

UNTERSUCHUNGEN ZUR FUNKTION DES NUKLEÄREN ORPHAN-REZEPTORS EAR2

Vom Fachbereich Chemie der Universität Hannover
zur Erlangung des Grades

Doktor der Naturwissenschaften
Dr. rer. nat.

genehmigte Dissertation
von

Marei Warnecke
geboren am 14. September 1977 in Göttingen

2004

Diese Arbeit wurde in der Zeit von Februar 2002 bis April 2004 am Max-Planck-Institut für experimentelle Endokrinologie unter der Betreuung von Prof. Dr. Gregor Eichele angefertigt.

Referent:

Prof. Dr. Walter Müller
Medizinische Hochschule Hannover

Korreferent:

Prof. Dr. Gregor Eichele
Max-Planck-Institut für experimentelle Endokrinologie, Hannover

Tag der Promotion: 18. Juni 2004

DANKSAGUNG

Bevor ich beginne möchte ich mich bei all denen bedanken, die mich bei der Anfertigung dieser Arbeit unterstützt haben.

An erster Stelle danke ich Herrn Prof. Dr. Gregor Eichele für die Gelegenheit, meine Promotionsarbeit in seiner Arbeitsgruppe auf einem so interessanten vielseitigem Thema anfertigen zu können. Vor allem sein persönliches Interesse am Fortgang der Arbeit, zahlreiche fruchtbare Diskussionen und seine Anleitung zur selbstständigen wissenschaftlichen Arbeit haben entscheidend zur erfolgreichen Durchführung meiner Projekte beigetragen.

Bei Herrn Prof. Dr. Walter Müller möchte ich mich ganz herzlich für die freundliche Übernahme der Begutachtung und Vertretung meiner Arbeit vor dem Fachbereich Chemie sowie die stets gewährte Hilfe bei der Überwindung bürokratischer Schwierigkeiten bedanken.

Dr. Gonzalo Alvarez-Bolado danke ich besonders für seine Hilfe bei neuroanatomischen Fragestellungen, zahlreiche stimulierende Diskussionen sowie technische Ratschläge bei der Etablierung neuer Experimente.

Dr. Jean-Pierre Revelli (Lexicon Genetics, USA) danke ich für die freundliche Bereitstellung der Ear2-defizienten Mäuse.

Dr. Michael Leitges und Klaus Natascha (Innsbruck) danke ich für die Hilfe bei der Analyse des Immunologischen Phänotyps.

Dr. Henrik Oster danke ich für seine Hilfe und Einsatz bei den Versuchen zur circadianen Rhythmik. Ihm und Dr. Axel Visel sei außerdem herzlich gedankt für ihr konstruktives Korrekturlesen der vorliegenden Arbeit.

Polina Spies danke ich für ihren unermüdlichen Einsatz bei der Erstellung histologischer Schnitte, Uwe Herzig für seine kreative Konstruktion für die Nozizeptionsversuche.

Dank gilt auch allen ehemaligen und derzeitigen Mitarbeitern des Instituts vor allem Axel Visel, Henrik Oster, Carsten Möller, Markus Hückel, Tarik Hessabi, Frank Sacher, Judit Kovac, Judit Oldekamp, Alexander Prokscha, Aravind Sekhar, Eric Swindell, Kornelia Maslo, Christine Zwingmann, Uwe Grunenberg, Barbara Fischer, Polina Spies, Sarah Herzog sowie Nadine Naujokat und Hans-Otto Bader. Sie alle haben durch ihre unermüdliche Hilfsbereitschaft zu dem angenehmen Arbeitsklima beigetragen, das ich an unserem Institut genießen durfte.

Nicht zuletzt möchte ich meiner Familie und Freunden danken für ihre Unterstützung während der letzten drei Jahre.

INHALTSVERZEICHNIS

ZUSAMMENFASSUNG	7
ABSTRACT	8
1 EINLEITUNG	9
1.1 EINFÜHRUNG	9
1.2 NUKLEÄRE HORMONREZEPTOREN	10
1.2.1 <i>COUP-TF-Unterfamilie</i>	11
1.2.2 <i>Der nukleäre Orphan-Rezeptor Ear2 (COUP-TFIII)</i>	13
1.3 ENTWICKLUNG DES GEHIRNS.....	14
1.3.1 <i>Die Rhombomere des Rhombencephalons</i>	16
1.3.2 <i>Die Rhombische Lippe</i>	16
1.3.3 <i>Die Rolle der Phox-Gene in der noradrenergen Entwicklung</i>	17
1.4 DER <i>LOCUS COERULEUS</i> UND DAS NORADRENERGE SYSTEM	19
1.4.1 <i>Subpopulationen des Locus coeruleus</i>	20
1.4.2 <i>Neurotransmitter und Projektionen des Locus coeruleus</i>	21
1.4.3 <i>Funktionen des Locus coeruleus</i>	22
1.4.3.1 <i>Die Funktion des Locus coeruleus im Schlaf-Wachsystem</i>	23
1.4.3.2 <i>Der Locus coeruleus und die circadiane Uhr</i>	24
1.4.3.3 <i>Die Rolle des Locus coeruleus in der Schmerzmodulation</i>	25
1.4.4 <i>Der Locus coeruleus und neurodegenerative Erkrankungen</i>	25
1.5 LIPIDSTOFFWECHSEL	26
1.5.1 <i>Apolipoproteine</i>	26
1.5.2 <i>Funktion von COUP-TFs im Lipidstoffwechsel</i>	28
1.6 ENTWICKLUNG VON LYMPHOZYTEN.....	29
1.6.1 <i>Thymus und Thymozytenentwicklung</i>	29
1.6.2 <i>Milz und B-Zell Entwicklung</i>	31
1.7 ZIEL DER ARBEIT	32
2 MATERIALIEN UND METHODEN	33
2.1 TIEREXPERIMENTELLE ARBEITEN	33
2.1.1 <i>Maushaltung und verwendete Stämme</i>	33
2.1.2 <i>Genotypisierung</i>	34
2.1.2.1 <i>Isolierung von genomischer DNA aus embryonaler Dotterhaut</i>	34
2.1.2.2 <i>Isolierung genomischer DNA aus Schwanzbiopsien</i>	34
2.1.2.3 <i>Southern Blot-Analyse</i>	35
2.1.2.4 <i>PCR-basierendes Genotypisieren</i>	35

2.2	<i>IN SITU</i> -HYBRIDISIERUNG.....	36
2.2.1	Generierung einer Ribosonde.....	36
2.2.1.1	Herstellung der cDNA-Vorlage.....	36
2.2.1.2	Synthese der RNA-Sonden.....	38
2.2.2	<i>Whole mount in situ</i> -Hybridisierung mit Mäuseembryonen	39
2.2.3	<i>In situ</i> -Hybridisierung auf Gewebeschnitten (<i>ISH</i>)	41
2.3	LACZ/ X-GAL FÄRBUNG.....	43
2.4	IMMUNOPREZIPITATION	44
2.4.1	<i>2H3 whole mount Immunoprecipitation</i>	44
2.4.2	<i>Tyrosin Hydroxylase-Färbung von Paraffinschnitten</i>	44
2.5	HISTOLOGISCHE FÄRBUNGEN	45
2.5.1	<i>Nissl stain</i>	45
2.5.2	<i>HE-Färbung</i>	45
2.6	NORTHERN BLOT-ANALYSE	46
2.6.1	<i>Herstellung radioaktiv markierter Sonden</i>	46
2.6.2	<i>Blotting und Hybridisierung</i>	46
2.7	AKTIVITÄTSMESSUNGEN/ CIRCADIANE EXPERIMENTE.....	47
2.7.1	<i>Haltung und generelle Richtlinien</i>	47
2.7.2	<i>Licht/ Dunkel (LD) Zyklus Training</i>	47
2.7.3	<i>Freies Laufen in Konstanter Dunkelheit</i>	49
2.7.4	<i>Freies Laufen in Konstantem Licht</i>	49
2.8	SCHMERZEXPERIMENTE/ HOT PLATE.....	50
2.8.1	<i>Generelles</i>	50
2.8.2	<i>Primäre Untersuchung</i>	50
2.8.3	<i>Sekundäre Untersuchungen</i>	51
3	ERGEBNISSE	52
3.1	EXPRESSIONSANALYSE	52
3.1.1	<i>Expression von Ear2 während der Embryogenese</i>	52
3.1.2	<i>Expression im adulten Organismus</i>	57
3.1.3	<i>Ear2 ist in wichtigen Organen des Fettstoffwechsels exprimiert</i>	58
3.2	KONSTRUKT FÜR GEZIELTE EAR2-DELETION	60
3.3	FUNKTION VON EAR2 IM SICH ENTWICKELNDEN ZNS	61
3.3.1	<i>Ear2 ist in Zellen des Rhombomers1 exprimiert</i>	61
3.3.2	<i>Der Locus coeruleus von Ear2^{-/-}-Mäusen ist reduziert</i>	63
3.3.3	<i>Dem LC von Ear2^{-/-} Mäusen fehlen Subpopulationen von Zellen und Projektionen</i>	66
3.3.4	<i>Die Noradrenergen Zentren A1, 2, 3, 4, 5, 7 sind in Ear2^{-/-}-Mäusen unverändert</i>	68
3.3.5	<i>Der LC ist über den gesamten LC-Entwicklungszeitraum reduziert</i>	69
3.3.6	<i>Ear2 in der LC-Entwicklungskaskade</i>	72
3.3.7	<i>Ear2^{-/-} Mäuse zeigen eine veränderte circadiane Rhythmik</i>	74

3.3.8	<i>Ear2^{-/-}-Mäuse zeigen veränderte Nozizeption.....</i>	76
3.4	<i>EAR2 BESITZT EINE WICHTIGE FUNKTION IM IMMUNSYSTEM</i>	79
3.4.1	<i>Ear2 ist in embryonalem und adultem Thymus exprimiert</i>	79
3.4.2	<i>Alte Ear2^{-/-}-Mäuse zeigen morphologische Veränderungen der Milz.....</i>	80
4	DISKUSSION.....	82
4.1	EAR2 UND DIE ENTWICKLUNG DES LOCUS COERULEUS	82
4.1.1	<i>Ear2 wird für die Bildung des Locus coeruleus benötigt.....</i>	82
4.1.2	<i>Neuroanatomische Untersuchungen des adulten Ear2^{-/-} LC</i>	83
4.1.3	<i>Untersuchung des LC anhand bekannter und neuer Markergene</i>	85
4.1.4	<i>Einordnung von Ear2 in die LC-Signalkaskade</i>	86
4.1.5	<i>Verbleib der fehlenden LC-Zellen.....</i>	88
4.2	FUNKTIONELLE IMPLIKATIONEN DES REDUZIERTEN LOCUS COERULEUS	91
4.2.1	<i>Circadiane Uhr.....</i>	91
4.2.2	<i>Schmerzempfinden.....</i>	94
4.3	EAR2 IN DER LYMPHOZYTENENTWICKLUNG.....	95
4.4	EAR2 IM LIPIDSTOFFWECHSEL.....	97
4.5	KOMPARATIVE EXPRESSIONSANALYSE DER COUP-TFS	99
5	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	103
6	LITERATURVERZEICHNIS	105
	APPENDIX 1	122
	LEBENS LAUF	123
	PUBLIKATIONS LISTE.....	124
	ERKLÄRUNG	125

ZUSAMMENFASSUNG

An der differenzierten Entwicklung eines Embryos aus zunächst gleichartigen totipotenten Zellen sind zahlreiche evolutionär konservierte Proteine entscheidend beteiligt, darunter insbesondere zahlreiche Klassen von Transkriptionsfaktoren, welche die Expression anderer Gene regulieren. Die Mitglieder der COUP-TF- (Chicken ovalbumin upstream transcription factors) Familie der nukleären Orphan-Rezeptoren, COUP-TFI, Arp1 und Ear2, spielen eine wichtige Rolle in der Embryogenese. Deletionen von *COUP-TFI* und *Arp1* in der Maus verursachen starke Fehlentwicklungen in der Embryonalentwicklung mit lethalen Folgen. COUP-TFI-defiziente Mäuse sterben direkt nach der Geburt mit Fehlbildungen cranialer Nerven, Arp1-defiziente Embryonen bereits in der Mitte der Schwangerschaft aufgrund starker kardiovaskulärer Defekte. Lokalisation und Funktion von Ear2 in der Embryogenese waren zu Beginn dieser Arbeit jedoch weitgehend unbekannt.

Die Expression von *Ear2* im Mausembryo, besonders im Vergleich zu *COUP-TFI* und *Arp1*, wurde hier anhand verschiedener Methoden bestimmt. Starke spezifische *Ear2*-Expression konnte während der frühen Embryogenese im Rhombomer 1 des Hinterhirns detektiert werden, einer Region, aus der Vorläuferzellen des Locus coeruleus entstehen. Ein hohes Signal zeigten auch die Rhombomere 3 und 5 sowie der dorsale Teil des Neuralrohrs, zu einem späteren Zeitpunkt auch Lunge, Leber, Thymus und Niere. Vom Expressionsmuster ausgehend wurden Analysen zur Funktion von Ear2 mithilfe eines kürzlich generierten bisher nicht analysierten Ear2-defizienten Mausstammes unternommen. Ear2^{-/-}-Mäuse sind lebensfähig und zeigen keine offensichtlichen morphologischen Abnormalitäten. In der neuroanatomischen Analyse wurden jedoch Veränderungen des Locus coeruleus (LC) beobachtet, der als wichtigstes Zentrum des noradrenergen Systems im ZNS mit Hirnfunktionen wie Aufmerksamkeit, Aufwachen, circadianen Rhythmen und Schmerzmodulation in Verbindung steht. Molekulare Analysen an frühen Ear2^{-/-}-Embryonen zeigen eine veränderte Entwicklung der LC-Vorläuferzellen sowie eine veränderte Expression der LC-spezifischen differenzierenden Transkriptionsfaktoren Phox2a, Phox2b und Rnx, was in einer Zellzahlreduktion des adulten *Locus coeruleus* von über 70% resultiert. Verhaltensexperimente zeigen ein erhöhtes Schmerzempfinden der Tiere. Auch die Stabilität des circadianen Systems ist in Ear2-Mutanten reduziert. Zusätzlich konnte eine Funktion von Ear2 im Lipidmetabolismus und Immunsystem gezeigt werden. Ear2-defiziente Mäuse besitzen abnormal hohe Cholesterol- und HDL-Spiegel möglicherweise durch die Abwesenheit von Ear2 in der Leber. Histologische Schnitte von Ear2^{-/-}-Milzen weisen stark proliferierende B-Lymphozyten auf und deuten darauf hin, dass Ear2 für die normale Entwicklung der Zellpopulationen des Immunsystems benötigt wird.

Zusammenfassend zeigen die hier vorgestellten Ergebnisse, dass der nukleäre Orphan-Rezeptor Ear2 an der Entwicklung des ZNS, der Proliferationsregulation von Lymphozyten und an der Steuerung des Lipidstoffwechsels beteiligt ist. Die genetische Deletion des Gens in der Maus führt zu Störungen des Schmerzempfindens, des circadianen Rhythmus, des Blut-Lipidspiegels und der Lymphozytenproliferation. Die Identifizierung und Charakterisierung von Ear2 als ein neues Mitglied der für die LC-Formation notwendigen molekularen Signalkaskade enthüllt einen verheißungsvollen neuen Aspekt der Entwicklung dieses wichtigen Zentrums im Zentralnervensystem und unterstreicht zusammen mit der komplexen Reduktion von LC-Neuronen in Ear2-defizienten Tieren den heterogenen Ursprung dieser Gehirnregion.

Schlagwörter: Ear2, nukleärer Orphan-Rezeptor, Phox2a, Locus coeruleus, Rhombische Lippe, Rhombomer, circadiane Rhythmizität, Lipidmetabolismus.

ABSTRACT

During embryonic development totipotent cells differentiate into a variety of cell types by a complex interplay of different classes of conserved proteins. These include transcription factors, which regulate the expression of other genes. The members of the COUP-TF family of nuclear orphan receptors, COUP-TFI, Arp1 and Ear2, are needed during early embryogenesis. In mice, the deletion of COUP-TFI and Arp1 results in postnatal and prenatal lethality, respectively, due to misregulated development of cranial nerves in case of COUP-TFI and cardiovascular congestion in case of Arp1. In the beginning of this study, localization and function of Ear2 in embryogenesis remained unclear.

The expression of Ear2 in comparison to COUP-TFI and Arp1 was evaluated by several methods. Strong Ear2 expression was detected during early embryogenesis in rhombomere 1 of the hindbrain, a region from which precursors of the locus coeruleus originate. High transcript levels were also found in rhombomeres 3 and 5 and the dorsal part of the neural tube, as well as in later stages in lung, liver, thymus and kidney. Based on this expression pattern a recently generated Ear2-deficient mouse line was phenotypically analyzed to unravel the function of this gene. Ear2^{-/-}-mice are viable and show no obvious morphological or behavioural abnormalities. Neuroanatomical analysis however revealed changes in the locus coeruleus (LC), the largest and most important center of the noradrenergic system, implicated in brain functions like alertness, arousal, circadian rhythms and pain modulation. Molecular analysis of early Ear2^{-/-}-embryos indicates an altered development of LC-precursors with changed expression of differentiating factors Phox2a, Phox2b and Rnx resulting in a reduction of adult LC-cells of more than 70%. Behavioural experiments to address consequences of the LC-reduction for pain modulation and circadian rhythmicity show increased nociception of Ear2^{-/-} mice and a decreased robustness of the internal circadian pacemaker. In addition, roles for Ear2 in lipid metabolism and immune system function were demonstrated. Ear2-deficient mice have abnormally high cholesterol and HDL levels possibly due to absence of Ear2 in the liver. Histological sections of Ear2^{-/-} spleen show highly proliferated B-lymphocytes, suggesting that Ear2 is required for normal development of cell populations of the immune system.

Taken together, the nuclear orphan receptor Ear2 was demonstrated to participate in the development of the CNS, the regulation of lymphocyte proliferation and the control of lipid metabolism. Targeted deletion of Ear2 in mice leads to an impairment of pain sensation, circadian rhythmicity, homeostasis of blood cholesterol levels and lymphocyte proliferation. The complex pattern of LC-neuron reduction in Ear2^{-/-} mice emphasizes the heterogeneous origin of this nucleus. The identification and characterization of Ear2 as a new member of the molecular signalling cascade required for LC formation reveals a promising new aspect of development of this important center of the CNS.

Keywords: Ear2, nuclear orphan receptor, Phox2a, Locus coeruleus, rhombic lip, rhombomere, circadian rhythmicity, nociception, lipid metabolism, lymphocyte proliferation.

1 EINLEITUNG

1.1 Einführung

Während der Embryogenese differenzieren sich gleichartige totipotente Zellen zu verschiedenartigen, differenzierten Gewebeformen. Verantwortlich dafür sind verschiedene Entwicklungsgene, welche wiederum die Expression anderer Gene durch An- bzw. Ausschalten regulieren (Lodish, 1996). Die Diversifizierung verschiedener Zelltypen durch den Mechanismus der Genregulation stellt damit ein zentrales Thema der Entwicklungsbiologie dar.

Differentielle Genregulation ist auf verschiedenen Ebenen möglich -Transkription, RNA-Prozessing, Translation, Proteinmodifikation (Renkawitz, 1990)-, jedoch wird in den meisten Fällen der Transkriptionsstart kontrolliert (Voet, 1995). Generell unterscheidet man zwei Typen von regulatorischen Elementen, die an der Transkriptionsregulation beteiligt sind: *Cis*-Regulatoren sind spezifische DNA-Sequenzen in der Kontrollregion eines Gens, die nur benachbarte Gene regulieren, z.B. *Promotoren* und *Enhancer*, *Trans*-Regulatoren werden durch ein Gen synthetisiert und binden wiederum an *cis*-Elemente. Sowohl *cis*- als auch *trans*-Regulatoren sind für die zellspezifische Gentranskription notwendig (Gilbert, 1997b). Promotor- und Enhancersequenzen werden durch die Bindung von spezifischen *trans*-regulatorischen Proteinen, sogenannten Transkriptionsfaktoren, aktiviert. Diese Proteine werden aufgrund struktureller Ähnlichkeiten in verschiedene Familien eingeteilt (Harrison, 1991). Beispiele hierfür sind die Familie der Homöoboxproteine, welche die anterioposteriore Körperachse im gesamten Tierreich spezifizieren (z.B. *HoxB1*), sowie die nukleären Hormonrezeptoren, die zu den Zink-Finger Transkriptionsfaktoren gezählt werden (Gilbert, 1997b). Diese beiden Gruppen werden unter anderem aufgrund ihrer DNA-Bindungsdomäne unterschieden. Die Homöoboxproteine besitzen eine Homöodomäne bestehend aus 60 Aminosäuren, die eine *helix-turn-helix* (HTH) Struktur bilden. Die Zink-Finger

Transkriptionsfaktoren weisen ein Motiv auf, bei dem vier α -Helizes ein Zn^{2+} -Ion umlagern. Diese sogenannten Zink-Finger sind für die DNA-Koordination verantwortlich (Voet, 1995). Viele der untersuchten Transkriptionsfaktoren sind Aktivatoren, d.h. mit transkriptionsstimulierender Wirkung. Bei Eukaryoten wurden jedoch auch Repressor-Proteine identifiziert. Diese Transkriptionsreprimierenden Proteine binden an bestimmte DNA-Elemente, meist Enhancer- oder Promotor-Sequenzen, und blockieren so die Bindung der für den Transkriptionsstart notwendigen Aktivator-Proteine (Levine and Manley, 1989). Man unterscheidet aktive und passive Repression. Als passive Repression wird die Konkurrenz um eine unspezifische DNA-Bindungsstelle bezeichnet. Aktive Repression oder *silencing* beinhaltet ein aktives Stören, entweder durch Unterdrückung der Funktion der Transkriptionsmaschinerie selber oder durch Inhibierung der Transaktivierungsfunktion eines Aktivators (Transrepression) (Johnson, 1995; Leng et al., 1996) (siehe Abb. 1.3).

1.2 Nukleäre Hormonrezeptoren

Die Überfamilie der nukleären Hormonrezeptoren (NHR) besteht aus ligandaktivierten Transkriptionsfaktoren, die in der Differenzierung und Homöostase benötigt werden und eine große Anzahl von essentiellen zellulären Prozessen beeinflussen.

NHRs sind aus vier unabhängigen funktionellen Domänen aufgebaut: der Modulationsdomäne, der DNA-Bindungsdomäne (DBD), der *hinge*-Region und der Ligandbindungsdomäne (LBD) (siehe Abb.1.1). Während die Modulationsdomäne über die Transaktivierungsfunktion verfügt (Giguere, 1999), enthält die DNA-Bindungsdomäne (DBD) eine Zink-Finger Struktur, mit deren Hilfe der Rezeptor in der Lage ist an die DNA zu binden (Tsai, 1994). Die Bindung erfolgt als Dimer, indem zwei Rezeptor-Moleküle kooperativ über das so genannte palindromische *response element* aneinander binden. Die DBD eines Rezeptors enthält Informationen über die spezifische Dimerisation und kooperative DNA-Bindungsfunktion, wie auch über die Sequenz der DNA, an die der Rezeptor bindet (Tsai, 1994). Die *hinge*-Region fungiert als Bindeglied zwischen DBD und LBD und zeichnet sich durch starke Flexibilität aus. So lässt sich die DBD um 180° rotieren und ermöglicht dadurch die Aktivierung des Rezeptors nach Ligandenbindung. Die LBD ist eine multifunktionelle Domäne im C-Terminus, die Ligandenbindung, Dimerisation, Interaktion mit *heat-shock*-Proteinen, nukleäre Lokalisation und Transaktivierungsfunktionen vermittelt (Giguere, 1999). Bei Abwesenheit von Liganden liegen die meisten nukleären Rezeptoren im Nukleus in DNA-gebundener Form vor und wirken als starke Repressoren der Genexpression. Nach

Ligandenbindung erfährt der Rezeptor eine Konformationsänderung und ermöglicht so die Transaktivierung (Tsai, 1994).

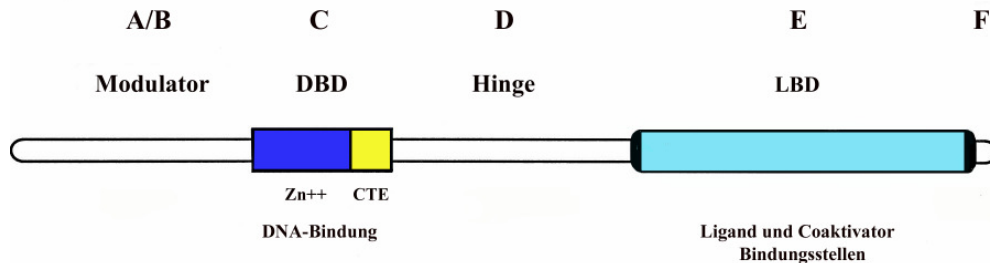


Abb.1.1 Schematischer Aufbau eines nukleären Hormonrezeptors nach Giguere (1999).

