation and influences neuritic outgrowth in vitro." *Cell Tissue Res* **287**(2): 285-95.
- Morley, J. E. (1979). "Extrahypothalamic thyrotropin releasing hormone (TRH) - its distribution and its functions." *Life Sciences* **25**(18): 1539-1550.
- Morley, J. E., T. J. Garvin, et al. (1977). "Thyrotropin-releasing hormone in the gastrointestinal tract." *Biochem Biophys Res Comm* **79**(1): 314-318.
- Morley, J. E., A. S. Levine, et al. (1982). "Neuropeptides and thermoregulation: the interactions of bombesin, neurotensin, TRH, somatostatin, naloxone and prostaglandins." *Peptides* **3**(1): 1-6.
- Nagy, A., J. Rossant, et al. (1993). "Derivation of completely cell culture-derived mice from early-passage embryonic stem cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**(18): 8424-8.
- Nagy, A., M. Sass, et al. (1989). "Systematic non-uniform distribution of parthenogenetic cells in adult mouse chimaeras." *Development* **106**(2): 321-4.
- Narayanan, C. S., J. Fujimoto, et al. (1992). "Regulation by thyrotropin-releasing hormone (TRH) of TRH receptor mRNA degradation in rat pituitary GH3 cells." *J Biol Chem* **267**(24): 17296-17303.
- Nemeroff, C. B., P. W. Kalivas, et al. (1984). "Behavioural effects of hypothalamic hypophysiotropic hormones, neurotensin, substance P and other neuropeptides." *Pharmac Ther* **24**: 1-54.
- Neveu, I. and E. Arenas (1996). "Neurotrophins promote the survival and development of neurons in the cerebellum of hypothyroid rats in vivo." *J Cell Biol* **133**(3): 631-46.
- Nussenzveig, D. R., M. Heinfink, et al. (1993). "Agonist-stimulated internalization of the thyrotropin-releasing hormone receptor is dependent on two domains in the receptor carboxyl terminus." *J Biol Chem* **268**: 2389-2392.
- O'Connor, B. and G. O'Cuinn (1984). "Localization of a narrow-specificity thyroliberin hydrolyzing pyroglutamate aminopeptidase in synaptosomal membranes of guinea-pig brain." *Eur J Biochem* **144**: 271-278.
- O'Connor, B. and G. O'Cuinn (1985). "Purification of and kinetic studies on a narrow specificity synaptosomal membrane pyroglutamate aminopeptidase from guinea-pig brain." *Eur J Biochem* **150**: 47-52.
- O'Cuinn, G., B. O'Connor, et al. (1990). "Degradation of thyrotropin-releasing hormone and luteinising hormone-releasing hormone by enzymes of brain tissue." *J Neurochem* **54**(1): 1-13.
- Okamura, Y., H. Kawano, et al. (1991). "Spatial-temporal appearance of developing immunoreactive TRH neurons in the neuroepithelial wall of the diencephalon." *Developmental Brain Research* **63**: 21-31.
- Palha, J. A., M. T. Hays, et al. (1997). "Transthyretin is not essential for thyroxine to reach the brain and other tissues in transthyretin-null mice." *Am J Physiol* **272**(3 Pt 1): E485-93.
- Papaioannou, V. and R. Johnson (1993). Production of chimeras and genetically defined offspring from targeted ES cells. *Gene Targeting, A Practical Approach*. A. L. J. (ed.): pp. 107 - 146.
- Pazos, A., R. Cortes, et al. (1985). "Thyrotropin-releasing hormone receptor binding sites: autoradiographic distribution in the rat and guinea pig brain." *Journal of Neurochemistry* **45**: 1448-1463.
- Perkins, S. N., E. J. Husten, et al. (1990). "The 108-kDa peptidylglycine alpha-amidating monooxygenase precursor contains two separable enzymatic activities involved in peptide amidation." *Biochemical and Biophysical Research Communications* **171**(3): 926-932.
- Phillips, P. A., J. M. Abrahams, et al. (1988). "Localization of vasopressin binding sites in rat brain by in vitro autoradiography using a radioiodinated V1 receptor antagonist." *Neuroscience* **27**(3): 749-61.
- Ponce, G., J.-L. Charli, et al. (1988). "Tissue-specific regulation of pyroglutamate aminopeptidase II activity by thyroid hormones." *Neuroendocrinology* **48**: 211-213.
- Prasad, C. and R. M. Edwards (1984). "Thyrotropin-releasing hormone (TRH): apparent receptor binding in rat spinal cord." *Brain Res* **311**(1): 1-6.
- Quirion, R., M. Dalpe, et al. (1984). "Atrial natriuretic factor (ANF) binding sites in brain and related structures." *Peptides* **5**(6): 1167-72.
- Reichlin, S. (1986). "Neural functions of TRH." *Acta Endocrinologica Suppl* **276**: 21-33.
- Rostene, W. H., J.-L. Morgat, et al. (1984). "In vitro biochemical characterization and autoradiographic distribution of 3H-thyrotropin-releasing hormone binding sites in rat brain sections." *Neuroendocrinology* **39**: 81-86.