Nukleäre Hormonrezeptoren sind aus vier funktionellen Domänen aufgebaut, der Modulationsdomäne, DNA-Bindungsdomäne (DBD), der *hinge*-Region und Ligandbindungsdomäne (LBD). Die Modulationsdomäne verfügt über Transaktivierungsfunktionen, die DBD über eine Zink-Finger Struktur, mit der der Rezeptor an die DNA bindet. Die LBD vermittelt Ligandenbindung, Dimerisation, Interaktion mit *heat-shock*-Proteinen, nukleäre Lokalisation und Transaktivierungsfunktionen. Die *hinge*-Region dient als Bindeglied zwischen DBD und LBD. Die starke Flexibilität (Rotation der DBD um 180°) ist entscheidend für die Aktivierung des Rezeptors nach Ligandenbindung.

Bei der Suche nach neuen nukleären Hormonrezeptoren wurden Mitglieder gefunden, für die die Liganden der Hormonbindenden Domäne bis heute unbekannt sind, und die deshalb als Orphan-Rezeptoren (verwaiste Rezeptoren) bezeichnet werden. Es könnte Liganden für die Orphan-Rezeptoren geben, diese sind jedoch bisher nicht beschrieben worden. Alternativ könnte die Ligandbindungsfunktion im Laufe der Zeit auch verloren gegangen sein (Tsai, 1994). Eine andere Theorie beschreibt die Orphan-Rezeptoren als ursprünglichste Form der nukleären Rezeptoren, die im Gegensatz zu den phylogenetisch jüngeren Hormon-Rezeptoren noch keine Hormonbindung besitzen (O'Malley and Conneely, 1992). Weil Liganden fehlen, stellt sich die Frage nach der Aktivierung dieser Rezeptoren. Die Interaktion zwischen Rezeptor und Ligand könnte weit weniger spezifisch als bei den Hormonrezeptoren sein (O'Malley and Conneely, 1992) oder die Aktivierung findet durch kovalente Modifikation, üblicherweise in Form der Phosphorylierung oder durch Protein-Protein Interaktionen statt (Giguere, 1999). Die wechselwirkenden Proteine könnten koregulatorische Komponenten aus der Transkription, wie Korepressoren, Koaktivatoren und Kointegratoren sein.

1.2.1 COUP-TF-Unterfamilie

Eine Untergruppe der nukleären Hormonrezeptoren, die ausschließlich aus Orphan-Rezeptoren besteht, ist die COUP-TF- (*chicken ovalbumin upstream transcription factors*) Familie, mit den Mitgliedern *COUP-TFI* (*Ear-3*), *ARPI* (*COUP-TFII*) und *Ear2* (*COUP-TFIII*) (Escriva et al., 1997; Jonk et al., 1994; Ladias et al., 1992; Wang et al., 1991). Die Ligandbindungsdomäne von *COUP-TFI* und *-II* ist bei Vertebraten zu 99,6% Prozent

konserviert (Tsai and Tsai, 1997) (siehe Abb.1.2) und scheint deshalb wichtig für die biologische Funktion der COUP-TFs zu sein.

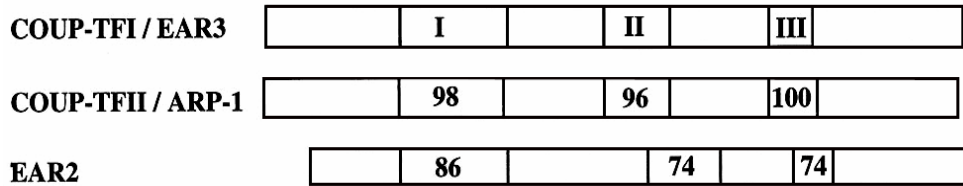


Abb.1.2 Homologie der COUP-TF Mitglieder. Es gibt drei Regionen hoher Homologie, gekennzeichnet als Region I, II, III. Region I wurde als DNA-Bindungs-Domäne identifiziert, die Regionen II und III sind wichtig für die Bildung einer potentiellen Ligandbindungstasche. Die Zahlen geben die Homologie in % zu den Regionen in COUP-TFI an. Modifiziert nach Tsai and Tsai (1997).

Es wurde nachgewiesen, dass COUP-TFI und Arp1 die ligandabhängige Transkriptions-Aktivierung bei anderen nukleären Hormonrezeptoren wie dem Retinsäurerezeptor (Cooney et al., 1992; Kliewer et al., 1992; Leng et al., 1996; Tran et al., 1992), dem Thyroidhormonrezeptor (Cooney et al., 1992), dem Östrogenrezeptor (Burbach et al., 1994; Chu et al., 1998; Chu and Zingg, 1997; Klinge et al., 1997; Shigeta et al., 1996), dem Vitamin D-Rezeptor (Cooney et al., 1993) sowie einem Peroxisom-Proliferatoraktivierenden Rezeptor (Miyata et al., 1993) unterdrücken. Die aktive Transkriptionsrepression, die durch die COUP-TFs bewirkt wird, könnte die Verstärkung eines Nukleär-Rezeptor-Korepressor und/oder *Silencing*-Vermittlers in der gleichen Art wie bei anderen nukleären Orphan-Rezeptoren erfordern (Chen and Evans, 1995; Dowell et al., 1999; Horlein et al., 1995). Das derzeitige Modell der COUP-TF Rezeptorinhibition ist in Abb.1.3 dargestellt.

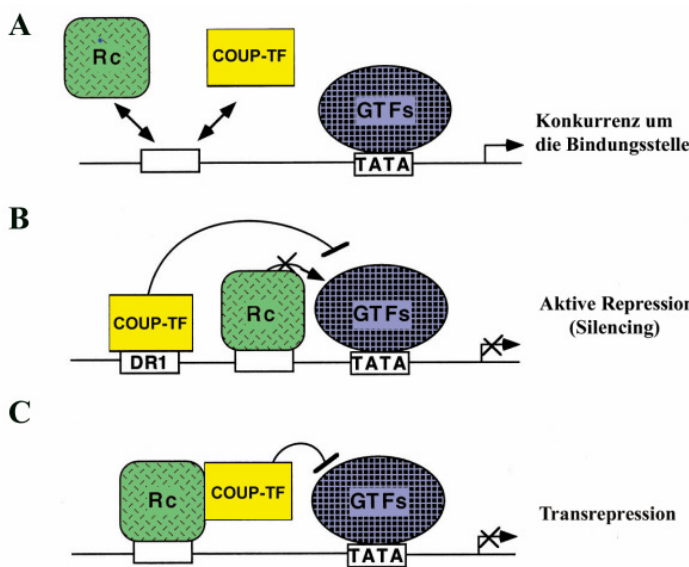


Abb. 1.3 Mechanismus der COUP-TF Rezeptorinhibition

A) Durch die Konkurrenz von COUP-TF und NHR (=Rc) um die DNA-Bindungsstelle wird die Transkription unterdrückt. **B)** Die aktive Repression (silencing) der basalen Transkription ist response element spezifisch. **C)** Durch die Bildung von Heterodimeren zwischen COUP-TFs und NHR wird die ligandabhängige Transaktivierung des NHR unterdrückt. Rc = aktivierter Repressor (NHR), GTF's = allgemeine Transkriptionsfaktoren, DR = direct repeats
 Modifiziert nach Tsai and Tsai, (1997).

Bei *Xenopus* (van der Wees et al., 1996) und *Drosophila* (Mlodzik et al., 1990) konnte den COUP-TFs eine wichtige Rolle in der Musterbildung des sich entwickelnden Nervensystems zugeschrieben werden. Während der Mausembryogenese wird *COUP-TFI* stark im Nervensystem exprimiert. Experimente mit *COUP-TFI*-defizienten Mäusen zeigten eine entscheidende Rolle in der Musterbildung und Segmentation des Gehirns. 95% der Mäuse wiesen Missbildungen (aberrante neurologische Verzweigungen) der cranialen Nerven IX und X (Qiu et al., 1997) sowie eine defekte cortikale Subplatte und apoptotische Schicht IV des Cortex auf (Zhou et al., 1999) und waren nach der Geburt nicht überlebensfähig. *COUP-TFII* wird während der Embryogenese stark in mesenchymalen Zellen exprimiert und scheint in der mesenchymalen-endothelialen Signalgebung eine entscheidende Rolle zu spielen (Pereira et al., 1999). Eine homozygote Deletion des *COUP-TFII* Gens verläuft bereits in Embryonalstadium 10 (E10) letal. Die Embryos weisen Retardation in Körpergröße, Herz und Kopf auf. Histologische Analysen zeigen vergrößerte Blutgefäße und Missbildungen der Arterien und koronaren Gefäße (Qiu et al., 1997).

Die Funktion von *COUP-TFIII* (*Ear2*) während der Embryogenese sowie im adulten Organismus ist bis heute unbekannt (Avram et al., 2000).

1.2.2 Der nukleäre Orphan-Rezeptor *Ear2* (*COUP-TFIII*)

Der nukleäre Orphan-Rezeptor *Ear2* (*v-erbA related protein*) wurde erstmals 1988 im menschlichen Genom (auf dem 19. Chromosom) identifiziert und durch cDNA Klonierung charakterisiert (Miyajima et al., 1988). Die Identifizierung des murinen Homologs folgte 6 Jahre später (Barnhart and Mellon, 1994). Die beiden zeigen einen hohen Grad an Homologie - in der DBD 100%, in der LBD 99%- (Barnhart and Mellon, 1994). Bei der Maus wird es als 2.5kb großes Transkript ausgebildet (Jonk et al., 1994). Bis heute wurde die Funktion von *Ear2* als Transkriptionsrepressor bei verschiedenen Genen nachgewiesen. So unterdrückt *Ear2* bei Menschen die Expression der in der Leber synthetisierten Apolipoproteine apoB, apoCIII und apoAII, indem es spezifisch an die regulatorischen Elemente der zugehörigen Gene bindet (Ladas et al., 1992). Bei der Transkriptionsregulation des menschlichen LH-Rezeptors konnte die Bindung von *Ear2* an ein *direct-repeat* Motiv innerhalb der Promotorregion nachgewiesen werden, was dessen Aktivität um bis zu 70% unterdrückt (Zhang and Dufau, 2000). Auch für den humanen Thyroid-Hormon-Rezeptor (Zhu et al., 2000), ein Neurotransmitter-Gen der Ratte (Chew et al., 1999), sowie das Oxytozin-Gen (Chu et al., 1998) konnte Transkriptionsrepression gezeigt werden.

Experimente zeigen, dass *Ear2* mit *COUP-TFI* und *ARPI* in Lösung und an *direct repeat response elements* mit hoher Spezifität und Effizienz Heterodimere bildet. Dies spricht für ein

Mitwirken von *Ear2* in der Signaltransduktion bei *ARPI* und *COUP-TFI*. Die Heterodimere könnten in der Embryonalentwicklung, als auch im adulten Organismus eine wichtige Rolle spielen (Avram et al., 1999). Auch bei der Bildung von DNA-Proteinkomplexen im Gehirn ist *Ear2* beteiligt (Chew et al., 1999).

Erste Expressionsanalysen mit *Northern Blots* aus menschlichem fötalen Gewebe zeigten eine hohe Expression in der Leber (Miyajima et al., 1988), in embryonalem Mausgewebe wurde eine schwach ubiquitäre Expression festgestellt (Jonk et al., 1994). Während für andere Mitglieder der Unterfamilie (*COUP-TFI* und *COUP-TFII*) eine spezifische Expression in dem sich entwickelnden Nervensystem in verschiedenen Regionen nachgewiesen wurde (Jonk et al., 1994; Miyajima et al., 1988), konnte dies bisher für *Ear2* nicht gezeigt werden. Jedoch konnte bei der Untersuchung von Interaktionspartnern mit *COUP-TFII* im Gehirn anhand eines *Northern Dot Blots* gezeigt werden, dass das Expressionsmuster von *Ear-2* weitgehend mit dem von *COUP-TFII* übereinstimmt (Avram et al., 1999).

In den folgenden Abschnitten werden Aufbau, Entstehung und Funktion von Geweben und Organsystemen erläutert, in denen eine Funktion für *Ear2* vermutet oder durch Beeinträchtigung in *Ear2*-defizienten Mäusen nachgewiesen werden konnte.

1.3 Entwicklung des Gehirns

Das Nervensystem (NS) entwickelt sich als Charakteristikum komplexer Organismen in einer recht frühen Phase der Embryogenese aus dem dorsalen Epiblast der Gastrula. Es wird induziert durch eine Kombination von Signalen, die von sog. Organizern ausgehen: dem posterioren Rand des Embryos und später dem Gastrula Organizer (Beddington and Robertson, 1998; Streit et al., 2000). Nach dem Ausbilden der drei Keimblätter faltet sich die induzierte Neuralplatte auf und bildet die tubuläre Struktur des Neuralrohrs. Anschließend bilden sich auf anatomischer Ebene im rostralen Bereich als Zeichen neuronaler Gestaltbildung entlang der anterioposterioren Achse die blasenartigen Gehirnkammern: *Prosencephalon* (Vorderhirn), *Mesencephalon* (Mittelhirn) sowie *Rhombencephalon* (Hinterhirn) (Wurst and Bally-Cuif, 2001). Die caudale Region des Neuralrohrs differenziert sich in mehreren Schritten zum Rückenmark. Nach der Bildung eines weiteren, des vierten Ventrikels, teilt sich das um diesen liegende *Rhombencephalon* in *Met-* und *Myelencephalon*, aus denen wiederum *Pons* (Brücke) und *Cerebellum* (Kleinhirn) sowie verlängertes Rückenmark (*Medulla oblongata*) hervorgehen (Kandel, 2000). In der Neuralrohrwand arrangieren sich die Zellen in funktionelle Gruppen, aus den neuroepithelialen Zellen entwickeln sich die verschiedenen Neuronen und Gliazelltypen (Gilbert, 1997a). Gleichzeitig

wird das Neuralrohr entlang der dorsoventralen Achse unter dem Einfluss des meso-endodermalen Gewebes des Notochords und der Flurplatte eingeteilt. Diese Gewebe produzieren ventralisierende Faktoren aus der *sonic hedgehog* Familie (Echelard et al., 1993) anliegende, nicht neurale ectodermale Strukturen dorsalisierende Faktoren der *bone morphogenetic protein* Familie (Lee and Jessell, 1999). Durch Einfluss dieser Faktoren entstehen Boden-, Basal-, Seiten- und Dachplatte und formen so eine ventrolaterale Schichtung, die zusammen mit der anterioposterioren Segmentierung ein dreidimensionales Gitter bildet, in dem Positionsidentitäten etabliert werden (Lumsden and Krumlauf, 1996; Wurst and Bally-Cuif, 2001). Die Grundlagen der Musterbildung entlang der anterioposterioren Achse sind jedoch weniger gut erforscht. Neben der Kompartimentbildung definieren lokal signalisierende Zentren (Organizer zweiter Stufe) Identitäten entlang der anterioposterioren Achse.

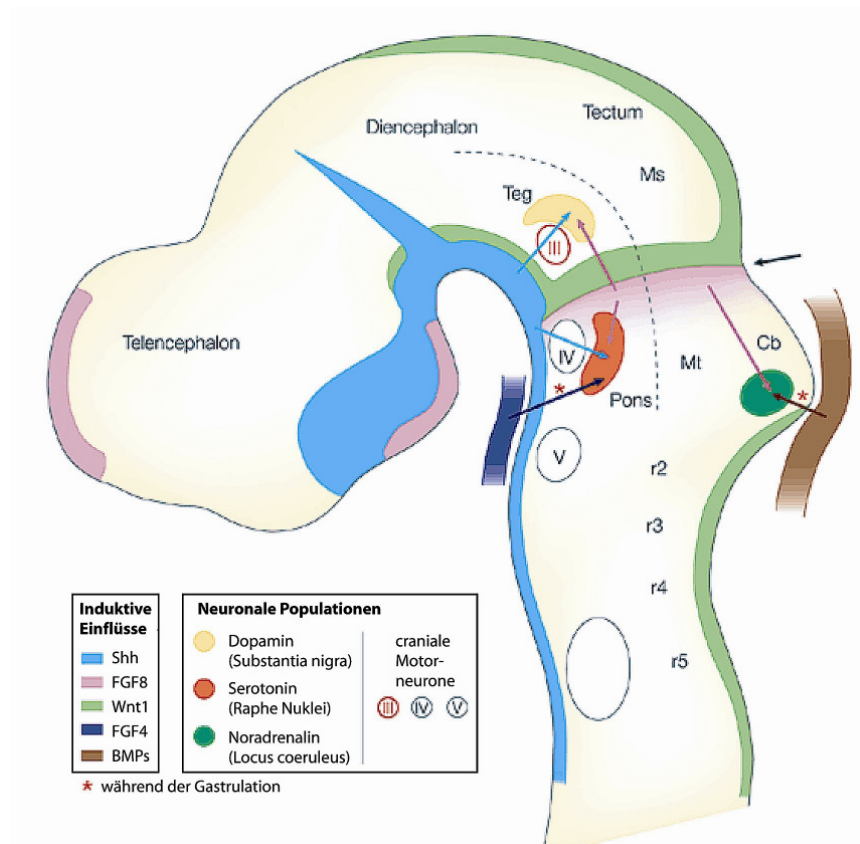


Abb.1.4 Das Zusammenspiel von Signalen etabliert anterioposteriore und dorsoventrale Identitäten an der Mittel-/ Hinterhirn Grenze. Sagittaler Blick auf das Neuralrohr eines 11.5 Tage alten Mausembryos. Induktive Einflüsse entstammen der Neuralplatte (FGF8, Shh) wie auch nicht-neuronalen Geweben während der der Gastrulation (FGF4, BMPs). Der *Locus coeruleus* entwickelt sich im dorsalen Rhombomer1 (r1) unter dem Einfluß von BMPs, Serotonin produzierende Neuronen im r1 unter dem Einfluß von *Shh* und FGF4, dopaminerge Neuronen in der Substantia nigra unter dem Einfluß von *Shh* und FGF8. Der schwarze Pfeil zeigt die Mittel-Hinterhirn-Grenze an. BMPs=*bone morphogenetic proteins*; FGF=*fibroblast growth factor*; MS=Mesencephalon; Mt=Metencephalon; r=Rhombomere; Shh=*sonic hedgehog*; Teg=Tegmentum; Tel=Telencephalon; Pfeil=Isthmic Organizer. Modifiziert nach Wurst and Bally-Cuif (2001).

Diese frühen morphologischen Ereignisse der Neuraxisbildung werden begleitet durch eine positionsspezifische Expression von Entwicklungsgenen, die den Plan des ZNS induzieren und regionale Spezialisierungen markieren (Lumsden and Krumlauf, 1996; Mathis et al., 1999). Bisher bekannt sind das ANR (*anterior neural ridge*) im Schnittpunkt zwischen *Prosencephalon* und anterioren Ectoderm, welches durch die Produktion von FGFs (*fibroblast growth factors*) eine Vorderhirnidentität etabliert (Houart et al., 1998; Shimamura and Rubenstein, 1997) sowie der Isthmische Organizer (IsO) in der Einschnürung zwischen Mittel und Hinterhirn (Bally-Cuif and Wassef, 1995), der *wnt* und FGFs produziert und sowohl notwendig (Cowan, 1982) als auch hinreichend (Martinez et al., 1991) für die Entwicklung mesencephalischer und metencephalischer Strukturen ist.

1.3.1 Die Rhombomere des Rhombencephalons

Im Verlauf seiner Entwicklung teilt sich das Rhombencephalon in anterioposteriorer Richtung in Segmente, auch Rhombomere genannt, die in der Differenzierung und Segregation von Neuronen entlang der anteroposterioren Achse des Hinterhirns eine entscheidende Rolle spielen (Lumsden and Keynes, 1989). Bei der Ausbildung der Rhombomere vermischen sich Zellen nicht mit den Nachbarzellen anderer Rhombomere (Fraser et al., 1990). Diese Segregation bestimmt die Zell-Zell Interaktion und Genaktivierung so, dass jedes Kompartiment durch die Aktivität einiger spezifischer Gene unterschieden werden kann (Hunt et al., 1991a; Hunt et al., 1991b): die Expression verschiedener Homöobox-Gene z.B. endet an den Grenzen zwischen den Rhombomeren (Marshall et al., 1992) und etabliert in Wechselwirkung mit anderen Genen eine eigene Identität der Kompartimente.

Die Entwicklung der 8 Rhombomere beginnt in E8 mit den Vorläufern A und B (Theiler, 1989), aus denen sich im weiteren Verlauf Rhombomer 1-2 sowie Rhombomer 3-8 bilden. Um E9 sind die Rhombomere 1-6, ab E9.5 alle 8 ausgebildet. Am zwölften Tag hat sich die rhombomerische Morphologie aufgelöst. Nun ist die Identifizierung der Wurzeln und Ganglien einzelner cranialer Nerven möglich (Kandel, 2000; Kaufmann, 1999), die aus den Segmenten entstehen.

1.3.2 Die Rhombische Lippe

Die Rhombische Lippe (RL), welche aus dem Raum zwischen dem dorsalen Neuroepithelium und der Dachplatte des vierten Ventrikels besteht, ist der Ursprung verschiedener migratorischer Neuronenpopulationen und wandernder cerebellarer Granulozellvorläufer (Wingate, 2001). Erstere tragen zu den verschiedenen precerebellaren Nuklei des Hinterhirns

bei (Harkmark, 1954; Rodriguez and Dymecki, 2000), während letztere aus dem rostralen Teil der Rhombischen Lippe (RRL) entstehen und sich als externale germinale Schicht des *Cerebellums* sowie Vorläufern des noradrenergen *Locus coeruleus* (LC) ausbilden (Lin et al., 2001; Wingate and Hatten, 1999).

1.3.3 Die Rolle der Phox-Gene in der noradrenergen Entwicklung

Einige Zellen aus der Rhombischen Lippe des Rhombomer1 verlassen als Vorläuferzellen die Rhombische Lippe in ventraler Richtung und bilden anschließend am Boden des vierten Ventrikels den zelldichten Nukleus *Locus coeruleus*. In die Bildung dieser Zellen sind mehrere Transkriptionsfaktoren verwickelt. Entscheidend für die Differenzierung des noradrenergen Charakters der Zellen sind die *Phox2*-Gene, *Phox2a* und *Phox2b*. Die beiden paralogen Homeodomänen Proteine gehören zu der großen Q50 paarähnlichen Klasse (Galliot et al., 1999). Ihre Expression beschränkt sich auf wenige Klassen differenzierender Neurone. Im peripheren Nervensystem (PNS) sind sie in alle autonomen Ganglien (sympathisch, parasymphatisch und enterisch) und den drei cranialen Ganglien des Fazial- (VII), Hypoglossal- (IX) und Vagus (X) Nerv exprimiert. Im ZNS sind sie in die Differenzierung aller noradrenergen Zentren, aber auch Populationen von Interneuronen im Hinterhirn und Rückenmark involviert.

Wurden seit der Entdeckung von *Phox2a* (Tissier-Seta et al., 1993; Valarche et al., 1993) alle Neuronen die zeitweise oder permanent Dopamin- β -Hydroxylase (DBH), das Schlüsselenzym der Noradrenalin-Biosynthese, exprimieren, in die *Phox2*-Expressionsdomäne mit einbezogen, so weiß man jetzt, dass *Phox2a* und *2b* zusammen den noradrenergen Phänotyp determinieren. Das Fehlen von *Phox2a* führt zum Fehlen der Anlage des Hauptzentrums des noradrenergen Systems, dem *Locus coeruleus*. Der *Locus subcoeruleus* und die noradrenergen Zentren A1/C1, A2/C2, A5 und A7 bleiben jedoch intakt (Morin et al., 1997). Inaktivierung von *Phox2b* dagegen unterbricht die noradrenerge Differenzierung im gesamten Nervensystem (Pattyn et al., 2000a; Pattyn et al., 2000b; Pattyn et al., 1999). *Phox2b*^{-/-}-Embryonen sterben in der Mitte der Embryonalentwicklung mit Zeichen kardiovaskulärer Kongestion (Pattyn et al., 2000b), ähnlich wie *DBH* und *Tyrosin Hydroxylase knockouts* (Thomas and Palmiter, 1997; Zhou and Palmiter, 1995). Wie diese können sie ebenfalls bis zur Geburt durch Gabe von noradrenergen Agonisten an die Mutter gerettet werden (Pattyn et al., 2000b). Forcierte Expression entweder von *Phox2a* oder *Phox2b* kann in Derivaten von Neuralleistenzellen von Maus und Huhn *Tyrosin Hydroxylase* induzieren (Lo et al., 1999; Stanke et al., 1999), im Rhombencephalon von Zebrafisch (Guo et al., 1999) und Huhn (Vogel-Hopker and Rohrer, 2002) sogar *Tyrosin Hydroxylase* und *Dopamin β -Hydroxylase*. Wenn auch beide *Phox*-Gene gleichermaßen den *DBH*-Promotor transaktivieren können

(Adachi et al., 2000; Yang et al., 1998), so hängen doch nur zwei Strukturen in ihrer noradrenergen Differenzierung von *Phox2a* ab: der LC und die cranialen sensorischen Ganglien. *Phox2a* agiert zeitlich vor (*upstream*) von *Phox2b*, welches wiederum für die Expression von Dopamin β -Hydroxylase verantwortlich ist (Pattyn et al., 2000a). *Phox2a* kann *DBH* jedoch nicht an allen Expressionsorten anschalten. Der noradrenerge Phänotyp scheint deshalb im Vergleich zu anderen Neurotransmitter Typen eine eher mosaikartige als einheitliche Ontogenese zu haben (Brunet and Pattyn, 2002).

Mash1, welches für die *DBH*-Expression in allen Zelltypen mit Ausnahme der cranialen Ganglien verantwortlich ist, agiert mit *Phox2b* in sympathischen Neuronen parallel (Hirsch et al., 1998; Pattyn et al., 1999), aber in einer linearen *Mash1>Phox2a>Phox2b* (Abb.1.5) oder *Mash1>Phox2b* Kaskade im LC und anderen noradrenergen Zentren (Pattyn et al., 2000b). *Mash1* definiert zusammen mit *Phox2*-Genen eine Gruppe Mastergene, die in verschiedenen epistatischen Anordnungen von Ort zu Ort unterschiedlich interagieren. Andere Transkriptionsfaktoren, wie *Rnx* (Qian et al., 2001), *GATA* (Lim et al., 2000) und die HANDs (Howard et al., 1999) partizipieren an der noradrenergen Differenzierung einiger aber nicht aller noradrenerger Zelltypen. So fehlen bei *Rnx*^{-/-}-Embryonen die noradrenergen Zentren A1, A2, A5, *Locus subcoeruleus* (A7) sowie der caudale *Locus coeruleus*, Zellen der rostralen *Locus coeruleus* werden jedoch ausgebildet (Qian et al., 2001).

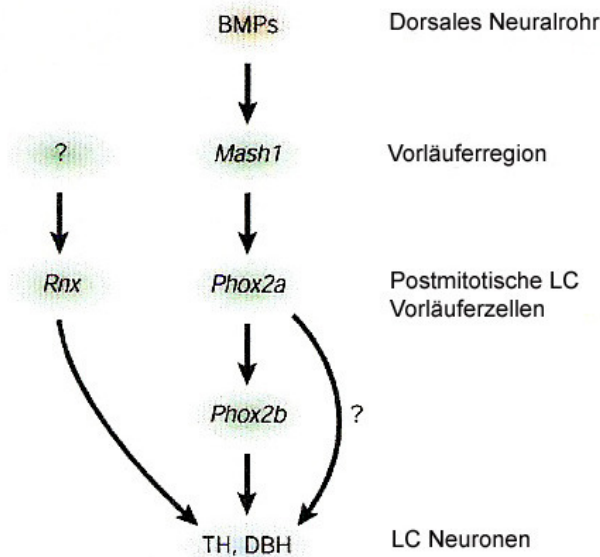


Abb.1.5 Die Entwicklung des LC steuernde Transkriptionsfaktor-Kaskade. Die korrekte Entwicklung des LC hängt von BMPs ab, die im dorsalen Neuralrohr exprimiert werden (BMP5 beim Huhn). *Mash1* ist in den Vorläufern exprimiert und wird für die Expression von *Phox2a* in frühen postmitotischen migrierenden Neuronen benötigt, welches wiederum die Expression von *Phox2b* aktiviert. Expression der Noradrenalin synthetisierenden Enzyme Thyrosin Hydroxylase (TH) und Dopamin β -Hydroxylase (DBH) ist abhängig von *Mash1*, *Phox2a*, *Phox2b* und *Rnx*. Die genaue Position von *Rnx* innerhalb der Regulationskaskade ist noch nicht gesichert. Modifiziert nach Goridis and Rohrer (2002).

Eine weitere Gemeinsamkeit noradrenerger Differenzierung ist jedoch die Tatsache, dass *bone morphogenetic proteins* (BMPs) zeitlich vor *Phox2*-Genen im LC (Guo et al., 1999; Vogel-Hopker and Rohrer, 2002) (siehe Abb.1.4 und 1.5) und sympathischen Ganglien

(Reissmann et al., 1996) agieren. Diese zur TGF- β -Unterfamilie gehörenden Moleküle signalisieren in der frühen Musterbildung aus dem dorsalen Ectoderm (siehe Abb.1.4) und sorgen damit für eine Unterteilung des Ektoderms einschließlich der Neuralplatte (Mayor and Aybar, 2001). Später sind sie in die Induktion der dorsalen Phänotypen der Mittellinie, der Neuralleiste und der Dachplatte involviert (Arkell and Beddington, 1997; Liem et al., 1995).

1.4 Der *Locus coeruleus* und das Noradrenerge System

Der *Locus coeruleus* (LC) gehört zum Noradrenergen System, welches sich vom Rückenmark bis in die Brücke des Rhombencephalons hinein erstreckt und aus mehreren Nuklei besteht, die in aufsteigender Reihe vom Rückenmark als A1-A7 bezeichnet werden (Benninghoff, 1985) (Siehe Abb.1.6). Gemeinsam ist allen Nuklei die Synthese von Noradrenalin, welches in mehreren Schritten aus der Aminosäure Tyrosin synthetisiert wird (Abb.1.7B).

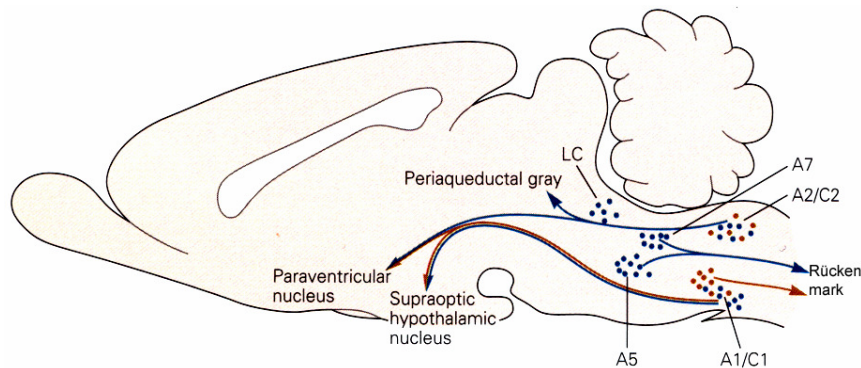


Abb.1.6 Noradrenerge und adrenerge Neuronen in verlängertem Rückenmark und Pons

Die noradrenergen Projektionen zum Rückenmark gehen von den Gruppen A5, A7 aber auch vom *Locus coeruleus* aus. Aufsteigende noradrenerge Fasern zum Hypothalamus entstammen auch A1 und A2. Modifiziert nach Kandel (2000).

Der LC selbst wird als A6-Gruppe bezeichnet und liegt ventral des Vierten Ventrikels im Bereich des Pons. Henle beschrieb ihn 1868 als „eine von braun pigmentierten Nervenzellen gefärbte, durch den dünnen Marküberzug bläulich schimmernde Stelle“ (Henle, 1868). Dieser seit 1809 beschriebene (Reil, 1809), früher als *Nucleus pigmentosus pontis* bezeichnete Kern kommt in allen Säugetieren vor und stellt die größte Noradrenalin-Quelle des Zentralnervensystems dar (Brodal and Brodal, 1981; Russell, 1955).

1.4.1 Subpopulationen des *Locus coeruleus*

Im Gegensatz zu der bläulichen Farbe beim Menschen sind die LC-Neuronen der Maus und Ratte unpigmentiert und als dichtgepackter Zellhaufen im rostralen rhombencephalischen Tegmentum zu erkennen. Caudal erstreckt sich der LC bis zum Knie des Fazialnervs, rostral reicht er bis in die periaquaeductale graue Substanz (Grzanna and Molliver, 1980). Die Anzahl der LC-Zellen in der Ratte schwankt zwischen 1400 und 1800 (Descarries and Saucier, 1972; Goldman and Coleman, 1981; Loughlin et al., 1986a; McBride et al., 1985; Swanson, 1976) in Abhängigkeit von der Färbemethode. Es können verschiedene Typen von Neuronen unterschieden werden, die zu jeweiligen Subnuklei zusammengefasst werden. Swanson (1976) unterscheidet einen großen dorsalen Bereich aus kleinen dichtgepackten Zellen von einem kleineren ventralen Bereich im caudalen Drittel des LC, bestehend aus ca. 200 größeren weniger dicht gepackten Zellen (Abb.1.7A). Eine kleine Untereinheit wird durch große multipolare Neuronen gebildet, die rostral zum kompakten LC verteilt in der ventralen periaquaeductalen grauen Substanz liegen, und sich von den Nachbarzellen durch den Noradrenalingehalt unterscheiden (Grzanna and Molliver, 1980; Grzanna, 1980).

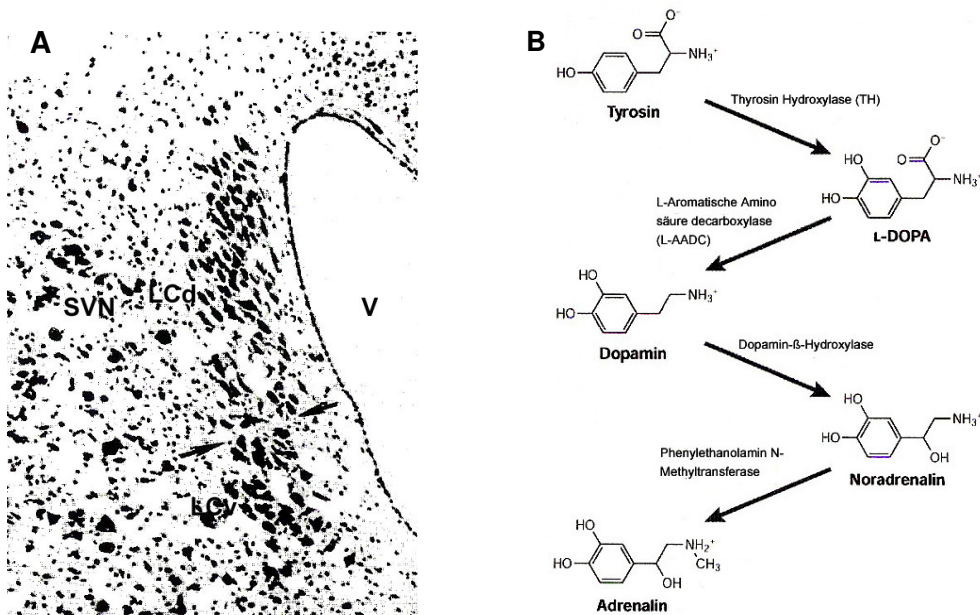


Abb. 1.7 Einteilung des LC (A) & Syntheseweg des Neurotransmitters Noradrenalin (B)

A) Der *Locus coeruleus* lässt sich aufgrund zytomorphologischer Aspekte in einen dorsalen (dLC) und ventralen (vLC) einteilen SVN=Nucleus superior vestibularis ; V=4ter Ventrikel. Modifiziert nach Swanson (1976).

B) LC-Zellen produzieren den Neurotransmitter Noradrenalin, der in mehreren Schritten aus der Aminosäure Tyrosin synthetisiert wird. Die katalysierenden Enzyme Tyrosin Hydroxylase sowie Dopamin β -Hydroxylase werden als Nachweis von noradrenergen Zellen genutzt. Modifiziert nach Goridis and Rohrer (2002).

Loughlin et al. (1986b) konnten anhand von Projektionsstudien gar sechs Untergruppen unterscheiden: erstens große multipolare Zellen im ventralen LC, die zum Rückenmark und Cerebellum projizieren; zweitens fusiforme Zellen im dorsalen LC projizierend zu Hippocampus und Cortex; drittens große multipolare Zellen im anterioren Pol des LC; viertens kleine runde Zellen im zentralen und anterioren LC, die beide zum Hypothalamus projizieren; fünftens posteriore Polzellen und sechstens mittelgroße multipolare Zellen, auch Core-Zellen genannt.

1.4.2 Neurotransmitter und Projektionen des *Locus coeruleus*

Alle Neuronen im LC sind noradrenerg (Dahlstrom and Fuxe, 1965; Swanson, 1976), allerdings kommen in manchen Unterteilen auch andere Neurotransmitter wie Neuropeptid Y oder Vasopressin vor (Caffe et al., 1985; Everitt et al., 1984).

Es gibt Evidenzen, dass eine große Anzahl Neurotransmitter den LC innervieren können. Bestätigt werden konnten bisher unter anderem verschiedene Opiat Rezeptoren (Atweh and Kuhar, 1977) und α -2-Adrenorezeptoren (Young and Kuhar, 1980). Neurophysiologische Studien zeigen, dass LC-Neuronen durch eine Vielzahl von Neurotransmittern stark beeinflusst werden. Uner anderem werden sie hochgradig inhibiert durch α -2-adrenerge Agonisten (Aghajanian et al., 1977; Cedarbaum and Aghajanian, 1976), GABA (Cedarbaum and Aghajanian, 1977) und μ -Opiat Agonisten (Bird and Kuhar, 1977; Williams and North, 1984). Angeregt werden sie unter anderem durch Acetylcholine (Aston-Jones et al., 1991; Bird and Kuhar, 1977; Guyenet and Aghajanian, 1979), Glutamat (Aston-Jones et al., 1991; Olpe and Jones, 1982), Substanz P (Aston-Jones et al., 1991; Guyenet and Aghajanian, 1977; Guyenet and Aghajanian, 1979; Olpe and Jones, 1982) Vasopressin (Olpe, 1981), Adrenocorticotropin Hormon und *Corticotrophin Releasing Factor* (Valentino et al., 1983).

LC-Neuronen erhalten Signale unterschiedlichen Ursprungs (Foote et al., 1983), direkte afferente Projektionen stammen jedoch überwiegend aus zwei rostralen medullären Gruppen, dem lateralen paragigantocellularis (LPGi) und dem prepositus hypoglossi (PrH) (Aston-Jones et al., 1986). Bei den efferenten Projektionen des LC können aufsteigende und absteigende unterschieden werden. Aufsteigende wurden zum Riechkolben, Neocortex, Hippocampus, Thalamus, Striatum, basalem Vorderhirn, Hypothalamus und Mittelhirn, absteigende zum Cerebellum, Pons, Medulla oblongata und Rückenmark beschrieben (Abb.1.8) (Aston-Jones, 1995).

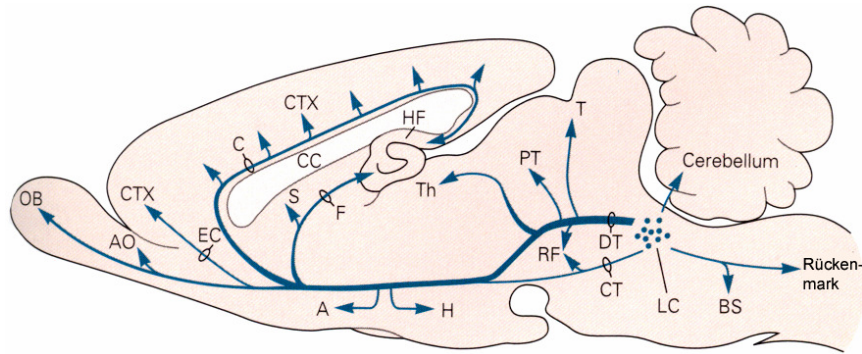


Abb. 1.8 Projektionen des Locus coeruleus

CTX=Cortex; LC=Locus coeruleus; OB=Riechkolben; Th=Thalamus; H=Hypothalamus
 A=Amygdala; AO=anterioren olfaktorischer Nukleus; BS=Hirnstamm; C=Cingulatorische Bündel;
 CC=Corpus callosum; CT=zentraler tegmentaler Trakt; DT=Dorsales tegmentales Bündel;
 EC=external capsule; F=Fornix; HF=Hippocampale Formation; PT= pretektale Nuclei; RF=reticuläre
 Formation; S=Septum; T=Tectum; Th=Thalamus. Modifiziert nach Kandel (2000).

Labeling-Experimente anhand neuronaler Reporter zeigten, dass die meisten LC-Zellen zu mehr als einer Zielregion projizieren (Aston-Jones, 1995). Nichtsdestotrotz lassen sich Zellen unterscheiden, die bevorzugt Projektionen in eine definierte Region ausbilden. So projizieren kleine runde Zellen im zentralen LC bevorzugt zum *Hypothalamus* (Loughlin et al., 1986b), fusiforme Zellen im ventro-caudalen Bereich des LC zum Rückenmark (Loughlin et al., 1986a; Room et al., 1981; Satoh et al., 1977; Westlund et al., 1981; Westlund et al., 1983), Zellen im dorsalen Bereich zum *Hippocampus* (Loughlin et al., 1986b), fusiforme Zellen in den caudalen 3/5 des dorsalen LC zum cerebralen Cortex (Waterhouse et al., 1983) und große multipolare Zellen verteilt über den ganzen LC zum *Cerebellum* (Loughlin et al., 1982).

1.4.3 Funktionen des Locus coeruleus

Bisherige Untersuchungen sprechen dafür, dass der LC der am weitesten projizierende Nukleus im Zentralnervensystem ist (Aston-Jones, 1995). In vielen Experimenten wurden deshalb die Effekte von Noradrenalin (NA) auf Neurone verschiedener Zielgebiete untersucht. Die Variation der postsynaptischen Effekte hängt dabei vom aktivierten Noradrenalin-Rezeptor ab und reicht von der einfachen Inhibition bis zur Modulation der Antwort von Zielneuronen (Foote et al., 1983). Diese verschiedenen Effekte wurden in Hinsicht auf Verhaltensweisen untersucht, bei denen Noradrenalin vom efferenten Netzwerk der LC-Fasern ausgeschüttet wird. Studien zeigten, dass LC-Neuronen ihre Aktivität und Noradrenalinausschüttung mit dem Schlaf-Wach-Zyklus und als Antwort auf eine Vielzahl sensorischer Stimuli verändern (Aston-Jones and Bloom, 1981a; Aston-Jones and Bloom, 1981b; Grant et al., 1988; Hobson et al., 1975; Rasmussen et al., 1986). Die Anatomischen

und physiologischen Möglichkeiten der LC-Neuronen, Lesionsstudien, pharmakologische Experimente sowie elektrophysiologische Aufnahmen postulieren eine Funktion des LC in Schlafverhalten (Hobson et al., 1975; Jouvet, 1969), Erinnerungsvermögen (Sara and Devauges, 1989) und Wachsamkeit (Aston-Jones, 1985; Foote et al., 1980; Foote and Morrison, 1987). Darüber hinaus wurden Rollen in Stress und Schmerzempfindung postuliert.

1.4.3.1 Die Funktion des Locus coeruleus im Schlaf-Wachsystem

Das Gehirn besitzt autochthone neurale Systeme, die im Schlafzustand das Aufwachen als Antwort auf sensorische Stimuli hervorrufen. Über aufsteigende Projektionen zum *Cortex* stimulieren diese Erweckungs-Systeme (*arousal-Systeme*) die corticale Aktivierung, über absteigende Projektionen ins Rückenmark stimulieren sie den Muskel-Tonus. Sie bestehen aus neuronalen Aggregaten in Rückenmark, *Pons*, *Thalamus*, *Hypothalamus* und basalem Vorderhirn und verwenden entsprechend der involvierten Neurone des jeweiligen Systems die Neurotransmitter Glutamat, Dopamin, Noradrenalin, Serotonin und Histamin. Größtenteils sind sie zwar redundant, jedoch können sie unterschieden werden, da jedem Neurotransmitter-System eine spezielle Rolle im Schlaf und Wachsein zukommt (zur Übersicht siehe (Jones, 2003)). Der *Locus coeruleus* und das zentrale noradrenerge System fördern einen erregten Wachstatus und verhindern REM- (*rolling eye movement*) und SWS-Schlaf (*slow wave sleep*), indem sie Noradrenalin ausschütten und dadurch zur Initiation und Beibehaltung neuronaler Vorderhirnaktivität und Verhalten beitragen (Jones, 2003). So konnten in pharmakologischen Untersuchungen durch Erweckung hervorgerufene Veränderungen in der tonischen Aktivität der LC-Zellen gemessen (Berridge and Foote, 1991; Berridge and Foote, 1996; Berridge and O'Neill, 2001) und während erregter Aufwachzustände Phasenveränderungen durch hervorstechende Stimuli beobachtet werden (Baldo et al., 2003).

Außerdem wird im Wachzustand die Sammlung und Weiterverarbeitung von auffälligen sensorischen Informationen in corticalen Aufmerksamkeits- und Erinnerungskreisläufen moduliert (Berridge and Waterhouse, 2003). Deshalb wurde vermutet, dass die Missregulation der Noradrenalinausschüttung im LC zu Kognitiv- und Wachsamkeitsstörungen führen könnte, die mit verschiedenen Psychiatrischen Erkrankungen, wie Aufmerksamkeits-Defizit-Hyperaktivität-Syndrom (ADHD), und Schlaf-Wach-Störungen assoziiert werden (Aston-Jones, 1995).

1.4.3.2 Der Locus coeruleus und die circadiane Uhr

In Anpassung an die Tagesschwankungen der Umgebung haben sich in Organismen von Cyanobakterien bis Menschen (Dunlap, 1999) innere Uhren entwickelt (Rensing et al., 2001), welche diese Schwankungen antizipieren und Physiologie und Verhalten daran anpassen. Bei Säugetieren ist der zentrale circadiane Schrittmacher im *Nucleus suprachiasmaticus* (SCN) des *Hypothalamus* lokalisiert (Klein, 1991). Von dort werden periphere Uhren in den Organen des Körpers kontrolliert, die dann den Gesamtrhythmus des Organismus erzeugen (Akhtar et al., 2002; Panda et al., 2002; Storch et al., 2002). Circadiane Rhythmen bleiben auch in der Abwesenheit externer Zeitinformationen stabil mit Periodenlängen um 24 Stunden, deshalb auch die Bezeichnung "circadian" von Lateinisch *circa dies*, was „ungefähr ein Tag“ meint (Halberg and Visscher, 1952). Hinweise über die Tageszeit, so genannte *Zeitgeber*, wie Licht, Temperaturveränderungen oder Nahrungsaufnahme können die Phase des endogenen Oszillators verschieben, um so den Organismus ständig mit der geophysikalischen Zeit zu synchronisieren (Hastings et al., 1995). Auf molekularer Ebene besteht die circadiane Uhr aus einzelnen zellulären Oszillatoren. Uhrengene wie *Clock*, *Bmal1*, *mPer1* und *mPer2*, *mCry1* und *mCry2* sowie *Caseinkinase 1ε* sind in einem System von Transkriptions-/Translations-Rückkopplungsschleifen organisiert, das einen präzisen und stabilen 24h-Rhythmus generiert. Der SCN, als Sitz der inneren Uhr, erhält Signale über Projektionen aus verschiedenen Gehirnbereichen. Neurone im ventrolateralen SCN erreichen glutamaterge Signale über den retinohypothalamischen Trakt aus der Retina (Moore and Lenn, 1972), Neuropeptide Y (NPY) Signale aus dem *intergeniculate leaflet* (IGL) des lateralen *Nucleus geniculatus* über den geniculohypothalamischen Tract (Swanson and Cowan, 1975), and serotonerge (5-HT) Signale aus den *Raphé nuclei* (Bosler and Beaudet, 1985; Francois-Bellan and Bosler, 1992). Die Neuronen des dorsomedialen SCN erreichen die photischen Signale des Cortex, basalen Vorderhirns und Hypothalamus nicht (Moga and Moore, 1997).