- Saberi, M. and R. D. Utiger (1975). "Augmentation of thyrotropin responses to thyrotropin-releasing hormone following small decreases in serum thyroid hormone concentrations." *J Clin Endocrinol Metab* **40**(3): 435-41.
- Satoh, T., P. Feng, et al. (1993). "A truncated isoform of the thyrotropin-releasing hormone receptor is expressed in the rat central nervous system as well as in the pituitary gland." *Molecular Brain Research* **20**: 353-356.
- Schally, A. V. (1978). "Aspects of hypothalamic regulation of the pituitary gland." *Science* **202**: 18-28.
- Schauder, B., L. Schomburg, et al. (1994). "Cloning of a cDNA encoding an ectoenzyme that degrades thyrotropin-releasing hormone." *Proc. Natl. Acad. Sci.* **91**: 9534-9538.
- Schmidt-Achert, K. M., V. Askanas, et al. (1984). "Thyrotropin-releasing hormone enhances choline acetyltransferase and creatine kinase in cultured spinal ventral horn neurons." *J Neurochem* **43**(2): 586-9.
- Schmitmeier, S. (1998). Reinigung und Charakterisierung des TRH-abbauenden Serumenzyms und des TRH-abbauende Leberenzym, MPI Schriftenreihe. **31**.
- Schomburg, L. and K. Bauer (1995). "Thyroid hormones rapidly and stringently regulate the messenger RNA levels of the thyrotropin-releasing hormone (TRH) receptor and the TRH-degrading ectoenzyme." *Endocrinology* **136**(8): 3480-5.
- Schomburg, L. and K. Bauer (1997). "Regulation of the adenohypophyseal thyrotropin-releasing hormone-degrading ectoenzyme by estradiol." *Endocrinology* **138**(9): 3587-93.
- Schomburg, L. and K. Bauer (1999). "Thyrotropin-Releasing Hormone gene expression in rat testis." *Exp Clin Endocrinol Diabetes* **107**(Suppl 1): S9.
- Schreiber, G., B. R. Southwell, et al. (1995). "Hormone delivery systems to the brain - transthyretin." *Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes* **103**(2): 75-80.
- Sellar, R. E., R. F. Taylor, et al. (1993). "Functional expression and molecular characterization of the thyrotropin-releasing hormone receptor from the rat anterior pituitary gland." *J Mol Endocrinol* **10**: 199-206.
- Sharif, N. A. (1989). "Quantitative autoradiography of TRH receptors in discrete brain regions of different mammalian species." *Ann. NY Acad. Sci.* **553**: 147-175.
- Shibusawa, N., M. Yamada, et al. (2000). "Requirement of Thyrotropin-releasing hormone for the postnatal functions of pituitary thyrotrophs: ontogeny study of congenital tertiary hypothyroidism in mice." *Molecular Endocrinology* **14**: 137-146.
- Smith, A. G. and M. L. Hooper (1987). "Buffalo rat liver cells produce a diffusible activity which inhibits the differentiation of murine embryonal carcinoma and embryonic stem cells." *Dev Biol* **121**(1): 1-9.
- Snyder, P. J. and R. D. Utiger (1973). "Repetitive administration of thyrotropin-releasing hormone results in small elevations of serum thyroid hormones and in marked inhibition of thyrotropin response." *J Clin Invest* **52**(9): 2305-12.
- Straub, R. E., G. C. Frech, et al. (1990). "Expression cloning of a cDNA encoding the mouse pituitary thyrotropin-releasing hormone receptor." *Proc Natl Acad Sci USA* **87**: 9514-9518.
- Szirtes, T., L. Kisfaludy, et al. (1984). "Synthesis of thyrotropin-releasing hormone analogues. 1. Complete dissociation of central nervous system effects from thyrotropin-releasing activity." *J Med Chem* **27**(6): 741-5.
- Tache, Y., W. Vale, et al. (1980). "Thyrotropin-releasing hormone--CNS action to stimulate gastric acid secretion." *Nature* **287**(5778): 149-51.
- Taylor, R. L. and D. R. Burt (1982). "Species differences in the brain regional distribution of receptor binding for thyrotropin-releasing hormone." *J Neurochem* **38**: 1649-1656.
- Taylor, T., P. Gyves, et al. (1990). "Thyroid hormone regulation of TRH mRNA levels in rat paraventricular nucleus of the hypothalamus changes during ontogeny." *Neuroendocrinology* **52**: 262-267.
- Taylor, W. L. and J. E. Dixon (1978). "Characterization of a pyroglutamate aminopeptidase from rat serum that degrades thyrotropin-releasing hormone." *J Biol Chem* **253**(19): 6934-6940.
- Theodoropoulos, T., L. E. Braverman, et al. (1979). "Thyrotropin-releasing hormone is not required for thyrotropin secretion in the perinatal rat." *J Clin Invest* **63**(4): 588-94.
- Torres, H., J.-L. Charli, et al. (1986). "Subcellular distribution of the enzymes degrading thyrotropin releasing hormone and metabolites in rat brain." *Neurochem Int* **9**(1): 103-110.
- Tsuruo, Y., T. Hokfelt, et al. (1987). "Thyrotropin releasing hormone (TRH)-immunoreactive cell groups in the rat central nervous system." *Exp Brain Res* **68**(1): 213-7.
- Vara, E. and J. Tamarit-Rodriguez (1988). "Islet secretion of immunoreactive thyrotropin-releasing hormone and the 'paracrine-like' effects of its exogenous administration." *Acta Endocrinol (Copenh)* **118**(3): 429-36.
- Vargas, M. A., M. Cisneros, et al. (1992). "Regional distribution of pyroglutamyl peptidase II in rabbit brain, spinal cord, and organs." *Peptides* **13**: 255-260.
- Werther, G. A., A. Hogg, et al. (1987). "Localization and characterization of insulin receptors in rat brain and pituitary gland using in vitro autoradiography and computerized densitometry." *Endocrinology* **121**(4): 1562-70.