In Experimenten der letzten Jahre konnten in *labeling*-Experimenten mit axonalen transportierten Indikatoren Verbindungen zwischen dem LC als Zentrum des Erweckungssystems und der circadianen Uhr im SCN gezeigt werden (Aston-Jones et al., 2001; Krout et al., 2002). Aston Jones et al. (2001) konnten eine Verbindung von SCN zum LC direkt und via DMH, Krout et al. (2002) eine direkte Projektion vom LC zum SCN nachweisen. Außerdem konnte eine nicht photische Verbindung von LC über das IGL zum SCN gezeigt werden (Vrang et al., 2003) (siehe auch Abb.4.2). Damit wird der für das Wachsystem entscheidende Nucleus funktionell in die Rolle eines Vermittlers zwischen der circadianen Uhr und Schlaf/Wachsystem gerückt.

1.4.3.3 Die Rolle des *Locus coeruleus* in der Schmerzmodulation

Das Schmerzsystem kann als eine Zusammenstellung neuronaler Leitungen gesehen werden, welche für die Weiterleitung von Schmerzstimuli verantwortlich sind (Willis, 1995). In der Haut oder anderen Organen gelegene Nozizeptoren, dies sind sensorische Rezeptoren, die Schäden oder die Gefahr eines Schadens weiterleiten (Sherrington, 1906), innervieren die Haut und andere Organe wie Muskeln, Gelenke und Eingeweide (Willis, 1985; Willis, 1991) und versorgen myelinisierte A δ -Fasern oder unmyelinisierte C-Fasern mit Signalen (Willis, 1995). Aufsteigende Bahnen leiten Signale in den *Thalamus* und *Cortex* weiter, wo dann ein Schmerzgefühl generiert wird, absteigenden Bahnen wurden Schmerz-modulierende Eigenschaften zugeschrieben (Basbaum and Fields, 1978), z.B. durch die Inhibierung der spinalen Schmerz-bedingten Antwort durch Aktivierung von α 2-Adrenozeptoren (Suh et al., 1989). Mehrere Forschungsgruppen konnten zeigen, dass die elektrische Stimulation von LC-Neuronen in anästhesierten Ratten zu Antinozizeption führt (Janss et al., 1987; Jones and Gebhart, 1986; Margalit and Segal, 1979; Segal and Sandberg, 1977). Diese Schmerzverminderung konnte durch die Gabe von noradrenergen Agonisten blockiert werden (Jones and Gebhart, 1987). Außerdem konnte gezeigt werden, dass durch bilaterale Läsionen des LC der Noradrenalin-Gehalt in Rückenmarksneuronen um 40-70% reduziert wird (Karoum et al., 1980; Nygren and Olson, 1977). Auf der anderen Seite ist bekannt, dass schmerzliche Stimuli, wie z.B. Schwanzkneifen (Aston-Jones and Bloom, 1981a) oder thermaler Fußschock durch Hot Plate-Experimente (Cedarbaum and Aghajanian, 1978) LC-Neurone aktivieren, die mit einem erhöhten Umsatz (Korf et al., 1973) und verstärkter Ausschüttung von Noradrenalin im cerebralen *Cortex*, dem *Hippocampus* und der *Amygdala* reagieren (Stanford, 1995). Durch die Funktion in der Schmerzmodulation wurden pharmakologische Untersuchungen zur LC-Reaktion auf Drogen angestellt. So aktiviert Nikotin bei systemischer Gabe LC-Neuronen, Kokain und Amphetamine haben inhibitorische Wirkung (Valentino, 2000).

1.4.4 Der *Locus coeruleus* und neurodegenerative Erkrankungen

Die Parkinsonsche Erkrankung (PE) ist eine neurodegenerative Funktionsstörung der Motorik, die durch einen Schaden der dopaminergen Neuronen in der *Substantia nigra* gekennzeichnet ist. Dieser führt zu klinischen Symptomen, wie andauernden Tremor, Steifheit und Haltungsschäden. Neben den dopaminergen Neuronen der *Substantia nigra* ist auch der *Locus coeruleus* bei Parkinson-Patienten durch einen massiven Zellverlust gekennzeichnet und dementsprechend in seiner Funktion beeinträchtigt (Gesi et al., 2000). Obwohl neuropathologische Studien über das letzte Jahrhundert dies bestätigen (Arima and

Akashi, 1990; Baker et al., 1989; Chan-Palay and Asan, 1989; Greenfield, 1953; Tretiakoff, 1919), haben sich bisher nur wenige funktionelle Studien auf diese Beobachtung als Schlüsselement gestützt. Daten von Mavridis et al. (1991) und Kilbourn et al. (1998) zeigen jedoch, dass der Verlust von Noradrenalin signifikanten Einfluss, sowohl auf den Beginn als auch auf den Verlauf der Schadens im Dopaminergen Nigrostratialtrakt besitzt: erstens durch die direkte Unterstützung der PE Symptome, zweitens durch eine Verstärkung des bereits bestehenden nigrostratialen Schadens.

1.5 Lipidstoffwechsel

Lipide sind aus Estern des Cholesterins und gesättigten oder ungesättigten Fettsäuren zusammengesetzte Triglyceride, die sowohl wichtige Lieferanten für Energie, Strukturbestandteile in Membranen, als auch Grundbausteine für weitere Moleküle, z.B. Hormone darstellen (Campbell, 2003). Nach der Nahrungsaufnahme werden sie im Zwölffingerdarm mit Hilfe von Gallsäuren und Pankreaslipasen in Fettsäuren und Monacylglycerol gespalten, resorbiert und anschließend von den Zellen der Darmmucosa zu Fetten und Phosphatiden und Apoproteinen synthetisiert. In Chylomikronen, proteinumhüllten Fetttropfchen, verpackt werden diese großen Teile durch Exocytose in den Interzellularraum, in die Lymphe und anschließend in die Blutbahn transportiert (Berg, 2003; Karlson, 1994). Zur Energiegewinnung werden die Lipide wiederum in Glycerol und Fettsäuren gespalten und in der β -Oxidation der Fettsäuren, welche in Mitochondrien und Peroxysomen (*microbodies*) stattfinden kann, Energie freigesetzt (Berg, 2003). Da Lipide hydrophob reagieren, ist ihr Transport im Blut nur in Form von Lipoproteinen möglich, die durch Anlagerung der Lipide an Apolipoproteine entstehen (Karlson, 1994).

1.5.1 Apolipoproteine

Apolipoproteine sind strukturelle Komponenten der Lipoproteine. Diese gehören zu der α - und β -Globulin Familie der Plasmaproteine und fungieren als Transportmoleküle für Phospholipide, Neutralfette, Cholesterin und Cholesterolester. Bisher wurden neun verschiedene Apolipoproteine entdeckt: ApoAI, ApoAII, ApoB, ApoCI, ApoCII, ApoCIII, ApoE, ApoH und Lp(a) (Berg, 2003).

Lipoproteine werden in der Reihenfolge abnehmender Proteinbestandteile als *high density lipoproteins* (HDL), *low density lipoproteins* (LDL), *very low density lipoproteins* (VLDL) sowie Chylomikronen, Fetttropfchen mit einer löchrigen Proteinhülle, klassifiziert (Wang and

Briggs, 2004). Die Zusammensetzung der Lipid-Protein-Komplexe wechselt stark, da sie Lipide aufnehmen und abgeben, sowie Apolipoproteine austauschen. Deshalb kann die Einteilung nach Dichte nur in relativen Grenzen angegeben werden (Karlson, 1994).

Die nach der Darmresorption aufgebauten Chylomikronen werden in der Blutbahn sehr schnell abgebaut. Sie nehmen von HDL ApoCII auf, welches die Lipoprotein Lipase (LPL) aktiviert, die wiederum die Fette der Chylomikronen hydrolysiert. Die freigesetzten Fettsäuren werden entweder vom Fettgewebe aufgenommen oder vom Albumin des Blutes weitertransportiert. Übrig gebliebene Partikel werden von der Leber abgefangen und völlig abgebaut (zur Übersicht siehe (Berg, 2003)).

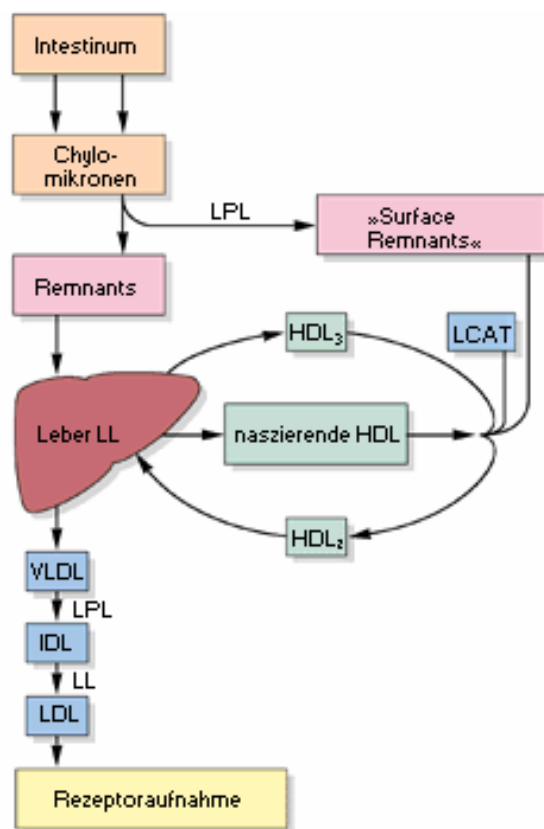


Abb. 1.9 Lipoprotein-Metabolismus

Die nach der Resorption aufgebauten Chylomikronen werden in der Blutbahn sehr schnell abgebaut. Die Lipoprotein-Lipase (LPL) hydrolysiert die Fette der Chylomikronen. Freigesetzte Fettsäuren werden entweder vom Fettgewebe aufgenommen oder vom Albumin des Blutes weitertransportiert (Surface Remnants), übrig gebliebene Partikel (Remnants) werden von der Leber abgefangen und abgebaut.

Von der Leber aufgebaute VLDLs werden in die Blutbahn abgegeben und verteilen die von der Leber synthetisierten Lipide im Organismus. Durch Spaltungen werden sie zu IDL (*intermedium density lipid*) und anschließend LDL, welches peripher durch LDL-Rezeptoren aufgenommen wird. HDLs entstehen in Leber und Darm. Sie reifen im Blut durch Aufnahme von Lipiden und Apoproteinen zu Molekülen, die sich in Dichte und Proteinkomponente als HDL₂ und HDL₃ unterscheiden. Die an HDL gebundene LCAT (Lecitin-Cholesterin-Acetyltransferase) katalysiert die Bildung von Cholesterolestern. Nach G.M. Kostner 1981 (in Intern Welt 4).

VLDLs werden von der Leber aufgebaut und in die Blutbahn abgegeben. Wie Chylomikronen verteilen sie von der Leber synthetisierte Lipide im Organismus, werden durch die LPL gespalten und dadurch zu den kleineren LDLs. Anschließend werden diese peripher durch LDL-Rezeptoren aufgenommen (siehe Abb.1.9). HDLs werden von Leber und Darm produziert. Sie nehmen aus den VLDL und Chylomikronen die Apolipoproteine C und E sowie Phospholipide und Cholesterol auf.

ApoAI und ApoAII stellen jeweils ca. 70% bzw. 20% der HDL-Plasmafraktion. ApoAI wird als wichtige Komponente für den Cholesteroltransport von Körpergeweben zur Leber mit dortiger Exkretion gehandelt. Da der HDL- und damit ApoAI-Spiegel umgekehrt proportional zu dem Risiko von Herzkrankgefäß-Erkrankungen steht (Assmann et al., 1996; Castelli et al., 1986; Despres et al., 2000; Genest et al., 1992; Gordon et al., 1977), wurde ApoAI vor allem in Hinblick auf die Entstehung von Arteriosklerose untersucht. Das unter anderem von *Ear2* regulierte ApoAII (Ladas et al., 1992), scheint für das Ablösen von HDL-Partikeln wichtig zu sein. ApoB ist die primäre Proteinkomponente der LDL- und VLDL-Plasmafraktion und damit involviert in den Transport von Triglyceriden und deren Umwandlung zu Chylomikronen in Mukosazellen (Karlson, 1994). Die drei Apolipoproteine ApoCI, II und III stellen 30-40% der VLDL Plasmafraktion sowie 5% der HDL-Fraktion. Organismen mit einer kombinierten *ApoAI* und *ApoCIII* Defizienz besitzen eine erhöhte Disposition für Herzkrankgefäß-Erkrankungen (Berg, 2003; Karlson, 1994).

1.5.2 Funktion von COUP-TFs im Lipidstoffwechsel

Bei molekularen Charakterisierungen wurde gezeigt, dass COUP-TFI und Arp1 die Transkription vieler Gene regulieren, die in den Fettstoffwechsel involviert sind (Pereira et al., 2000). Diese schließen verschiedene Apolipoproteine (Kardassis et al., 1998; Ladas and Karathanasis, 1991; Lavrentiadou et al., 1999; Mietus-Snyder et al., 1992; Nishiyama et al., 1998; Ochoa et al., 1993), in mitochondriale und peroxysomale β -Oxidation involvierte Enzyme (Carter et al., 1994; Nishiyama et al., 1998), sowie in die Fettsäuresynthese involvierte Enzyme ein (Baes et al., 1995). Für ApoCII konnte je nach Kofaktor eine inhibitorische (TR) oder aktivierende Wirkung (HNF4) nachgewiesen werden (Kardassis et al., 1998). COUP-TFs zeigen eine antagonistische Wirkung bei der HNF4-abhängigen Transkriptionsaktivierung (Ladas et al., 1992; Mietus-Snyder et al., 1992; Sladek et al., 1990).

Wie schon unter 1.2.2 beschrieben, konnte für *Ear2* in vitro nachgewiesen werden, dass es bei Menschen die Expression der in der Leber synthetisierten Apolipoproteine ApoB, ApoCIII und ApoAII unterdrückt, indem es spezifisch an die regulatorischen Elemente bindet und die elementabhängige Transkription der mRNA unterdrückt (Ladas et al., 1992). Ein Ziel dieser Arbeit war es deshalb auch, die Auswirkung der Deletion von *Ear2* auf den Fettstoffwechsel der Mäuse zu untersuchen.

1.6 Entwicklung von Lymphozyten

1.6.1 Thymus und Thymozytenentwicklung

Der Thymus ist eine bilobiale Struktur oberhalb des Herzens und stellt ein wichtiges primäres lymphatisches Organ dar. Er ist von Beginn der Kindheit bis zur Pubertät auffällig groß (Fink and Bevan, 1995; Miller and Osoba, 1967; Sprent, 1993), anschließend schrumpft er progressiv und zeigt nur noch eine dürftige Funktion im hohen Alter (Surh, 1999).

Die Hauptaufgabe des Thymus ist es, T-Lymphozyten zu produzieren, wobei die Antigenspezifität der reifen T-Zellen entscheidendes Kriterium ist. In den peripheren lymphatischen Organen exprimieren typische T-Zellen eine Ansammlung von $\alpha\beta$ T-Zell Rezeptormolekülen (TCR) mit hoher Spezifität für exogene Proteine, die an *Major Histability Complex*-Moleküle (MHC) binden. Im Thymus unterläuft die große Anzahl von Vorläuferzellen einer strengen Selektion. Die Differenzierung im Thymus überleben nur T-Zellen, die geeignete Interaktion ihrer $\alpha\beta$ TCRs mit dem MHC zeigen (Jameson et al., 1995). Anschließend werden sie in die Peripherie transportiert.

Anhand der Expression von Zelloberflächenmarkern werden Thymozyten in vier Untereinheiten eingeteilt; in doppelt negative (DN) CD4-CD8- Zellen, welche in geringer Zahl vorkommen, aber als Stammzellvorläufer wichtig sind; zweitens doppelt positive (DP) CD4+CD8+ Zellen, die $\alpha\beta$ TCRs nur schwach exprimieren und Hauptziel der Thymusselektion sind; sowie drittens einfach positive (SP) CD4+CD8- oder CD8+CD4- Zellen, die eine hohe Anzahl an $\alpha\beta$ TCRs exprimieren und als reife T-Zellen in die Peripherie transportiert werden (Fink and Bevan, 1995; Shortman et al., 1990; Sprent, 1993). Mehr als 95% der unreifen doppelt positiven Thymozyten unterliegen Apoptose: die meisten dieser Zellen durch einen Prozess, der „Tod durch Nichtauswahl“ genannt wird (siehe Abb.1.10) (Surh and Sprent, 1994).

Histologische Färbungen zeigen, dass der Thymus einen dunklen äußeren Cortex und eine helle innere Medulla besitzt. Der Cortex besteht aus dichtgepackten unreifen DP-Thymozyten, eingebunden in ein Netzwerk aus MHCI und MHCII exprimierenden epithelialen Zellen, welche aus den DN-Zellen entstehen.

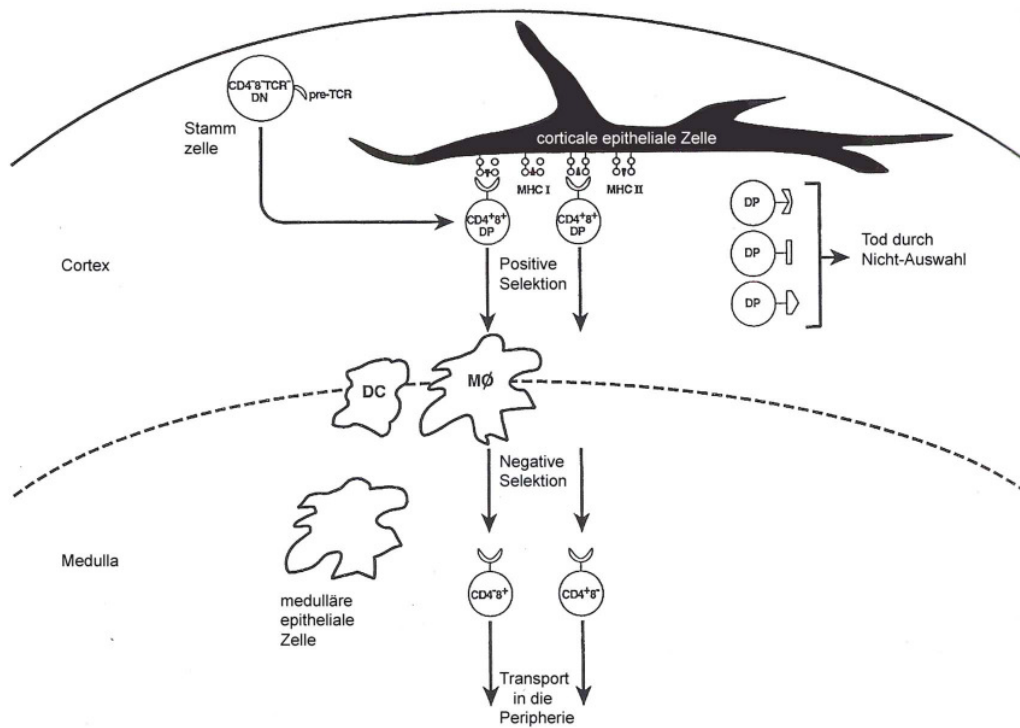


Abb.1.10 Thymozytenselektion im Thymus Im Cortexbereich proliferieren doppelt negative (DN), den pre T-Zell Rezeptor exprimierende, Zellen und differenzieren sich in doppelt positive (DP) Zellen, welche gering $\alpha\beta$ TCR exprimieren. Durch die Bindung via TCR und CD4 oder CD8 Moleküle, werden sie durch die Eigenschaft peptidgebundene an corticalen epithelialen Zellen präsentierte MHC I und II Moleküle zu erkennen ausgewählt. Nur eine kleine Anzahl von DP-Zellen sind in der Lage an MHC-Moleküle zu binden, die anderen erleiden den Tod durch „Nicht-Auswahl“. Die positiv selektierten DP-Zellen migrieren in die Medulla und werden entweder CD4+CD8- oder CD4+CD8+ einfach positive (SP) Zellen, abhängig davon, ob sie an MHC I oder II Molekülen selektiert wurden. Beim Erreichen der Medulla treffen sie auf Antigen-präsentierende Zellen (APC), wie dendritische Zellen (DC) oder Makrophagen ($M\phi$). Diese Zellen exprimieren MHC-Moleküle, die mit Peptiden aus endogenen zellulären hervorgegangen Proteinen oder zirkulierenden körpereigenen Proteinen beladen sind. T-Zellen, die mit hoher Affinität an diese körpereigenen Peptide binden, erleiden in situ negative Selektion durch Apoptose. Die Kombination von positiver und negativer Selektion erlaubt die Reifung und Export eines kleinen Teils der Ursprungthymozyten (1-2%). Modifiziert nach Surh (1999).

Die Medulla dagegen enthält wenige DP-Zellen und besteht größtenteils aus SP-Zellen, eingestrickt in ein heterogenes Netzwerk aus epithelialen und aus dem Knochenmark entstandenen antigenpräsentierenden Zellen, wie Makrophagen oder dendritischen Zellen (Surh, 1999).

Die epithelialen Zellen des Thymus entstehen aus drei embryonalen Quellen: dem Ectoderm des 3. Kiemenbogens, dem Entoderm des 3. Schlundbogens und dem Mesectoderm der Neuralleisten (Auerbach, 1960; Cordier and Haumont, 1980; Le Douarin and Jotereau, 1975). In der Maus formen diese Zellen ungefähr in E9 rudimentäre Thymuslappen. Um E14 sind die zwei Lappen in den vorderen mittleren Brustkorbraum gewandert und bilden durch Fusion den fetalen Thymus. Während dieser Migration, die an Tag 11-12 startet, ist der Thymus von

Stammzellen aus der fetalen Leber besiedelt. Diese differenzieren sich zügig in DN-Zellen, aus denen ab E16 DP-Zellen entstehen. Reife SP-Zellen erscheinen zum ersten Mal um E18 (Surh, 1999).

Vielen Nukleärrezeptoren wurde eine Rolle in der Regulation der Thymozyten und T-Zell Apoptose zugeschrieben, z.B. Nur77 bei der negativen Selektion während der Entwicklung (Zhang et al., 1999). In den vergangenen Jahren konnte für verschiedene Steroid- und Nicht Steroid-Nukleärrezeptoren eine Schlüsselrolle in der Entwicklung des Immunsystems, Gestaltung des T-Zell Repertoires und der Regulation entzündlicher Prozesse nachgewiesen werden. Dies gilt für den Vitamin D-Rezeptor, Östrogen-Rezeptor, Retinolsäurerezeptoren und etliche Orphan-Rezeptoren (Alroy et al., 1995; Bissonnette et al., 1995; Moore et al., 2001; Staples et al., 1999).

1.6.2 Milz und B-Zell Entwicklung

B-Lymphozyten entwickeln sich bei Maus und Mensch im Knochenmark. Sie sind verantwortlich für die Sekretion von Antikörpern oder Immunglobulinen (Ig), die ein enormes Feld fremder Antigene erkennen und neutralisieren können.

Wie alle Lymphozyten entstehen sie aus pluripotenten hematopoetischen Stammzellen über den Weg lymphoider Vorläufer. Haben sie einmal der Weg in Richtung B-Zelle eingeschlagen, differenzieren sich B-Zell-Vorläufer in einer Serie verschiedener Schritte in reife B-Lymphozyten (Lam, 1999). Diese können grob in zwei Phasen geteilt werden.

Die Initiierungsphase findet in den primären lymphoiden Organen (fetale Leber und adultes Knochenmark) statt. B-Zell-Vorläufer beginnen funktionelle Antikörper in Form von Oberflächen-Immunglobulinen zu exprimieren und werden dadurch zu unreifen B-Zellen. Anschließend werden einige selektiert und als vorgereifte B-Zellen in die Peripherie ausgesandt. In einer sekundären Phase stoßen naive B-Zellen in den sekundären lymphoiden Organen, Milz und Lymphknoten, auf spezifische Antigene und erleben clonale Expansion. Diese differenzieren sich entweder in B-Gedächtniszellen oder Antikörper-sekretierende Plasma-Zellen (Lam, 1999). Die Generation von B-Lymphozyten ist ein dynamischer Prozess, welcher die kontinuierliche Herstellung von Vorläuferzellen-Zellen aus pluripotenten im Knochenmark befindlichen Stammzellen erfordert, aus denen unter Einfluss von Transkriptionsfaktoren nach den oben beschriebenen Prozessen B-Zellen reifen (Clevers and Grosschedl, 1996; Georgopoulos, 1997).

1.7 Ziel der Arbeit

Die drei Mitglieder der COUP-TF Familie nukleärer Orphan-Rezeptoren COUP-TFI, Arp1 und Ear2 wurden in bisherigen Untersuchungen in Zusammenhang mit wichtigen Funktionen in unterschiedlichsten Entwicklungsprozessen gestellt. Besonderer Schwerpunkt der bisherigen Untersuchungen lag auf COUP-TFI, welches wichtig in der Entwicklung des Zentralnervensystems ist und Arp1, das vor allem wichtige Funktionen in der Organogenese besitzt. Die vollständige Deletion führt bei beiden Genen zum Tod, bei COUP-TFI direkt nach der Geburt, bei Arp1 bereits um Embryonaltag 10, dem Beginn der Gefäßsystementwicklung und Organbildung. Expressionsmuster und Funktion von Ear2 waren zu Beginn dieser Arbeit jedoch weitgehend unbekannt.

Die vorliegende Arbeit soll einen Einblick in die biologische Funktion von Ear2 geben. Hierzu sollte deshalb das *Ear2*-Expressionsmuster bestimmt und mit den Expressionsmustern von COUP-TFI und Arp1 verglichen werden. Anschließend sollten die in der Expressionsanalyse gewonnenen Erkenntnisse bei der Analyse eines bereits generierten, aber noch nicht charakterisierten *Ear2*-deletierten Mausstammes eingesetzt werden. Bei der Untersuchung der Mauslinie mit *Ear2*-Nullallel sollten neben anatomischen und histologischen Analysen zur Untersuchung morphologischer Defekte Verhaltensexperimente durchgeführt werden, um auch die Auswirkungen der Deletion auf den Gesamtorganismus zu untersuchen. Außerdem sollten anhand molekulargenetischer Methoden Komponenten der Genregulation in den betroffenen Organen bestimmt werden.

2 MATERIALIEN UND METHODEN

2.1 Tierexperimentelle Arbeiten

2.1.1 Maushaltung und verwendete Stämme

Sämtliche Arbeiten mit Tieren wurden entsprechend den Vorschriften des Bundestierschutzgesetzes durchgeführt (BGB1 S.1105, ber. S. 181, Abschnitt 2 (§2+3), 5 (§7-9) und 8 (§119)). Zur Analyse von Expressionsmustern wurden die Mausstämmen C57BL/6 (postnatale Stadien) und NMRI (Embryonalstadien) verwendet. Der Mausstamm mit einer gezielten Deletion von *Ear2* wurde freundlicherweise von Jean-Pierre Revelli (Lexicon Genetics, USA) zur Verfügung gestellt. Die Mutation in *Ear2* wurde durch homologe Rekombination von ES-Zellen hergestellt. Verschiedene unabhängige überlappende Klone wurden isoliert, in denen die DNA und Ligandbindungsdomäne durch Sequenzierung identifiziert wurden.

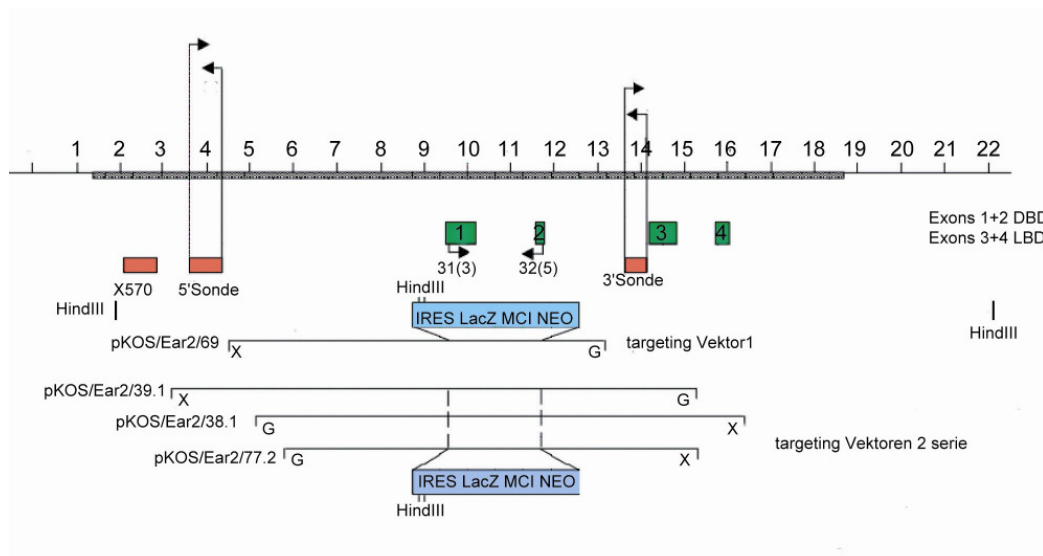


Abb. 2.1 *Ear2* Konstrukt, generiert von Jean-Pierre Revelli

Die codierende Sequenz der DNA Bindungsdomäne in *pKOS/EAR/69* wurde durch eine *IRESLacZ/MC1neo* Kasette ersetzt (Abb.2.1). Eingefügte ES Klone wurden durch Southern blotting identifiziert und Keimlinienchimären von C57BL/6J Blastozysten wurden mit diesen Clonen injiziert. Weitere Daten des Konstruktes lassen sich Abbildung 2.1 entnehmen.

2.1.2 Genotypisierung

2.1.2.1 Isolierung von genomischer DNA aus embryonaler Dotterhaut

Für diese alternative Methode der Genotypisierung wurde der embryonale Dottersack entfernt und mit 60µg/ml Proteinase K in Lysispuffer (10nM Tris-HCl pH 8.4, 50mM KCl, 2nM MgCl₂, 0,45% Tween-20, 0,45% NP-40) über Nacht bei 55°C im Wasserbad inkubiert. Anschließend wurde die Proteinase K 10 Minuten bei 100°C denaturiert, die DNA mit Ethanol gefällt und mit TE pH8.0 Puffer auf 400ng/µl eingestellt.

2.1.2.2 Isolierung genomischer DNA aus Schwanzbiopsien

Die Genotypisierung von Mäusen erfolgte in der Regel durch Southern Blot-Analyse. Dazu wurden 0,5cm-1,0cm lange Schwanzbiopsien entnommen und in 400µl Extraktions-Puffer (200mM Tris/HCl, pH 8.0, 50mM EDTA, 100mM NaCl, 1% SDS, 1mg/ml Proteinase K) über Nacht bei 55°C inkubiert. Nach kurzem Vortexen wurden unlösliche Partikel durch Zentrifugation sedimentiert (20min, 13000rpm, RT). Die DNA wurde dann aus dem Überstand durch Zugabe von einem Volumen Isopropanol gefällt (30min, 13000rpm, RT). Anschließend wurde die DNA mit 1ml 70% EtOH gewaschen und final in 200µl TE-Puffer gelöst (2-10 Std. bei 55°C). Für den Restriktionsverdau wurden 10µg DNA eingesetzt (in einem 100µl Ansatz).

Restriktionsverdau: mit HindIII (Roche)

10µl	Template
10µl	10x Puffer B
1µl	10x BSA
5µl	Enzym (40units/µl)
<u>75µl</u>	<u>ddH₂O</u>
Σ=	100µl

Der Verdau wurde über Nacht bei 37°C im Wasserbad inkubiert, in Ethanol gefällt und gereinigt und anschließend in 25µl Stop-Puffer aufgenommen.

2.1.2.3 Southern Blot-Analyse

Im Anschluss an den Restriktionsverdau wurden die Fragmente auf einem 0,75% Agarosegel in 1x TAE (50x TAE-Puffer: 1M Tris-Acetat, 50mM EDTA) und 0,1mg/ml Ethidiumbromid elektrophoretisch aufgetrennt. Die separierte DNA wurde dann im Gel mit einem ausreichenden Volumen Denaturierungs-Puffer (0,5M NaOH, 1,5M NaCl) 40min denaturiert und anschließend 2x 20min in Neutralisierungs-Puffer (0,5M Tris/HCl, pH 7,0, 1,5M NaCl) auf einen pH-Wert von 7,0 äquilibriert. Der DNA-Transfer auf die Nylon-Membran (HybondN, Amersham, UK) erfolgte durch Kapillarkraft über Nacht. Anschließend wurde die DNA durch UV-Quervernetzung (3600 kJ) auf der Membran fixiert. Der Filter wurde dann für 3 Stunden bei 65°C in der Prähybridisierungslösung (8ml H₂O, 3ml 20x SSC, 3ml MP-Mix (5% SDS, 5% Magermilchpulver in H₂O), 0,5ml 10µg/ml Herings-Sperma-DNA (Roche, Schweiz) präinkubiert und anschließend über Nacht bei 65°C mit der radioaktiv markierten cDNA-Sonde in Hybridisierungslösung hybridisiert (2,5ml H₂O, 2ml 20x SSC, 2ml MP-Mix (s.o.), 0,5ml 10µg/ml Herings-Sperma DNA, 4ml Dextran-Sulfat-Lösung (50% Dextran-Sulfat w/v in H₂O)). Die radioaktive Markierung der cDNA wurde mit dem Rediprime Label Kit (Amersham, UK) nach Herstellerangaben durchgeführt. Pro Filter wurde ein vollständiger Reaktionsansatz zur Hybridisierung eingesetzt. Am folgenden Tag wurde die Membran durch dreimaliges Waschen bei 55°C für 30 Minuten in Wasch-Puffer (0,1% SDS, 0,1x SSC in H₂O) von unspezifisch gebundener Sonde befreit. Die Hybridisierung wurde autoradiographisch analysiert.

2.1.2.4 PCR-basierendes Genotypisieren

Um die zeitliche Effizienz des Genotypisierens zu erhöhen und um das Genotypisieren mit Hilfe von kleinen Gewebebiopsien zu ermöglichen, wurde ein PCR-Programm etabliert, das die Detektion beider Allele in einem Reaktionsansatz erlaubt.

Reaktionsansatz:

0,6µl	genomische DNA (s.o.)
1,0µl	10x Puffer
0,2µl	50x dNTP
0,2µl	50x Polymerase (Clontech Advantage 2 Polymerase Kit)
2,0µl	Primermix (3 Primer 10µM jeder)
6,0µl	H ₂ O
Σ=	10µl

PCR-Programm:

Denaturierung	94°C	2min	Amplifikation (27 Zyklen)
	94°C	30s	
Annealing	63°C	30s	
Elongation	68°C	40s	
	4°C	∞	

Diese PCR-Reaktion resultiert in der Amplifikation zweier unterschiedlicher Produkte: ein 400bp langes im Falle des KO-Alles, 550bp im Falle des wt- Allels.

Primer:

Reverse: AGG AGC TGC CCT TTG AGG TC
 Forward1: AGC GTT GGC TAC CCG TGA TA
 Forward2: CAG CGC AGT ACT GTG ACT CCA

Die PCR-Produkte wurden in einer Agarose-Gelelektrophorese (1,5 % Agarose-Gel in 1x TAE-Puffer) aufgetrennt und der Genotyp der Tiere durch Vergleich mit einem abgestuften Größenstandard ("100bp DNA ladder", New England Biolabs) bestimmt.

2.2 *In situ*-Hybridisierung

2.2.1 Generierung einer Ribosonde

2.2.1.1 Herstellung der cDNA-Vorlage

Generell wurden systematisch durch BLAST-Vergleiche (Altschul et al., 1997) gegen die verfügbaren Datenbanken für Maus-Sequenzen solche Bereiche ausgewählt, die keine Homologie zu anderen Genen aufweisen.

Die Vorlagen für die Herstellung der Sonden wurden mittels RT-PCR aus mRNA amplifiziert, die entweder aus Mäuseembryonen oder Gehirn gewonnen worden war. Generell wurde der gesamte cDNA Bereich der gewünschten Gene amplifiziert. Bei *Ear2*, *Arp1* *COUP-TFI* und *Mash1* wurde das PCR-Produkt anschließend in den Vektor pCR-Blunt II-TOPO, Invitrogen, USA, gemäß den Herstellerangaben subkloniert und entsprechend der Orientierung der Insertion linearisiert. Für alle anderen Gene wurde an das 5'-Ende des Vorwärts-Primers eine Erkennungsstelle für Sp6- (5'-GCGATTTAGGTGACACTATAG-3') und an das 5'-Ende des Rückwärtsprimers für T7- (5'-GCGTAATACGACTCACTA TAGGG-3') RNA-Polymerase angefügt. Die gewünschte Gensequenz konnte so direkt amplifiziert werden, so dass ein Klonieren überflüssig war.

Genname	GenBank	Forward-Primer	Reverse-Primer	Länge (bp)
Ear2	X76654	5'-AGTGTCGAGCTGATTGCCGAG-3'	5'-ATGCTGGCTCCAGACTGTTGAAG-3'	1018bp
Arp1	NM_009697	5'-CTCGCACACACAAAAGCGG-3'	5'-CACAGTCCATTAATCTTCC-3'	1495bp
COUP-TFI	NM_010151	5'-GGCCCAAAGATATGGCAATGG-3'	5'-TTCTCACCAGACACGAGGTCC-3'	1546bp
Phox2a	NM_008887	5'-CCCAGGTCCCTTCTCTGGAGT-3'	5'-CTGCCGAGAAGGGGAGATCA-3'	545bp
Phox2b	NM_008888	5'-GCTATTTAGGTGACACTATAGGAGACCTCAGACAAG-3'	5'-TTGTAATACGACTCACTATAGGGGCTCTGCTTGGC-3'	625bp
TH	NM_009377	5'-GATTGCAGAGATTGCCTTCC-3'	5'-CCTGTGGTGGTACCCATG-3'	700bp
DBH	NM_138942	5'-TTCCAATGTGCAGCTGAGTC-3'	5'-TTGTTGCAATGCATGGAGAT-3'	624bp
Mash1	NM_008553	5'-CGGAACTGATGCGTGCAAACG-3'	5'-TAATACGACTCACTATAGGGTTGTCAAGAAACT-3'	564bp
Rnx	NM_019916	5'-GCTATTTAGGTGACACTATAGGCATCGACCAATCC-3'	5'-TTGTAATACGACTCACTATAGGGCACTTGGTCTCC-3'	650bp
Lix1	AF351204	5'-ATGGACAGAACCTTGAATC-3'	5'-GATTACTATCGGTGTGTCTCGGGC-3'	800bp
DDC	NM_016672	5'-GCTGCTATCATGAAAAGCTGG-3'	5'-TGATTTCACGAAGGAGGAGTGG-3'	468bp
AdCy6	NM_007405	5'-GCGTAATACGACTCACTATAGGGGGCTGCTCAATGAGATCATCGC-3'	5'-GCGATTTAGGTGACACTATAGATGGTCAATCAGAGCTAGGTCCC-3'	1032bp
AdCy8	XM_122935	5'-TAACGTGGAAGAGGGTCAAG-3'	5'-CCCCAGGAAATCTTCTCCAC-3'	1000bp
EF1 α	XM_203909	5'-GTCCCCAGGACACAGAGACTTCA-3'	5'-AATTCACCAACACCAGCAGCAA-3'	100bp

PCR Reaktionsansatz

2,0 μ l cDNA

5,0 μ l 10x Pfx-buffer (Invitrogen, USA)

5,0 μ l Enhancer-Lösung (Invitrogen, USA)

1,5 μ l Forward-Primer (10 μ M)

1,5 μ l Reverse-Primer (10 μ M)

1,5 μ l dNTP-Mix (Roche, Schweiz)

1,0 μ l MgSO₄ (50mM)

0,5 μ l Platinum Pfx Polymerase (Invitrogen, USA)

32,0 μ l H₂O

$\Sigma = 50\mu$ l

PCR-Programm

Denaturierung	95°C	2min
Amplifikation (35 Zyklen)	95°C	45s
	55-65°C	45s
	68°C	{(Länge PCR-Produkt)/1000}* min
Finale Verlängerung	68°C	10min
	4°C	∞

Durchführung

Die gesamte RNA aus zwei E10.5 oder E11,5 Mäuseembryonen wurde mit Hilfe von RNazol B (WAK Chemie, Deutschland) entsprechend den Herstellerangaben isoliert. Diese RNA diente als Vorlage für die cDNA-Synthese mit der Superscript II Reverse Transcriptase (Invitrogen, USA). Die Reverse Transkription wurde wie dort angegeben durchgeführt.

Bei den *in situ*-Hybridisierungen mit den Genen *Ear2*, *COUP-TFI* und *Arp1* wurden verschiedene cDNA-Fragmente als Vorlagen zur Sondenpräparation verwendet, entweder die gesamten cDNA-Sequenzen oder Teilbereiche. In allen Fällen war das Ergebnis der *in situ*-Hybridisierung gleich. Die Expressionsdaten zu *Nurr1*, *Lix*, *DDC* sowie die für sämtliche Kandidaten des Pax6 Projektes wurden einer öffentlichen Datenbank entnommen (www.genepaint.org).

2.2.1.2 Synthese der RNA-SondenAnsatz (alle Reagenzien von Roche, Schweiz)

1,5µg	linearisierte Vektor-DNA oder PCR-Produkt
8,0µl	Dig-label mix (2.5 mM rATP/rCTP/rGTP, 1.6 mM rUTP, 0.9 mM dig-11-rUTP)
2,0µl	10x Transkriptionspuffer
2,0µl	0.1 M DTT
0,5µl	RNasin
1,0µl	RNA-Polymerase
	RNase-freies Wasser (bis zu einem Volumen von 20µl)

Durchführung

Nach einer dreistündigen Inkubation des oben aufgeführten Ansatzes bei 37°C wurde die DNA-Vorlage durch die Zugabe von 2µl DNase I (Roche, Schweiz) und eine weitere Inkubationszeit von 20min bei 37°C zerstört. Danach wurde das Reaktionsvolumen mit TE-Puffer (10mM Tris/HCl, pH 7.5, 1mM EDTA) auf 100µl erhöht und die RNA durch Zugabe von 10µl 3M Na-Acetat, pH 4.8 und 300µl Ethanol gefällt. Nach einer 15 minütigen

Zentrifugation bei 13000rpm und 4°C wurde der Niederschlag in 1ml 75% Ethanol gewaschen und nach erneuter Zentrifugation an der Luft getrocknet. Anschließend erfolgte eine Resuspension der RNA in 30µl DEPC-behandeltem Wasser. 2µl davon dienten der photometrischen Konzentrationsbestimmung, 1µl wurde auf einem Agarose-Gel auf Degradation überprüft. Für die wmISH mit Mäuseembryonen wurde die RNA-Sonde auf eine finale Konzentration von 100ng/µl in DEPC-Wasser verdünnt und bei -80°C gelagert. Für die Roboter-ISH mit Schnitten wurde die RNA in Hybridisierungsmix auf 10µg/ml verdünnt und bei -20°C gelagert.

2.2.2 Whole mount *in situ*-Hybridisierung mit Mäuseembryonen

Die *in situ*-Hybridisierung mit Mäuseembryonen wurde durchgeführt wie in Knecht und Harland und Parr et al. beschrieben (Knecht and Harland, 1997; Parr et al., 1993). Mäuseembryonen entsprechender Entwicklungsstadien wurden freipräpariert und über Nacht in 4% PFA bei 4°C fixiert. Zur Aufbewahrung wurden die fixierten Embryonen über eine Konzentrationsreihe in 90% Methanol überführt und bei -20°C gelagert.

Durchführung

Alle Schritte erfolgten, wenn nicht anders erwähnt, auf einem Schüttler bei Raumtemperatur (RT). Inkubationsschritte bei höheren Temperaturen wurden in einem Schüttelwasserbad durchgeführt. Die Embryonen wurden in Glasgefäßen mit einem mit Teflon beschichteten Deckel behandelt. Die Protokollpunkte wurden sequenziell vollzogen.

Prähybridisierung und Hybridisierung

Die Embryonen wurden durch eine MeOH/PBT-Reihe in reines PBT (0.1% Tween-20 in PBS (137mM NaCl, 2,7mM KCl, 10mM NaH₂PO₄, 2mM KH₂PO₄, pH 7.4)) überführt: 75%, 50%, 25% MeOH/PBT für je 10min, danach zweimal 10min in PBT. Daraufhin erfolgte eine Bleichung der Embryonen in 6% H₂O₂ in PBT für eine Stunde bei RT. Die Embryonen wurden anschließend dreimal 5min in PBT gewaschen. Sie wurden dann mit 10µg/ml Proteinase K (Roche, Schweiz) in PBT für eine Dauer entsprechend ihres Entwicklungsstadiums behandelt (E8.5 für 1min, E9.5 für 4min, E10.5 für 7min, E11.5 für 10min). Danach erfolgte ein zweifacher Waschschrift in 2mg/ml Glycin in PBT, jeweils 10min bei RT. Die Embryonen wurden dreimal für 5min mit PBT gespült. Anschließend erfolgte eine Fixierung mit 4% Paraformaldehyd/0.2% Glutaraldehyd in PBT für 20min bei RT. Daraufhin wurde 1ml Prähybridisierungspuffer (50% Formamid, 5x SSC (20x SSC: 3M NaCl, 0,3M Na-Citrat, pH 4,5), 50µg/ml Hefe tRNA, 1% SDS, 50µg/ml Heparin) zugegeben

und für 5min geschüttelt. Der Prähybridisierungspuffer wurde durch 2ml frischen Prähybridisierungspuffer ersetzt, gefolgt durch eine Inkubation von zwei Stunden im Wasserbad bei 70°C. Nach dieser Prähybridisierungssinkubation wurde der Überstand durch 1ml bis 2ml Prähybridisierungspuffer ersetzt, der 1µg/ml der RNA-Sonde enthielt. Die Embryonen wurden so bei 70°C über Nacht inkubiert.

Post-Hybridisierung und Antikörper-Inkubation

Nach einer Entfernung des Hybridisierungsmixes wurden die Embryonen dreimal für 30min in einer vorgewärmten Lösung I (50% Formamid, 5x SSC pH 4.5, 1% SDS, in nicht DEPC-behandeltem Wasser) bei 70°C gewaschen, um unspezifisch gebundene Sonde zu entfernen. Nach drei Inkubationen in TNT (10mM Tris-HCl, pH 7.5, 0,5M NaCl, 0,1% Tween-20) für 5min bei RT wurden die Embryonen zweimal 30min mit 100µg/ml RNase in TNT bei 37°C behandelt. Anschließend wurden die Embryonen nach einem kurzen Waschschrift für 5min in TNT : Lösung II (1:1) bei RT dreimal für 30min in Lösung II (50% Formamid, 2x SSC pH 4.5, 0,2% SDS, in nicht DEPC-behandeltem Wasser) bei 65°C inkubiert. Parallel wurde die Antikörperlösung hergestellt. Hierzu wurden 1mg Embryopuder (Trockensubstanz aus E10.5 bis E12.5 alten Mäuseembryonen) in ein 50ml Gefäß eingewogen und 0,5ml MAB/Block (s.u.) zugesetzt. Nach kurzem Vortexen wurde die Suspension für 30min bei 70°C inkubiert und anschließend auf Eis gekühlt. Nach Zugabe von 5µl Schafserum und 0,4µl Anti-Dig-Peroxidase-Konjugat (Roche, Schweiz) wurde die Antikörperlösung für eine Stunde bei 4°C geschwenkt. Durch eine 10-minütige Zentrifugation bei 5000rpm wurde der unlösliche Teil der Lösung sedimentiert. Der Überstand wurde durch die Zugabe von 1% Schafserum in MAB/Block (2% Roche Blockingreagenz in 100mM Maleinsäure, 150mM NaCl, 2mM Levamisol, pH 7.5) auf 2ml verdünnt. Der beschriebene Ansatz wurde für ein einzelnes Probengefäß eingesetzt, ein entsprechend größerer Ansatz bei höherem Bedarf. Nach der Inkubation in Lösung II wurden die Embryonen dreimal 5min in MAB (100mM Maleinsäure, 150mM NaCl, 2mM Levamisol (Sigma, Deutschland) pH 7.5, frisch hergestellt) bei RT inkubiert. Bevor die Embryonen über Nacht bei 4°C in der Antikörperlösung unter leichtem Schwenken inkubiert wurden, wurden sie für 2-3 Stunden in MAB/Block bei RT präinkubiert.

Waschschritte nach der Antikörper-Inkubation

Die Embryonen wurden dreimal für 10min bei RT in MAB gewaschen. Anschließend erfolgte eine stündliche Erneuerung der MAB-Lösung (über den ganzen Tag). Über Nacht wurden die Embryonen dann bei 4°C in MAB geschwenkt.