- Wilk, S. and E. K. Wilk (1989). "Pyroglutamyl peptidase II, a thyrotropin releasing hormone degrading enzyme: purification and specificity studies of the rabbit brain enzyme." Neurochem Int **15**(1): 81-89.
- Winkler, G., L. Gero, et al. (1987). "Arginine induced growth hormone (hGH) response and paradoxical hGH secretion stimulated by TRH in diabetes mellitus." Acta Diabetol Lat **24**(2): 109-17.
- Winokur, A. and R. D. Utiger (1974). "Thyrotropin-releasing hormone: regional distribution in rat brain." Science **185**: 265-267.
- Wurst, W. and A. L. Joyner (1993). Production of targeted embryonic stem cell clones. Gene Targeting, A Practical Approach. A. L. J. (ed.), Oxford University Press: pp. 33 - 62.
- Yamada, M., R. Monden, et al. (1993). "Pituitary adenomas of patients with acromegaly express thyrotropin-releasing hormone receptor messenger RNA: cloning and functional expression of the human thyrotropin-releasing hormone receptor gene." Biochem Biophys Res Commun **195**(2): 737-745.
- Yamada, M., Y. Saga, et al. (1997). "Tertiary hypothyroidism and hyperglycemia in mice with targeted disruption of the thyrotropin-releasing hormone gene." Proceedings of the National Academy of Science, USA **94**: 10862-10867.
- Yamada, M., N. Shibusawa, et al. (2000). "Expression of thyrotropin-releasing hormone (TRH) receptor subtype 1 in mouse pancreatic islets and HIT-T15, an insulin-secreting clonal β cell line." Life Sciences **66**: 1119-1125.
- Yang, H., P. Yuan, et al. (1999). "Feedback regulation of thyrotropin-releasing hormone gene expression by thyroid hormone in the caudal raphe nuclei in rats." Endocrinology **140**(1): 43-9.
- Zabavnik, J., G. Arbuthnott, et al. (1993). "Distribution of thyrotropin-releasing hormone receptor messenger RNA in rat pituitary and brain." Neuroscience **53**(3): 877-887.
- Zhang, S. H., Y. Q. Zhang, et al. (1995). "Identification of thyrotropin-releasing hormone receptor mRNA in the Leydig cells of the mouse testis by in situ hybridization." Neuropeptides **29**(6): 309-13.
- Zhao, D., J. Yang, et al. (1992). "Molecular cloning of a complementary deoxyribonucleic acid encoding the thyrotropin-releasing hormone receptor and regulation of its messenger ribonucleic acid in rat GH cells." Endocrinology **130**: 3529-3536.
- Zheng, D., H. S. Chen, et al. (1990). "Action of thyrotropin-releasing hormone in experimental hemorrhagic shock--cardiovascular mechanism." J Tongji Med Univ **10**(3): 187-92.