Färbereaktion und Lagerung

Am darauffolgenden Tag wurden die Embryonen dreimal 10min bei RT mit NTMT (100mM Tris-HCl, pH 9.5, 50mM MgCl₂, 100mM NaCl) gespült. Die Färbereaktion erfolgte anschließend in BM-Purple (Roche, Schweiz), 2mM Levamisol. Die Gefäße wurden dabei durch Aluminiumfolie vor Sonneneinstrahlung geschützt. Die Reaktion wurde solange vollzogen, bis das Signal erkennbar war, maximal über Nacht. Gestoppt wurde die Färbereaktion durch dreimaliges Waschen in PBT, pH 4.5, jeweils für 5min bei RT. Die Embryonen wurden entweder in dieser Lösung bei 4°C gelagert, in 80% Glycerin/PBT überführt und bei -80°C gelagert oder zur Anfertigung von Schnitten in 90% Methanol transferiert.

2.2.3 *In situ*-Hybridisierung auf Gewebeschnitten (ISH)

In situ-Hybridisierung auf Gewebeschnitten wurde mit einem roboterunterstützten High-Throughput-Verfahren durchgeführt (Herzig et al., 2001).

Nach Fixierung für 2 Stunden bei 4°C in PFA wurden jüngere Embryonen (bei Mäusen bis zum embryonalen Tag 10.5 (E10.5) über eine Ethanol-Reihe in Benzol überführt: 70% EtOH, 80% EtOH, 90% EtOH, 96% EtOH, 100% EtOH, EtOH/Benzol (1:1) und 100% Benzol. Jeder Dehydrierungsschritt wurde für 5min bei RT vollzogen. Final wurden die Embryonen in Paraffin überführt, je dreimal 5min bei 61°C, und anschließend in eine geeignete Einbettungsform gegossen. Am darauffolgenden Tag wurden dann 10µm dicke Schnitte mit einem Mikrotom (Leica, Deutschland) angefertigt, die dann entweder nach einer Entparaffinierung direkt für die ISH eingesetzt wurden oder bei 4°C gelagert werden konnten. Ältere Embryonen und Gehirngewebe wurden nach der Präparation direkt in OCT (Sakura Finetek, Niederlande) eingebettet und eingefroren. Das Gewebe wurde dann mit einem Kryotom (Leica, Deutschland) in einer Dicke von 20µm geschnitten und bei -80°C gelagert. Nach Rehydrierung der Paraffin-Schnitte (oder Auftauen der Gefrier-Schnitte) wurde das Gewebe zweimal für 5min in 0.25% Essigsäure-Anhydrid, 0,1M Triethanolamin, pH 8.0, acetyliert. Anschließend wurden die Schnitte in der automatisierten ISH eingesetzt. Im Folgenden soll ein kurzer Überblick über die Prozedur gegeben werden.

Prähybridisierung und Hybridisierung

Die in der Durchflusskammer eingespannten Gewebeschnitte wurden zuerst 6 mal für 5min mit 0,6% Wasserstoffperoxid in Methanol behandelt. Anschließend wurden die Schnitte 6 mal mit PBT (0,05% Tween-20 in PBS) gespült (als Inkubationsvolumen wurden generell 300 μ l eingesetzt). Die Schnitte wurden mit 0,05% Tween-20 in 0,2N HCl behandelt, gefolgt von einem Waschschrift in PBT. Daraufhin wurden die Gewebeschnitte 7min lang mit Proteinase K-Puffer behandelt (die Proteinase K-Konzentration richtete sich hierbei nach der Beschaffenheit des behandelten Gewebes, bei embryonalem Gewebe z.B. 2 μ g/ml, adultem Gehirn 20 μ g/ml; Proteinase K-Puffer: 0,05% Tween-20, 50mM TRIS, 5mM EDTA, pH 8.0). Danach wurde 6 mal mit PBT gespült. Anschließend wurde das Gewebe zweimal für 10min mit 4% PFA in PBT fixiert, gefolgt von 6 Waschschriften in PBT. Hieran schloss sich eine Präinkubation in Hybridisierungspuffer (Ambion, USA) für 2x 30min bei 65°C an. Final wurden die Schnitte über Nacht bei 61°C in Hybridisierungspuffer inkubiert, der die RNA-Sonde (s.o.) in einer Konzentration von 100ng/ml enthielt.

Posthybridisierungs-Waschschriffe und Antikörperinkubation

Nach der Hybridisierung wurde die unspezifisch gebundene Sonde durch jeweils 5 Inkubationen für 6min bei 65°C mit Waschlösungen steigender Stringenz entfernt: 1. 5x SSC (20x SSC: 3M NaCl, 0,3M NaCitrat, pH 7.0) 2. 1x SSC, 3. 0,5x SSC und final 0,1x SSC, jeweils in 50% Formamid. Danach wurden die Schnitte mit 250 μ l NTE gewaschen (0,05% Tween 20, 5mM EDTA, 10mM Tris, 500mM NaCl, pH 7.6), gefolgt von 2 Inkubationsschriften in 20mM Iodoacetamid in NTE für je 5min bei RT (im weiteren Verlauf reduzieren sich die Inkubationsvolumina auf 250 μ l). Die Kammern wurden dreimal mit NTE gespült. Die Gewebeschnitte wurden dann zweimal 30min in Hitze-inaktiviertem Schafserum in TNT-Puffer (0,05% Tween 20 in 100mM Tris/150mM NaCl, pH 7.6) inkubiert. Anschließend wurden die Kammern 8 mal mit NTE gespült. Nach zwei Inkubationen für 30min in TNB blocking-Puffer (0,05% Tween 20 in 100mM Tris/150mM NaCl, 0,5% Blocking-Reagenz (PerkinElmer Lifesciences, USA), pH 7.6) (der TNB blocking-Puffer wurde vorher durch Filtrieren von festen Bestandteilen gereinigt), wurden die Kammern zweimal für 45min mit Roche Anti-Dig-POD (verdünnt in TNB blocking-Puffer (1:500)) versetzt. Anschließend wurden die Schnitte 8 mal für 5min mit TNT-Lösung gewaschen. Die Kammern wurden zweimal für 30min bei RT mit Tyramide-Biotin (T/B) versetzt (T/B wurde für die anschließende Verwendung der Tyramid Signal Amplifikation (TSA, PerkinElmer Lifesciences) in NEN Amplifikations-Verdünnungs-Puffer verdünnt). Nach 8 Waschschriften in Maleat Wasch-Puffer (MWB) (100mM Maleate, 150mM NaCl, 0,05% Tween 20, pH 7.5) wurden die Schnitte final zweimal 30min mit Neutravidin-AP-Konjugat (Pierce, USA) inkubiert (1:600 Verdünnung in 1% Blocking-Reagenz (Roche, Schweiz) in MWB).

Waschschritte nach der Antikörper-Inkubation und Färbereaktion

Ungebundener Antikörper wurde durch 8 Waschschritte mit MWB entfernt. Anschließend wurden die Schnitte durch 2 Inkubationen in TNT äquilibriert. Zur Färbung wurden die Kammern 3 mal 20min lang mit Färbelösung versehen (BCIP (1:250), NBT (1:200) (beide Roche, Schweiz), 0,6µg/ml Levamisol in TMN). Bei Bedarf wurde die Färbereaktion verlängert. Anschließend wurden sie 4 mal mit 0,05% Tween 20 in Wasser gespült, gefolgt von zwei Inkubationen in TNT. Die gefärbten Schnitte wurden mit 4% PFA/ 0,5% Glutardialdehyd in PBT für 20min fixiert. Nach jeweils 4 Waschschritten in PBT und Wasser wurden die Objektträger dann aus den Durchflusskammern entfernt und über Nacht getrocknet. Zur Analyse und Lagerung wurden sie dann mit Wasser-basierendem Eindeckmedium (Hydromatrix) eingedeckelt.

2.3 LacZ/ X-Gal Färbung

Das Konstrukt der Ear2 KO Maus erlaubt eine Sichtbarmachung der Genaktivität mit X-Gal: bei der Deletion eines Ear2 Exons wurde hinter der Promotorregion eine LacZ/ Neokassette eingefügt, so dass beim „Anwerfen des Gens“ jetzt statt Ear2, das Enzym β -Galaktosidase produziert wird, welches die Umwandlung des farblosen Substrats X-Gal in ein bläuliches Produkt katalysiert. Dies kann dann ganz einfach optisch detektiert werden. Des weiteren kann durch diesen Nachweis auch (in begrenztem Maße) die Wanderung von ehemals Ear2 exprimierenden Zellen nachvollzogen werden, da β -Galaktosidase über einen Zeitraum von ca. 1-2 Tagen in den Zellen stabil bleibt und detektiert werden kann, auch wenn die Zelle ihre Lage oder ihren Charakter bereits verändert hat.

Die LacZ/ X-Gal Färbung Organen wurde nach (Joyner, 1993) bei heterozygoten oder homozygoten Embryonen verschiedenen Alters direkt nach der Präparation an „frischen“ Embryos und Organen durchgeführt. Die Färbung muß am gleichen Tag der Embryoentnahme durchgeführt werden, da β -Galactosidase nach einer Lagerung nicht mehr intakt ist. Embryos bis Tag 12 wurden im Ganzen gefärbt, Organe oder ältere Embryos geteilt. Nach der Präparation wurden die Embryos für maximal 40 Minuten bei RT fixiert (0,2% GDA in Phosphatpuffer (0,1M K_2HPO_4 , 0,1M KH_2PO_4 , pH 7.4), anschließend 3 mal für 15min bei RT in Waschpuffer (0,005M $MgCl_2$, 0,01% Na-deoxycholat, 0,1% NP-40 in 0,1M Phosphatpuffer) gewaschen und dann in Färbelösung (0,1M K3, 0,1M K4, 0,5g/ml X-Gal in Waschpuffer) in von 3 Stunden bis üN bei 37°C inkubiert. Nach 3 kurzen Waschgängen wurde nochmals für 30min in 4% PFA/PBS fixiert und daran anschließend zum Photographieren in Glycerol, zum Schneiden in EtOH überführt.

Für die kombinierte LacZ-ISH wurden Embryonen mit RNase-freien Reagenzien behandelt, nur für 3 Stunden in der Färbelösung inkubiert und anschließend für 3x 5min gewaschen. Es folgte eine 30 minütige Fixierung in 4% PFA/PBS und anschließenden kurzes Waschen in PBS. Anschließend wurden die Embryonen beim Bleichschritt mit H₂O₂ in die wmISH integriert.

2.4 Immunoprecipitation

2.4.1 2H3 *whole mount* Immunoprecipitation

Die wm Immunoprecipitation ganzer Embryonen verschiedenen Alters wurde nach (Qiu et al., 1997) durchgeführt. Dafür wurden Embryos präpariert und anschließend in Methanol/DMSO (4:1) oder 4% PFA über Nacht bei 4°C fixiert. In Methanol: DMSO: 30% H₂O₂ (4:1:1) wurden sie für 3,5h bei RT gebleicht und dann rehydriert (2x 10min 100% MeOH; 15min 75% MeOH/PBT 30min; 15min 50% MeOH ;15min 25% MeOH; 15min PBT (0,2% BSA, 0,1% Triton X-100 in PBS)). Es folgte ein zweistündiger Blockschrift in PBSMT (2% Milchpulver, 0,1% Triton X-100 in PBS) (2x 1h bei RT). Der Antikörper (2H3, Developmental Studies Hybridoma Bank) wurde in PBSMT 1:100 verdünnt bei 4°C über Nacht inkubiert.

Es folgten 5 Waschungen (1h) in PBSMT bei 4°C. Der Sekundärantikörper (peroxidase-konjugierter goat anti-mouse IgG Antikörper verdünnt in PBSMT, Dianova) wurde 1:100 üN bei 4°C inkubiert. Anschließend wurde wieder 5x für 1h in PBSMT bei 4°C gewaschen. Zur Färbung wurde das DAB-Kit von Dianova entsprechend der Herstellerangaben verwendet. Die Farbreaktion wurde mit PBT gestoppt und anschließend in 0,1% GDA/ 4% PFA in PBS nachfixiert. Die Aufbewahrung erfolgte in MeOH; für Photos wurden die Embryos in 80%Glycerol überführt.

2.4.2 Tyrosin Hydroxylase-Färbung von Paraffinschnitten

Die Paraffinschnitte wurden wie unter 2.1.1 hergestellt und bis zur Verwendung bei 4°C gelagert. Zunächst erfolgte eine 2x 10 minütige Entparafinierung, anschließend eine schnelle Rehydrierung (100% EtOH für 10min, 100% EtOH für 5min, 70% EtOH für 5min, 50% EtOH für 2min, kurz in Wasser dippen). Die Schnitte wurden kurzzeitig in PBS gelagert. Es folgte die Demaskierung in 10mM Acetatpuffer für 3x 5min bei 700W in der Mikrowelle mit zwischenzeitigen 5 minütigen Kühlritten auf Eis. Die Schnitte wurden 1h in PBTF (PBS, 0,1% Tween-20, 10% fötales Kalbsserum) inkubiert, anschließend wurde der TH-Antikörper (AB152, Chemicon) 1/250 in PBTF über Nacht bei 4°C inkubiert. Um die Signalintensität zu erhöhen folgte am nächsten Tag eine einstündige Inkubation bei RT in TH-AK. Nach

dreimaligem dreiminütigen Waschungen mit PBTF folgte eine 1stündige Inkubation mit dem Sekundärantikörper 1/100 (Alexa Fluor green 488, goat anti-rabbit IgG, A-11008 für Fluoreszenz, für DAB labeling goat anti rabbit HRP 41553 von Dianova) bei RT. Im Falle der Fluoreszenz wurden die Schnitte in PBS gespült, anschließend in mounting medium (Vectashield H-1000, Vector England) gedeckelt, in Alufolie eingewickelt und bei 4°C bis zur Auswertung gelagert. Für die DAB Reaktion wurden die Schnitte erneut mit PBTF gewaschen, anschließend für 15min in DAB und weiter 5min in DAB mit H₂O₂ inkubiert. Nach dem Waschen in PBTF, folgte eine Fixierung (4% PFA, 0,1% GDA) und anschließende Eindeckelung in Hydromatrix.

2.5 Histologische Färbungen

2.5.1 Nissl stain

Sowohl die Nissl-Färbung, als auch die HE-Färbung wurden an einem manuellen Färberack durchgeführt. Zunächst wurden die Schnitte 2X für 10min in Xylol entparaffiniert und in anschließender Ethanolreihe (100%, 95%, 70%, jeweils 2x 5min) rehydriert. Nach 5min in Wasser, wurden sie für 10-30min (10min Embryo, 30min P56 Gehirn) in 1% Crescylviolett (Chroma 1A396) in Acetatpuffer (2,721% Natriumacetat, 1,2% Hac, pH 3.8-4.0) getaucht. Für ca 15s wurde in 70% Isopropanol/0,1% CH₃COOH differenziert und dann in aufsteigender Isopropanolreihe (70%, 95%, 100%) in Xylol überführt. Anschließend wurden die Schnitte in xylolbasierendem Pertex gedeckelt.

2.5.2 HE-Färbung

Die verwendeten Cryoschnitte wurden für 2x 5min in Xylol entparaffiniert. Es folgte eine absteigende EtOH-Reihe (100% EtOH 2x 2min, 70% EtOH/ Wasser 1x 1min, dest. Wasser 1x 10min). Es folgte eine einminütige Färbung in Hämatoxylin (Mayers Hämatoxylin Lösung, Sigma). Anschließend wurde kurz in dest-Wasser eingetaucht, dann für 15min in salzsauren EtOH (60% EtOH+ 10 Tropfen 37% HCl) ,Wasser für 10-15min, dest. Wasser für 1min. Dann wurden die Schnitte in vorher filtriertem 0,1prozentigem wässrigem Eosin (EosinY, Sigma) das zweite Mal für 10min gefärbt. Es folgte eine schnelle Überführung in 100% EtOH, Xylol (2x 2min). Die Schnitte wurden in Pertex gedeckelt.

2.6 Northern Blot-Analyse

2.6.1 Herstellung radioaktiv markierter Sonden

Zur Herstellung radioaktiver DNA-Sonden wurde das Rediprime II Kit (Amersham) nach Herstellerangaben benutzt. Dabei wurden jeweils 50ng DNA-Vorlage und (α - ^{32}P)dCTP mit einer Gesamtaktivität von 50 μCi eingesetzt. Die Sonde wurde über ProbeQuant G-50 Säulen (Amersham) aufgereinigt und mit einem Szintillationsmeßgerät bei für ^{32}P geeigneten Parametern gemessen. Es wurde pro Milliliter Hybridisierungspuffer eine Menge von 10^6 counts/min verwendet. Für die Ear Sonde wurde das 600bp lange PCR Produkt der ISH Sonde verwendet, Für *EF1 α* (XM_203909) ein 100bp langes Produkt, amplifiziert aus 5'-GTCCCCAGGACACAGAGACTTCA-3' (Forward-Primer) und 5'-AATTCACCAACACCAGCAGCAA-3' (Reverse-Primer).

2.6.2 Blotting und Hybridisierung

Zur Detektion der Ear2-Transkripte mittels Northern Blot-Verfahren wurden die Organe von 3 Tieren jedes Genotyps vereint und die mRNA mit Hilfe von Dynabeads (Dyna, Norwegen) entsprechend der Herstellerangaben isoliert. 6 μg mRNA von jedem Genotyp wurden auf einem Agarose-Gel aufgetrennt (1,5% Agarose, 2,2M Formaldehyd in DEPC-H₂O). Anschließend wurde das Gel einmal 15min in DEPC-H₂O gewaschen, gefolgt von zwei Inkubationen in 10x SSC. Die RNA wurde dann in 10x SSC auf eine HybondXL-Membran (Amersham, UK) geblottet und durch UV-Quervernetzung auf der Membran immobilisiert. Die anschließende Hybridisierung mit radioaktiv markierten Sonden wurde in Ultrahyb (Ambion, USA) entsprechend der Herstellerangaben durchgeführt. Als cDNA Sonde wurde für Ear2 ein 0,6kb-Fragment eingesetzt. Bei beiden Verfahren wurde *EF1 α* als Kontroll-Gen verwendet. Die Northern Blots von embryonalen Stadien (Mouse embryo full stage 1002-1 D185, Seegene) und adultem Gewebe (Mouse MTN Blot 7794-1 & 7762-1, Clontech) wurde nach den Angaben des Herstellers mit der gleichen 0,6kb großen Sonde durchgeführt. Um Fehlinterpretationen durch zu geringe Exposition zu vermeiden, wurden die Filme unterschiedlich lang belichtet. Signale, die nach 6 Tagen nicht auftraten, waren auch nach 16 Tagen Expositionsdauer nicht vorhanden (Daten nicht gezeigt). Zur Positivkontrolle für gleichmäßige Beladung wurde mit *EF1 α* hybridisiert.

2.7 Aktivitätsmessungen/ circadiane Experimente

2.7.1 Haltung und generelle Richtlinien

Die Tiere wurden einzeln in Plastikkäfigen gehalten (Albrecht and Oster, 2001) (Tecniplast 1155M), die mit einem stählernen Laufrad mit 115mm Durchmesser (Trixie 6083, Trixie GmbH, Germany) ausgestattet waren (siehe Abb.2.2A). Die Laufradachse besaß einen Magnet, eingebettet in eine kleine Plastikscheibe (Artikelnummer 34.6401300702, Fehrenkemper Magnetsysteme, Deutschland). Der Magnet öffnet und schließt einen magnetischen Wechsel (Reed-Relais 60, Conrad Electronic, Germany) bei der Rotation des Laufrades. Der Wechsel ist an einen Computer angeschlossen, der die Umdrehungen des Laufrades misst (ClockLab, Actimetrics, Austin St. Evanston, USA). Zwölf Käfige dieses Typs wurden in einer abgeschlossenen Box platziert (selbst entwickelt, Länge = 180cm; Höhe = 54cm; Tiefe = 69cm).

Die für die Aktivitätsmessungen verwendeten Mäuse waren im allgemeinen 2 bis 6 Monate alte Männchen. Eine gleiche Anzahl Wildtypkontrollen wurden jeder Isolationskammer hinzugefügt. Die Tiere bekamen Futter (Altronin Standard Maus/Ratten-Futter Altronin, Lage) Essen und Wasser *ad libitum* über den gesamten Zeitraum. Die Käfige wurden alle drei Wochen am Anfang der Aktivitätsphase gewechselt, um durch die neue Umgebung bedingte Phasenverschiebungen zu minimieren (Mrosovsky, 1996).

2.7.2 Licht/ Dunkel (LD) Zyklus Training

Die Tiere wurden in einem 12h Licht (250-300 Lx weißem Licht)/ 12h Dunkel Zyklus ("Licht an" = Zeitgebertime (ZT)0 um 7:00; "Licht aus" = ZT12 um 19:00) für drei Wochen gehalten (LD12:12). Nach einer Woche Eingewöhnung wurden Aktivitätsprofile zur Charakterisierung der Rhythmik der Tiere aufgenommen. Folgende Kriterien wurden untersucht:

- a. Aktivitätsbeginn: Ein Minimum von 100 Radumdrehungen pro 5min nach einem Minimum von 240 Minuten nach der Ruhephase. Die Messung wurde nach einer Woche Eingewöhnung an 7 aufeinander folgenden Tagen durchgeführt.
- b. Gesamtaktivität: Durchschnittszahl der Radumdrehungen und überwundenen Distanz in 24h.
- c. Nachtaktivität: wie b, aber nur während der Dunkelphase (ZT12-24).
- d. Tageaktivität: wie b, aber nur während der Lichtphase (ZT0-12).
- e. Aktivitätsphase (α): Zeit zwischen dem Anfang und Ende der Aktivität.
- f. Phasenverschiebung: der Zeitpunkt zwischen Aktivitätsbeginn und Beginn der Dunkelphase.

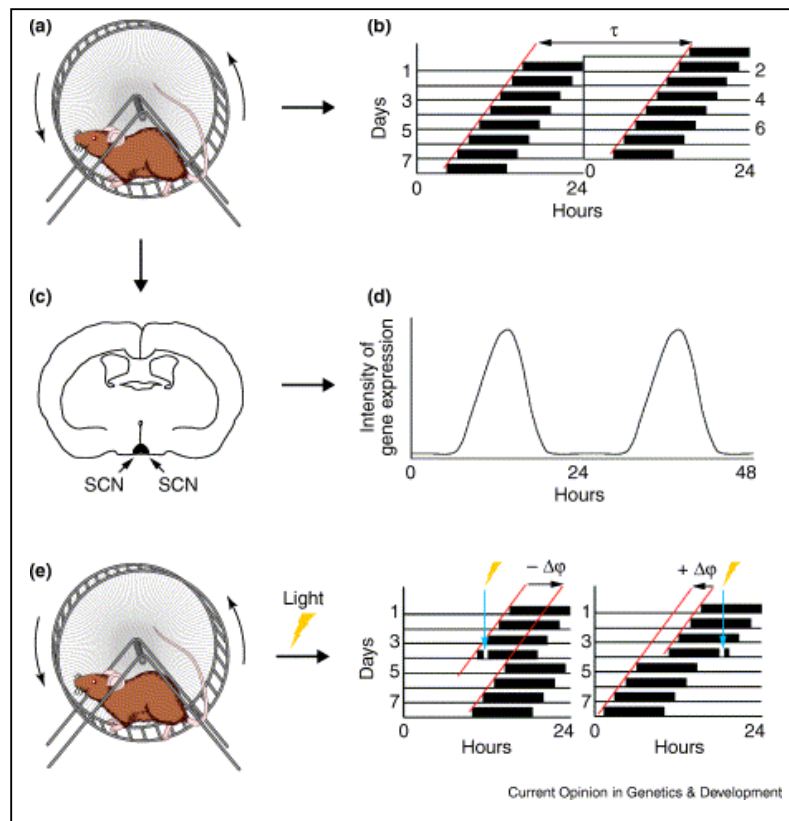


Abb.2.2 Experimentelle Strategien zur Untersuchung der circadianen Uhr in Mäusen

a) Laufaktivität gemessen durch Anzahl der Raddrehungen. Die Bewegungen in konstanter Dunkelheit sind direkter Übertrag der circadianen Uhr. **b)** Ectogramm doppelt abgebildet; gibt die Laufaktivität über mehrere Wochen an, die rote Linie gibt die Punkte täglichen Aktivitätsbeginns an, die Differenz zwischen beiden Linie ist die Periodenlänge (τ). **c)** coronaler Schnitt durch ein Mäusegehirn auf Höhe des SCN, in dem Uhrgene exprimiert sind, die **d)** mit einer Periodizität von τ schwanken **e)** Ein Lichtpuls während der Aktivitätsphase (Dunkelheit) verändert den Aktivitätszyklus: zu Beginn der Nacht resultiert er in Phasenverzögerungen, charakterisiert durch negative Phasenverschiebung $\Delta\phi$, zum Ende der Nacht in vorseilender Phase (positiver $\Delta\phi$) Aus Albrecht and Eichele (2003).