**Persönliche
Angaben:**

Name: Rabeler
Vorname: Roland Jan
Geburtstag: 19.07.1970
Geburtsort: Hannover
Familienstand: ledig
Staatsangehörigkeit: deutsch
Eltern:
Mutter: Waltraud Edelgard Rabeler, geb. Knoll, geboren am
30.07.1942
Vater: Horst Johannes Rabeler, geboren am 16.06.1943

Ausbildung:

seit Dez. 1996:
Promotion
Arbeitsgruppe Prof. Bauer, Max-Planck-Institut für experimentelle
Endokrinologie, Hannover, Niedersachsen.

Nov. 1996:
Hauptdiplom Biochemie

Mai 1996 bis Nov. 1996:
Diplomarbeit
Arbeitsgruppe Dr. Adamski, Max-Planck-Institut für experimentelle
Endokrinologie, Hannover, Niedersachsen.

1991 bis 1996:
Studium der Biochemie (Diplom)
Universität Hannover, Medizinische Hochschule Hannover, Tierärztliche
Hochschule Hannover.

Zivildienst:

August 1990 bis Oktober 1991:
Ausbildung zum Rettungssanitäter
Rettungsdienst beim ASB Hannover-Land

**Schulische
Ausbildung:**

Juni 1990:
Abitur

1983 bis 1990:
Georg-Büchner-Gymnasium Letter / Niedersachsen.

1981 bis 1983:
Orientierungsstufe Seelze / Niedersachsen.

1977 bis 1981:
Grundschule Lohnde / Niedersachsen.