Verlagerte LD Zyklen

Nach einer Gewöhnung an einen LD12:12 Zyklus für mindestens 10 Tage wurde das Licht nach einer verlängerten Dunkelperiode statt um 7:00 acht Stunden später (15:00) angeschaltet.

Die veränderte Lichtgabe wurde beibehalten ("Licht an" = ZT0 15:00 im Sommer und 14:00 im Winter; "Licht aus" = ZT12 um 3:00 bzw 2:00). Gemessen wurde die Verschiebung der Aktivitätsphase nach Verschiebung der Licht/ Dunkel-Phasen unter Berücksichtigung des Beginns der Aktivität. Nach weiteren 10 Tagen wurde der LD Zyklus wieder zurück verlagert, um die Adaption an einen vorverlagerten LD-Zyklus zu untersuchen.

2.7.3 Freies Laufen in Konstanter Dunkelheit

Nach einer Gewöhnung an einen LD12:12 Zyklus für wenigstens 10 Tage wurde das Licht am nächsten Morgen nicht wieder angeschaltet, sondern die Tiere für mehrere Wochen in konstanter Dunkelheit (DD) gehalten. Folgende Kriterien wurden untersucht:

- a. Interne Periode (τ): Länge eines subjektiven Tages bestimmt durch die Zeitspanne zwischen 2 aufeinanderfolgenden Aktivitätsphasen (gemessen am Aktivitätsbeginn). Der Durchschnitt wurde von 7 aufeinander folgenden Zyklen stabiler Rhythmizität in DD berechnet.
- b. Gesamtaktivität: Durchschnittszahl der Radumdrehungen und längsten überwundenen Distanz pro subjektiven Tag.
- c. Aktivitätsphase (α): Zeit zwischen dem Anfang und Ende der Aktivität.

2.7.4 Freies Laufen in Konstantem Licht

Die Aktivitätsmessungen in konstantem Licht (LL) wurden wie in DD durchgeführt. In einigen Experimenten wurden sich erhöhende Lichtintensitäten benötigt. Dafür wurden Isolationsboxen mit dimmbaren Halogenlampen (eine für jeden Käfig) ausgerüstet. Die Lichtintensität wurde mit einem Luxmeter (Testo, Germany) für alle Käfige gemessen (Abweichungen waren in allen Fällen geringer als 10%).

2.8 Schmerzexperimente/ Hot Plate

2.8.1 Generelles

Alle Versuche wurden auf einer Hot Plate Eigenkonstruktion durchgeführt (siehe Abbildung 2.3): bei dieser wird eine hohle Metallplatte (A) mit durchlaufendem warmen Wasser aus einem Wasserbad (B) erhitzt.

Die Wassertemperatur kann mit Hilfe des Wasserbades (Huber, Deutschland) auf $0,1^{\circ}\text{C}$ genau eingestellt werden, eine Temperaturkontrolle der Kontaktfläche ist mit einem Kontakt-Thermometer (C) möglich. Die Wärmeplatte ist gegen Wärmeverlust nach unten isoliert (D). In den Einzelversuchen wurden die Tiere einzeln auf die erhitzte Fläche innerhalb der Plexiglasskonstruktion (E) gesetzt, die das Fortbewegen der Tiere verhindert. Anschließend wurde die Zeit vom Hineinsetzen bis zur ersten Reaktion des Tieres gemessen. Als Reaktion galten Heben oder Lecken der Vorder- oder Hintertatze. Alle Experimente wurden während der Lichtphase in unabhängigen Tiergruppen in einem ruhigen Raum durchgeführt.

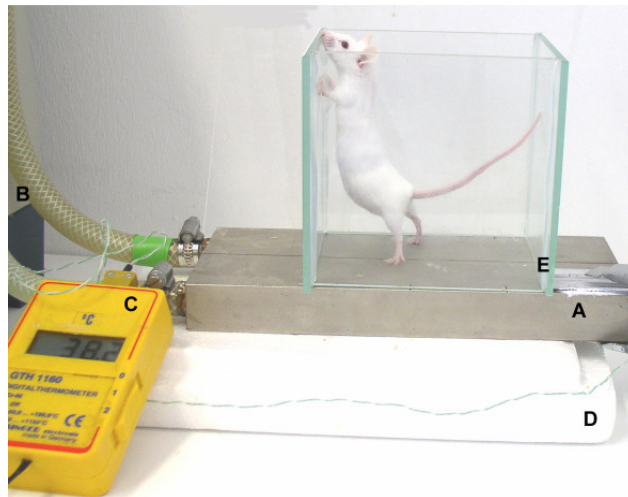


Abb. 2.3 Hot Plate Eigenkonstruktion

Eine hohle Metallplatte wird von Wasser, welches durch ein Wasserbad genau temperierbar ist, durchflossen und dadurch die Oberseite der Metallplatte erhitzt. Die Temperatur kann anhand eines Oberflächen-Kontaktthermometers auf $0,1^{\circ}\text{C}$ genau abgelesen werden. Eine Plexiglasschutzhülle verhindert das Entkommen der Versuchstiere. A=Wasserdurchflossene Wärmeplatte, B=Wasserbad, C=Kontaktthermometer, D=Isolierung, E=Plexiglasschutzhülle.

2.8.2 Primäre Untersuchung

Der primäre Schmerzempfindungstest wurde nach (O'Callaghan and Holtzman, 1975) durchgeführt. Für diese primäre Schmerzempfindungsuntersuchung wurden im Alter, Geschlecht und Gewicht gleiche Wildtyp-Tiere Temperaturen zwischen $52 - 55^{\circ}\text{C}$ ausgesetzt.

Diejenige Temperatur, bei der die Wildtyp-Tiere eine (Schmerz-) Reaktion innerhalb der ersten 10s zeigten, wurde ermittelt und im anschließenden Wildtyp/ Ear2^{-/-} Vergleichsversuch als Standard angenommen. Im folgenden Versuch wurden 10 Ear2^{-/-} und Wildtyp-Mäuse für max. 10s der oben ermittelten Temperatur ausgesetzt, die Reaktionszeit für jede Maus in drei Umläufen festgehalten.

2.8.3 Sekundäre Untersuchungen

An den Primärtest wurden drei sekundäre thermale Tests angeschlossen, in der die Nozizeption genauer bestimmt werden kann (Protokoll von R.Wiley unter <http://www.tnmouse.org/protocols/nociception2.pdf>).

Um die erste Schmerzempfindung – scharfer lokalisierter Schmerz, vermittelt durch A δ -Schmerzsensoren – zu bestimmen, wurden die Mäuse in drei Wiederholungen jeweils Temperaturen zwischen 53,5°C und 54,5°C für max 30 Sekunden pro Durchlauf auf die *Hot Plate* gesetzt. Die gemessenen Variablen sind die Durchschnitts-Wartezeit bis zum ersten Hinterfußlecken und die Gesamtzeit, die für Schützen und Lecken verwandt wird. Für die Bestimmung des sekundären Schmerzes – dumpfer brennender Schmerz, vermittelt durch C-Faser Schmerzsensoren –, werden die Mäuse bei 44°C für 600s der *Hot Plate* ausgesetzt und dieselben Variablen observiert.

Zum Hyperalgesie-Test wird Allylthiocyanat, welches als Reizsubstanz wirkt, auf die dorsale Oberfläche beider Hinterpfoten gepinselt und die Mäuse nach 3 Stunden Wartezeit auf der *Hot Plate* bei 44°C für 200s getestet. Als Anzeichen für Hyperalgesie können dann verminderte Latenz und eine erhöhte Anzahl Lecken gemessen werden.

Allylthiocyanat (AITC) wirkt lokal durch die Erweiterung von Blutgefäßen und wird nicht systemisch absorbiert. Die Wirkung in diesen Kleinstmengen ist ähnlich der einer schwachen Entzündung (eine leichte Rötung und Erwärmung des Gewebes), die zwar die Pfotenfläche empfindlicher macht, die Mäuse aber nicht am Laufen hindert. Für den Auftrag der Substanz wird die dorsale Seite der Pfote verwendet, da dadurch die Wirksamkeit gewährleistet ist, der Schmerz für das Tier aber auf ein Minimum reduziert wird. AITC wird angewendet, um kleine Unterschiede in der Nozizeption zu verstärken, die ohne es nicht sichtbar wären.

3 ERGEBNISSE

3.1 Expressionsanalyse

Da für *Ear2* keine Expressionsdaten vorlagen außer einer Studie (Jonk et al., 1994), in der eine ubiquitäre Expression des Gens während der Embryonalentwicklung von E4.5-14.5 beschrieben wird, wurde mit Hilfe von Northern Blots eine Übersicht über die generelle Expression des *Ear2*-Transkripts in embryonalem Gewebe unterschiedlichen Alters sowie verschiedenen Organen im adulten Organismus erstellt. Desweiteren wurde die genaue Lokalisation *Ear2*-exprimierender Zellen in Embryonen unterschiedlichen Alters sowie adulte Organe im Ganzen (*whole mounts*) oder in Schnitten durch *in situ*-Hybridisierung ermittelt. Insbesondere wurde auch das Auftreten von Redundanzen bzw. Koexpression mit den beiden anderen Mitgliedern der COUP-TF Familie, *COUP-TFI* und *Arp1*, untersucht.

3.1.1 Expression von *Ear2* während der Embryogenese

Die Expression von *Ear2* während der Embryogenese wurde mit Hilfe von Northern Blots, der *whole mount in situ*-Hybridisierung (wmISH), Hybridisierung von Schnitten (E12.5, E14.5 und E18.5) und LacZ/X-Gal-Färbung heterozygoter *Ear2^{+LacZ}* Mäuse untersucht. Zur weiteren histologischen Analyse wurden nach der wmISH und LacZ/X-Gal-Färbung einige Embryonen zwischen Tag 9 und 10.5 in Paraffin eingebettet und mit einem Mikrotom geschnitten. Um Fehlinterpretationen durch experimentelle Varianzen in der ISH auszuschließen, wurden wmISHs mehrfach durchgeführt und anschließend durch die Ergebnisse der LacZ/X-Gal-Färbung ergänzt. Bei jeder wmISH wurden als Positivkontrolle und zum Vergleich Embryonen gleichen Alters aus derselben Präparationsserie mit Antisense-Sonden molekularer Marker hybridisiert, deren Expressionsmuster bekannt ist und so gewährleistet wird, dass die Hybridisierung erfolgreich und unter gleichen Bedingungen verläuft.

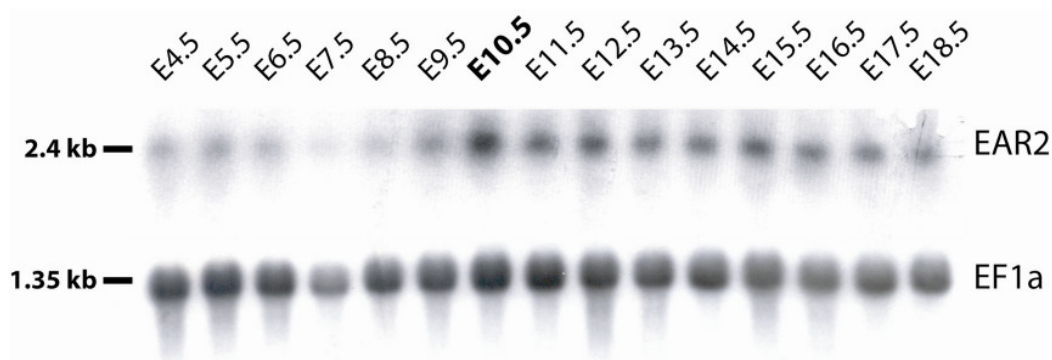


Abb.3.1: Ear2 Expression im Verlauf der Embryogenese von E4.5, vor dem Einnisten der Zygote in die Gebärmutterwand, bis kurz vor der Geburt (E18.5). Expression zeigt sich bereits bei E4.5, sinkt bei E7.5 ab, um danach wieder an Stärke zuzunehmen und bei E10.5 ihr Maximum zu erreichen. Anschließend nimmt sie kontinuierlich bis zur Geburt ab. *EF1a* diente als Ladekontrolle.

Ear2-Expression kann vom Einnisten der Zygote in die Gebärmutter bis kurz vor der Geburt (E18.5) detektiert werden, wobei das Maximum bei E10.5 anzusiedeln ist. Nach E10.5 sinkt die Expressionstärke, bleibt aber bis E18.5 auf etwa gleicher Höhe. Diese Ergebnisse des Northern Blot (Abb.3.1) konnten durch *whole mount* ISH bestätigt und ergänzt werden (Abb.3.2). Bei E7.5 ist schwache Expression im Bereich des gesamten Eizylinders zu sehen, die sich im entwickelnden Embryo alsbald (E8) auf wenige Regionen im *Mesencephalon* und *Rhombencephalon* (RhE) beschränkt (Daten nicht gezeigt). Bei E8.5 ist Expression und LacZ-Färbung im *Mesencephalon* und den Prärhombomeren A und B des Rhombencephalons vorhanden (Abb.3.2 A+B). Einen dreiviertel Tag später, bei E9.25, ist eine charakteristische starke LacZ-Färbung im dorsalen Bereich der inzwischen etablierten Rhombomere 1, 3 und 5 und MH-Grenze zu erkennen (Abb.3.2C). Expression erstreckt sich um E9.75 im Bereich von Rhombomer 1 (r1) über den Isthmus (Is) bis in das *Mesencephalon* (Abb.3.2.D+E). Hybridisierte Embryonen weisen Expression im dorsalen Bereich der Rhombomere 1, 3 und 5 sowie Neuralrohr auf (Abb.3.2D), LacZ-gefärbte Embryonen zeigen überdies noch Signal im gesamten Rhombomer 1 und ventralen Mesencephalon sowie einer Struktur ventral des Neuralrohres (Abb.3.2E). Von der ursprünglich gleichstarken Expression in r1, r 3, r5 weist nun r1 die stärkste Expression aller drei Rhombomere auf, wie sowohl hybridisierte als auch LacZ-gefärbte Embryonen zeigen. Transversale Schnitte durch das Rhombomer 1 von LacZ-gefärbten Embryonen zeigen *Ear2*-Expression nur im dorsalen Bereich der Rhombischen Lippe, aus der LacZ-positive Zellen ventral migrieren (Abb.3.2F). Ein Schnitt im Bereich des Neuralrohres zeigt LacZ-positive Zellen im äußeren Bereich des Neuroepithels (Abb.3.2.I). Zu diesem Zeitpunkt ist *Ear2* auch schwach in den Kiemenbögen, der Vorderbeinanlage und Augenanlage exprimiert.

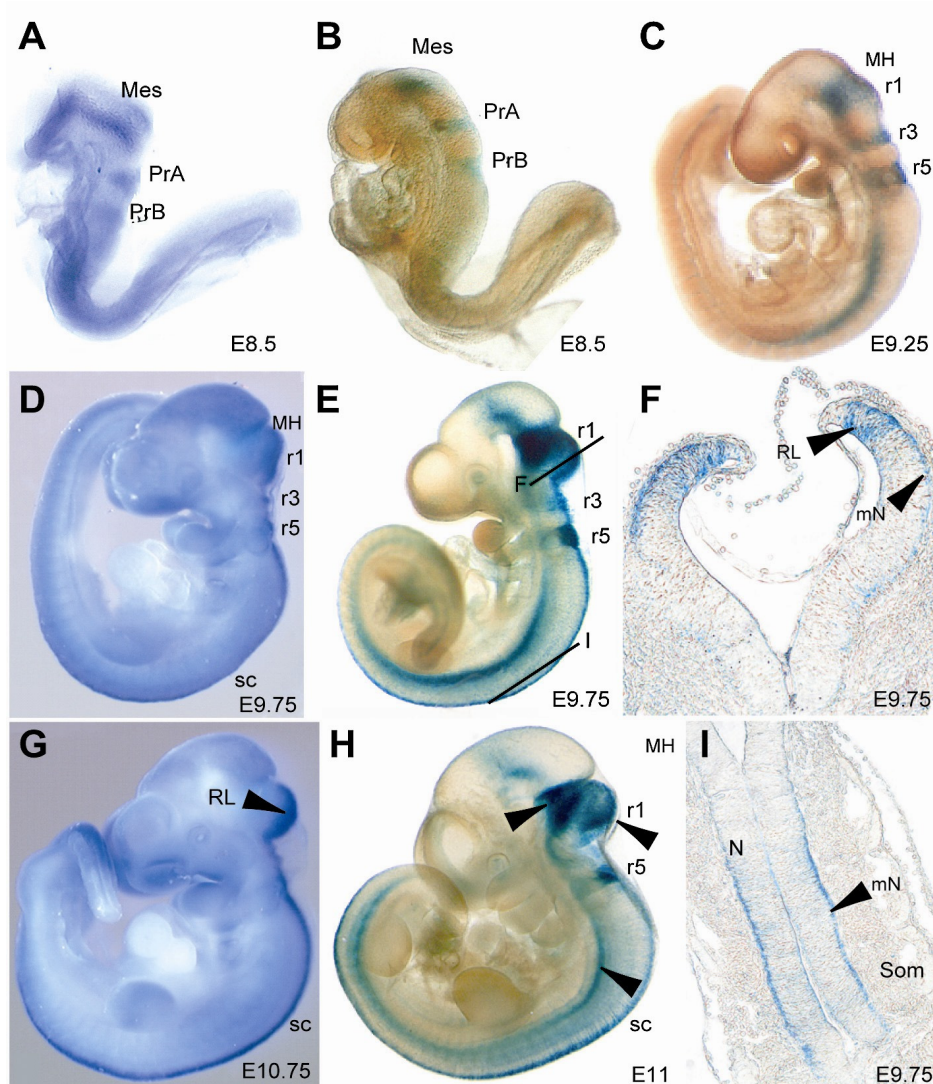


Abb.3.2 Spatiotemporalen Expressionsmuster von *Ear2* während der frühen Embryogenese

Whole mount in situ-Hybridisierung von Wt und X-Gal/LacZ Färbung von *Ear2^{+LacZ}* bei E8.5 – 11

A+B) ISH (A) und LacZ (B): laterale Sicht auf Embryonalstadium E8.5. Mit Bildung der Neuralfalte tritt die erste spezifische Expression in den Prärhombomeren A und B sowie im Mesencephalon auf, die sich bis E9.25 (**C**) in den Rhombomeren 1, 3, 5 und um die MH etabliert. **D+E**) ISH und LacZ: Laterale Sicht auf E9.75. Die bereits in E9.25 begonnene Expression in Rhombomer1, 3 und 5 erstreckt sich vom r1 bis ins Mesencephalon. In r5 ist noch starke Expression, während sie in r3 fast vollständig verschwunden ist. In den Kiemenbögen ist *Ear-2* mittelstark exprimiert. Ein transversaler Schnitt durch r1 (**F**) zeigt *Ear2*-Expression in der Rhombischen Lippe (RL), aus der Zellen ventral im äußeren Bereich des Neuroepitheliums wandern. **I**) Im Neuralrohr (D), migrieren *Ear2* exprimierende Zellen (mN) im dorsalen Neuralrohr ventral entlang des Neuroepitheliums (N). **G**) ISH, E10.75 Embryo. Die starke *Ear2*-Expression hat sich auf die gesamte Rhombische Lippe des Rhombencephalons und Rückenmarks ausgebreitet. **H**) LacZ-Färbung eines Embryos um E11. Starke LacZ-Färbung ist in der Mittelhirn-Hinterhirn-Grenze, r1, r5 und und dorsalen Bereich des Rückenmarks zu erkennen. Die Pfeile markieren LacZ-positive Zellen, die in der ISH nicht zu erkennen sind. Me=Mesencephalon; MH = Mittelhirn-Hinterhirn-Grenze; mN=migrierende Neuronen; N=Neuroepithel; rA,B,1,3,5=Rhombomer A,B,1,3,5; rl=Rhombische Lippe; Som=Somiten sc=Neuralrohr.

Auch die Expression im Bereich des *Mesencephalons* hat sich in craniale Richtung ausgeweitet, im Isthmus ist deutliches Signal zu erkennen. Bei E10.75 hat sich die Expression im Neuralrohr in caudaler Richtung ausgeweitet und erstreckt sich jetzt in hoher Stärke über die Rhombische Lippe und das gesamte dorsale Neuralrohr bis in die Schwanzknospe. Im Rhombomer1 ist *Ear2* weiterhin stark exprimiert, im Bereich des Mittelhirns nur noch schwach (Abb.3.2G). Überdies ist die bereits um E9.75 vorhandene schwach ubiquitäre Expression zu erkennen. Um E11 ist eine stark abgegrenzte LacZ-Färbung im ventralen und caudalen dorsalen Bereich des Rhombomer1 sowie Rhombomer5 zu erkennen. Mittelstarke Expression weisen die übrigen Bereiche des r1 und der dorsale Bereich des Neuralrohres auf (Abb.3.2H). Im Mesencephalon und der Struktur ventral des Neuralrohres ist nur noch schwaches Signal zu erkennen. Nach diesem Höhepunkt der Expression wird *Ear2* in den sich entwickelnden Gliedmaßen, der Wirbelsäule, sowie zahlreichen Organen exprimiert. Im Verlauf der späteren Entwicklung nimmt die Expression im Nervensystem ab und ist im adulten Stadium nur noch sehr schwach ubiquitär im gesamten Gehirn mit etwas größerer Stärke in den Purkinje-Zellen des Cerebellums vorhanden. Stattdessen findet sich *Ear2*-Expression in zahlreichen Organen, wie Lunge, Niere (siehe Abb.3.3), Leber, Magen, Verdauungstrakt (Abb.3.6) und Thymus (Abb.3.19).

Das Embryonalstadium 12.5 zeigt *Ear2* Expression fast ausschließlich in den Vorläufern der Wirbelknochen (Abb.3.3A). *Arp1* und *COUP-TFI* zeigen hier ein komplementäres Expressionsmuster. Während *Ear2* nur in den Vorläufern der Wirbel anzutreffen ist, werden die anderen beiden im Wirbelzwischengewebe und Zellen des ventralen Rückenmarks exprimiert (Abb.3.3A, B-B''). Außerdem sind beide in zahlreichen Regionen des Gehirns, der Leber und im Herz zu finden. Auch in der Lunge werden beide bereits bei E12.5 (Daten nicht gezeigt) im mesenchymalen Gewebe exprimiert; bei *Ear2* hingegen tritt die charakteristische Expression im Epithel der Bronchien und Bronchiolen erst im Stadium E14.5 auf (Abb.3.3C). Auch in diesem Stadium und Organ ist die Expression komplementär zu den beiden, die nicht im Epithel sondern schwach im Lungengewebe exprimiert werden (Abb.3.3C',C''). Kurz vor der Geburt sind alle im Lungengewebe vorhanden, aber nur *Ear2* besitzt starke Expression im Bronchien-/ Bronchiolenepithel, die auch im erwachsenen Stadium noch anhält (Abb.3.5D+D').

Ein ähnliches Bild zeigt sich in der entwickelnden Niere. *COUP-TFs* sind mit Beginn der Nierenentwicklung im Nierengewebe exprimiert. Bei *Arp1* und *COUP-TFI* beginnt Expression bereits in E12.5 in Nierenmesenchym, bei *Ear2* erst ab E14.5 in den primitiven Nierenkörperchen und Cortex (Abb.3.3E-E''). Kurz vor der Geburt (E18.5) ist die Gewebedifferenzierung fast abgeschlossen. *Ear2* ist nun im Bereich des tubulären Systems, *Arp1* im Nierengewebe, mit Ausnahme der Nierenkörperchen exprimiert. *COUP-TFI* und

Arp1 zeigen im Verlauf der späten Embryogenese eine starke Expression im cortikalen Gewebe der Nebenniere, mit stärkerer Expression von *COUP-TFI*. *Ear2* ist hier nicht exprimiert (Daten nicht gezeigt).

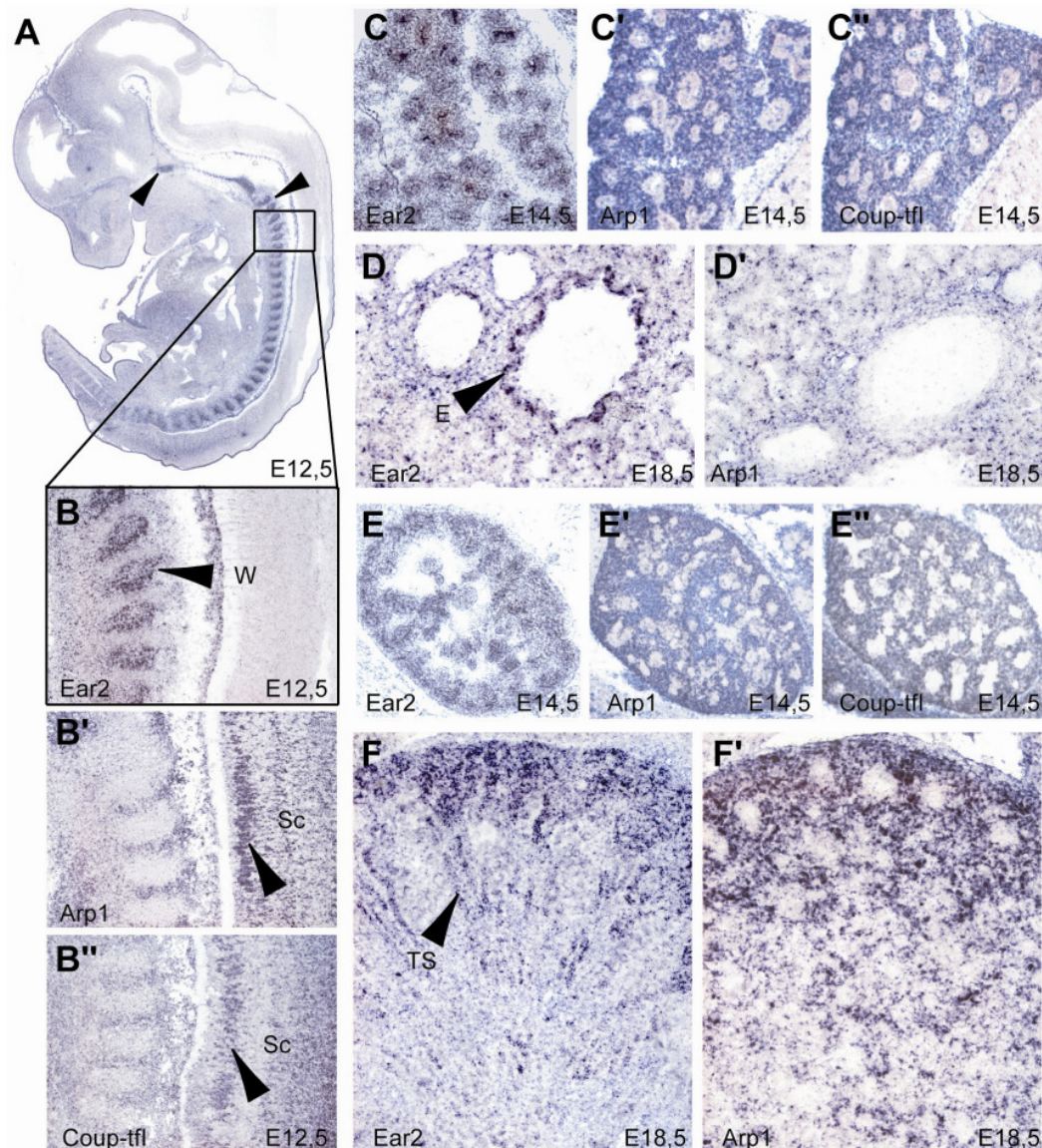


Abb.3.3: Komplementäre Expression von *Ear2*, *Arp1* und *COUP-TFI* in verschiedenen Regionen der späten Mausembryogenese (E12.5, E14.5, E18.5) *Ear2* zeigt eine komplementäre Expression zu *COUP-TFI* und *Arp1* im Wirbelkanal (A-B''), der Lunge (C-D') und Niere (E-F') B-B'') *Ear2* ist bei E12.5 in den Vorläufern der Wirbelknochen (W) exprimiert, *COUP-TFI* und *Arp1* im Zwischengewebe, sowie in ventralen Zellen des Rückenmarks (Sc) C-C'') E14.5 Lunge; *Ear2*-Expression im Bronchienepithel, *COUP-TFI* und *Arp*-Expression im Lungengewebe D+D') E18.5 Lunge; starke *Ear2*-Expression im Bronchienepithel (E), schwache *Arp1*-Expression im Lungengewebe, keine Expression im Epithel E-E'') E14.5 Niere; *COUP-TFI* und *Arp1* sind im Nierengewebe exprimiert, *Ear2* in komplementären Inseln mit hoher Expression F+F') E18.5 Niere; *Ear2* ist im tubulären System (TS) exprimiert, *Arp1* im cortikalen Nierengewebe.

3.1.2 Expression im adulten Organismus

Auch im adulten Organismus ist *Ear2*-Expression in hohem Maße in Leber und Niere exprimiert, in niedrigeren Konzentrationen in Darm, Herz und Speicheldrüse. Geringe Expression weisen Gehirn, Prostata, Magen, Schilddrüse und Gebärmutter auf. Keine Expression zeigen dagegen Hoden, und Milz (Abb.3.4). Die Ergebnisse konnten durch einen weiteren und mit einer längeren (915bp) Sonde hybridisierten Northern Dot Blot (Clontech) bestätigt werden (Daten nicht gezeigt).

Die Expression in adulter Niere, Lunge Uterus und Ovar wurde mit Hilfe der *in situ*-Hybridisierung von Schnitten und *whole mount* Präparaten in einer LacZ-Färbung weiter untersucht. Auch die Expression in Leber, Darm, Magen und Thymus wurde weiter verfolgt (siehe Abb.3.18 sowie 3.20).

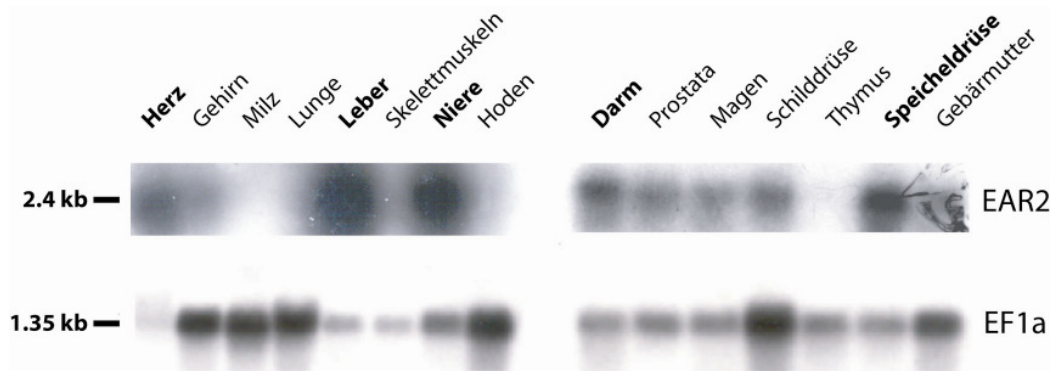


Abb. 3.4 Northern Blot verschiedener adulter Gewebe

Ear2 ist in den meisten der untersuchten adulten Gewebe exprimiert, allerdings in unterschiedlicher Stärke. Starke Expression ist in Leber und Niere zu erkennen, etwas geringere in Darm, Herz und Speicheldrüse. Mittelstarke Expression zeigen Schilddrüse, Prostata, Magen, Lunge, Gehirn und Uterus. Thymus und Milz zeigen keine Expression. (Mouse MTN Blot I+II, Clontech) EF1 α diene als Ladekontrolle.

Ear2-Transkripte finden sich im adulten Ovar in entwickelnden Follikeln, detektiert sowohl in *in situ*-Hybridisierung (Abb.3.5B) als auch durch LacZ/X-Gal *whole mount* Färbungen (Abb.3.5A schwarzer Pfeil). Im Gebärmutterhorn konnte Expression von *Ear2* in Zellen der Schleimhaut gefunden werden (Abb.3.5B, Gb). Starke LacZ-Färbung ist auch im Bereich des Eileiters zu erkennen. Für *Arp1* konnte starke Expression in Gebärmutter Schleimhaut und Bindegewebe des Eierstocks detektiert werden. COUP-TFI zeigt nur geringe Expression im Eierstock (Daten nicht gezeigt). In der adulten Lunge (Abb.3.5D-F) beschränkt sich die *Ear2*-Expression auf den epithelialen Bereich. Hier sind in beiden Nachweismethoden Zellen des Bronchiolenepithels gefärbt (3.5D+E). Das übrige Lungengewebe zeigt keine *Ear2*-Expression. Untersuchungen des Nierengewebes zeigen, wie in der Embryonalentwicklung

beobachtet, eine komplementäre Expression der zwei COUP-TF Mitglieder *Arp1* und *Ear2* (Abb.3.3E-E'', F und F'). Beide sind im corticalen Bereich der Niere exprimiert: *Ear2*, wie in E14.5 (Abb.3.3F) immer noch im tubulären System, *Arp1* jedoch jetzt in Zellen des Nierenkörperchens (Bowmannsche Kapsel) und schwach im medullären Bereich (Abb.3.5E). Abbildung 3.5C zeigt die mit HE-Färbung sichtbar gemachten histologischen Strukturen.

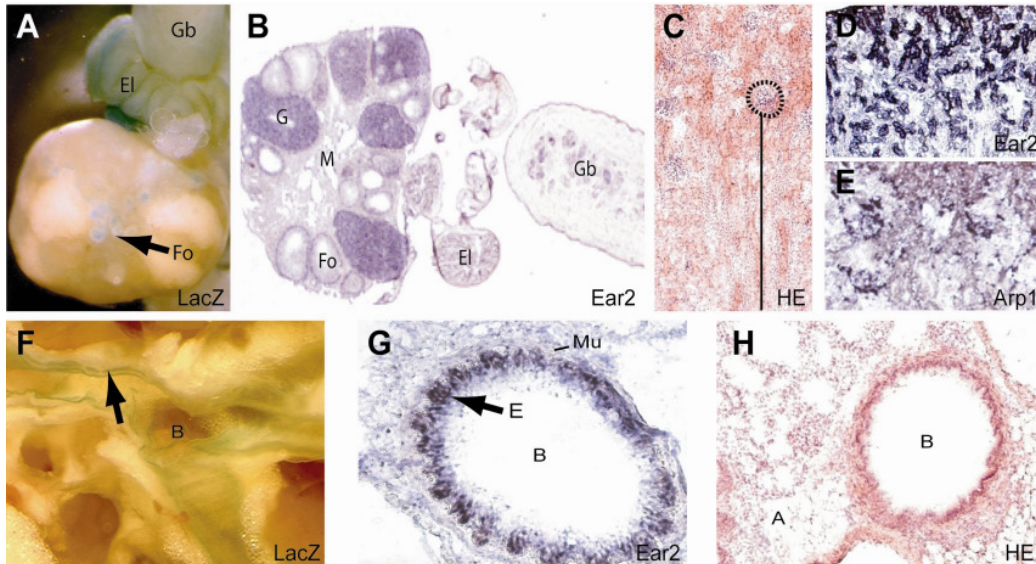


Abb.3.5: *Ear2*-Expression in adultem Uterus, Ovar, Lunge und Niere

Ear2 ist in sich entwickelnden Follikeln des Eierstocks (A, B), der Schleimhaut der Gebärmutterhörner, sowie in Niere und Lunge exprimiert. **A)** *whole mount* LacZ Färbung eines adulten Eierstocks. *Ear2* ist in Follikeln (Fo) und Eileiter (El) exprimiert. **B)** ISH von adultem sagittal geschnittenen Eierstock und Gebärmutterhorn; *Ear2* ist in Follikeln (Fo), Gelbkörpern (G) sowie der Gebärmutter-schleimhaut (Gb) exprimiert, in geringem Maße im Eileiter **C-E)** Sagittal geschnittene adulte Niere **C)** HE-Färbung: zu erkennen ist die Bowmannsche Kapsel (Kreis) sowie Henlesche Schleife (Strich). **D)** *Ear2*-ISH; Signal ist im tubulären System zu finden **E)** *Arp1*-ISH; *Arp1*-Expression in den Zellen der Bowmannschen Kapsel. **F)** *whole mount* LacZ/X-Gal-Färbung eines adulten Bronchus (B), zeigt Färbung im Epithel desselben (Pfeil). **G)** ISH; *Ear2* zeigt starke Expression im Bronchiolenepithel (E), jedoch nicht in der darunterliegenden Muskelatur. **H)** HE-Färbung adulter Lunge; zu sehen sind Alveolen (A) und Bronchiole (B).

3.1.3 *Ear2* ist in wichtigen Organen des Fettstoffwechsels exprimiert

Erste Untersuchungen anhand von Northern Blots adulter Gewebe zeigten (siehe Abb.3.4), dass *Ear2* in der Leber in hohem Maße exprimiert ist. Ergänzungen dieser Beobachtung durch ISH und LacZ-Färbung (Daten nicht gezeigt) zeigen ubiquitäre *Ear2*-Expression verteilt über das gesamte adulte Lebergewebe (Abb.3.6B) vergleichbar mit der in vorherigen Experimenten validierten ubiquitären Expression von *Adcy8* (Abb.3.6D). Im Gegensatz zu *COUP-TFI*, welches in hohem Maße in Zellen der äußeren Leberläppchen exprimiert ist (Abb.3.6A), zeigt die ebenfalls neu als Lebermarker entdeckte *Adenylatcyclase 6* spezifische

Expression in Zellen des Leberläppchens. *COUP-TFI*, *Arp1* und *Ear2* sind auch während der gesamten Embryogenese exprimiert, jedoch weist *Ear2* eine deutlich stärkere ubiquitäre hepatische Expression mit einem Höhepunkt um E18.5 (Abb.3.6E+E') auf.

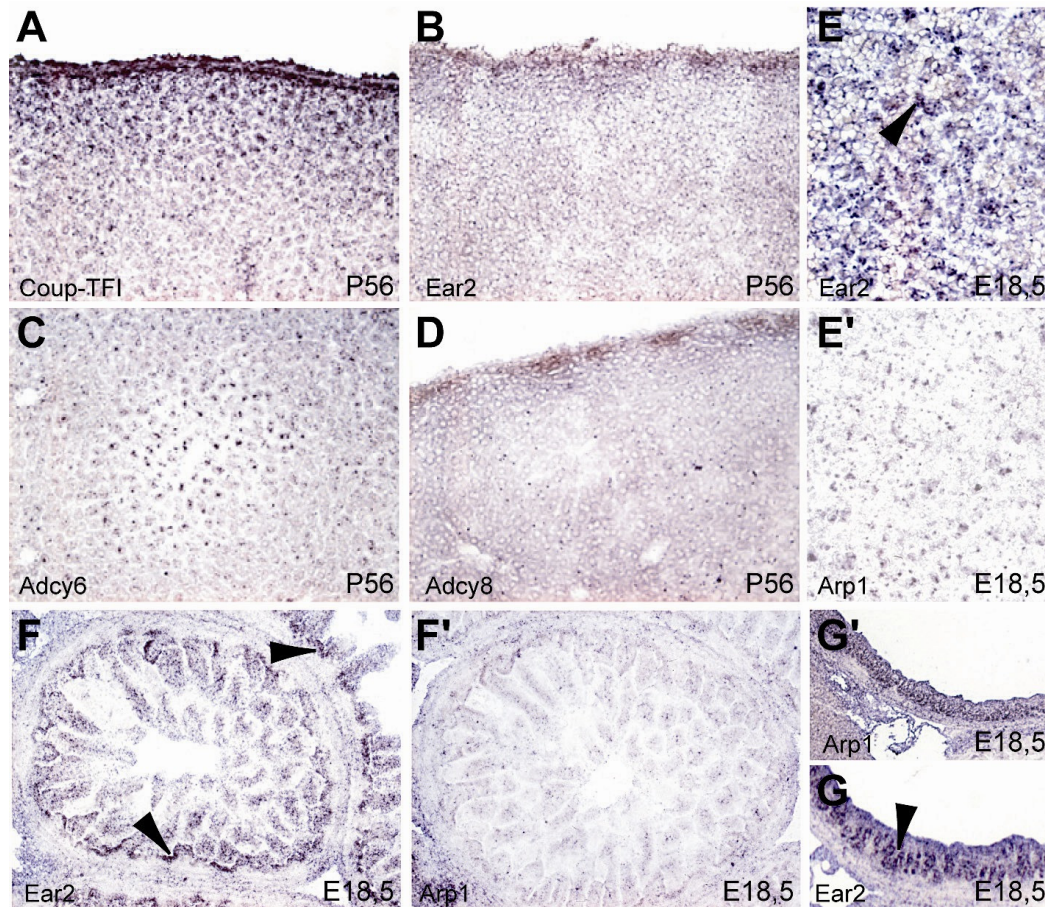


Abb.3.6 *Ear2*, *COUP-TFI* und *Arp1* Expression in embryonalen und adulten Organen des Verdauungstrakts A-D) Expression von *Ear2*, *COUP-TFI* und den in unserem Labor entdeckten Markergenen *Adcy 6* und *Adcy 8* in adulter Leber; *Ear2* und *Arp1* in embryonaler E18.5 Leber (E+E'), sowie in E18.5 Darm (F+F') und E18.5 Magen (G+G').

Neben der Leber findet sich *Ear2*-Expression auch noch in anderen Organen des Verdauungssystems. *Northern Blots* aus adultem Gewebe (s.Abb.3.4), sowie *in situ*-Hybridisierung von Embryonen (Abb.3.6 F+G) und adulten Organen (Daten nicht gezeigt) weisen *Ear2*-Expression in Magenschleimhaut (Abb.3.6G), sowie Dick- und Dünndarmepithel (Abb.3.6F) auf. *Arp1* zeigt ebenfalls Expression in Magenschleimhaut und Dickdarmepithel, in geringem Maße auch im Dünndarmepithel (Abb.3.6 F').

Die starke *Ear2*-Expression in diesen Organen, die in die Erzeugung der im Fettstoffwechsel wichtigen Apolipoproteine involviert sind (Berg, 2003; Karlson, 1994) mit einer höheren embryonalen Expression als die beiden anderen *COUP-TFs*, weist auf eine Rolle von *Ear2* in

der Entwicklung der Organe und ihres Stoffwechsels hin, die aufgrund geringer bis keiner Expression der anderen *COUP-TFs* vermutlich nicht redundant ist. In adulten Organen kehrt sich dieses Verhältnis allerdings um.

3.2 Konstrukt für gezielte *Ear2*-Deletion

Zur weiteren Untersuchung der Funktion von *Ear2* stand eine bisher nicht untersuchte heterozygote *Ear2*-Maus der F0-Generation von Jean-Pierre Revelli (Lexicon, Genetics, USA) zur Verfügung. Eine erstmalige Kreuzung zu homozygoten Nachkommen wurde vorgenommen und Genotypisierungstechniken entwickelt.

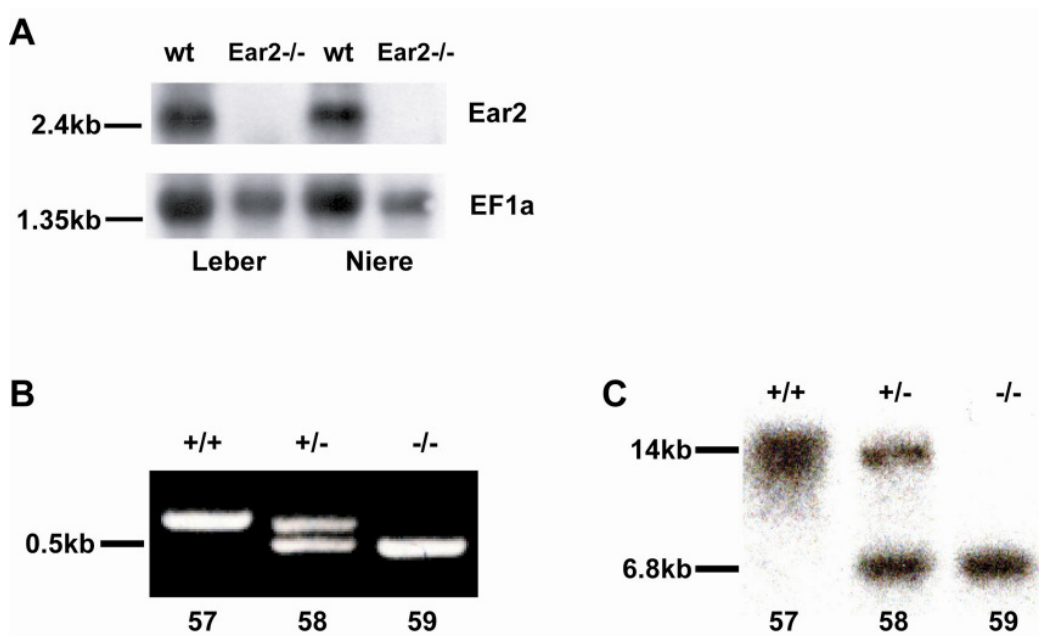


Abb.3.7 Verifizierung der *Ear2* Null-Mutation

mit Northern Blot (A) und Genotypisierung durch PCR (B) oder Southern Blot (C)

A) Northern Blot von Wildtyp- und *Ear2*^{-/-}-Gewebe der Niere und Leber. Im Wildtypgewebe ist *Ear2* als 2.5 kb großes Transkript exprimiert, in Mutantengewebe ist keines zu finden. *EF1a* diene als Ladekontrolle. B) PCR-Genotypisierung; die Wildtyp-Bande liegt bei 532bp, die Mutanten-Bande bei 478bp. Dargestellt sind ein Wildtyp (57), ein heterozygotes (58) und ein homozygotes (59) Tier. C) Genotypisierung mittels Southern Blot. Die Wildtyp-Bande liegt bei 14kb, die Mutanten-Bande bei 6.8 kb. Es wurden die gleichen Tiere wie für B verwendet.

Ear2 Mäuse leben, sind fruchtbar und zeigen generell ein normales Verhalten und unveränderte äußere Anatomie. Im Vergleich zu Wildtyp-Tieren gibt es keine offensichtlichen Unterschiede in der Lebensspanne. Ein *Northern Blot* mit mRNA von adulter Leber und Niere von Wildtyp bzw. homozygoter Mutante zeigt, wie bei (Jonk et al., 1994) beschrieben, ein einzelnes Transkript bei 2.5 kb im Wildtyp, jedoch nicht in der Mutante

(Abb.3.7A). Die komplette Abwesenheit von *Ear2* mRNA zeigt, dass die Insertion wirklich zu einer Null-Mutation des Gens führte.

Die Nachkommen der F0-Generation wurden anhand von *PCR-Assay* (Abb.3.7B) oder *Southern blotting* (Abb.3.7C) genotypisiert. Im genetischen Hintergrund 129/SvJ x C57BL/6J wurden die Mäuse nach erwarteter Mendelscher Verteilung geboren.

3.3 Funktion von *Ear2* im sich entwickelnden ZNS

3.3.1 *Ear2* ist in Zellen des Rhombomers1 exprimiert

In situ-Hybridisierung und LacZ-Färbung zeigen den Beginn der *Ear2*-Expression um E8.25 in zwei abgegrenzten Streifen in dorsoventraler Ausrichtung entlang des Neuralrohres, dem Prerhombomer A und B (Abb.3.2A). Von E9.0 bis 9.75 wurden *Ear2* Transkripte in hohem Maße im dorsalen Bereich des Rhombomer1, 3 und 5 detektiert (Abb.3.2C+D). Transversale Schnitte durch Rhombomer1 konnten die Expression in der Rhombischen Lippe lokalisieren (Abb.3.2.F), ein germinatives Epithelium an der Grenze zwischen Neuralrohr und Dachplatte des Rhombencephalons (zur Übersicht siehe Wingate (2001)).

Aufgrund der metamerischen Expression von *Ear2* im sich entwickelnden Rhombencephalon eröffnet sich die Möglichkeit, dass *Ear2*^{-/-}-Embryonen Defekte in der Hinterhirnsegmentierung aufweisen. *In situ*-Hybridisierungen mit rhombomerspezifischen Markergenen wie *Krox20* für r3 und r5 und *HoxB1* für r4, sowie dem Marker der Rhombischen Lippe *Math1* zeigten keine Veränderungen in der Expression (Abb.3.8A-B' und Daten nicht gezeigt). Auch immunohistochemische Färbungen von Neurofilamenten (Abb.3.8C), die craniale Nerven und Ganglien bilden, welche aus den Rhombomeren des Hinterhirns entstehen, weisen keine Defekte in *Ear2*^{-/-}-Embryonen in der Hinterhirnregion auf (Abb.3.8D+D'). Deshalb wurden als nächstes die aus der Rhombischen Lippe des Rhombomer1 entstehenden Strukturen untersucht. Aus früheren Studien ist bekannt, dass die Vorläufer der externen Körnerzellen des *Cerebellums* (EGL), aus der Rhombischen Lippe des Rhombomer1 entstehen (zur Übersicht siehe Wingate (2001)).

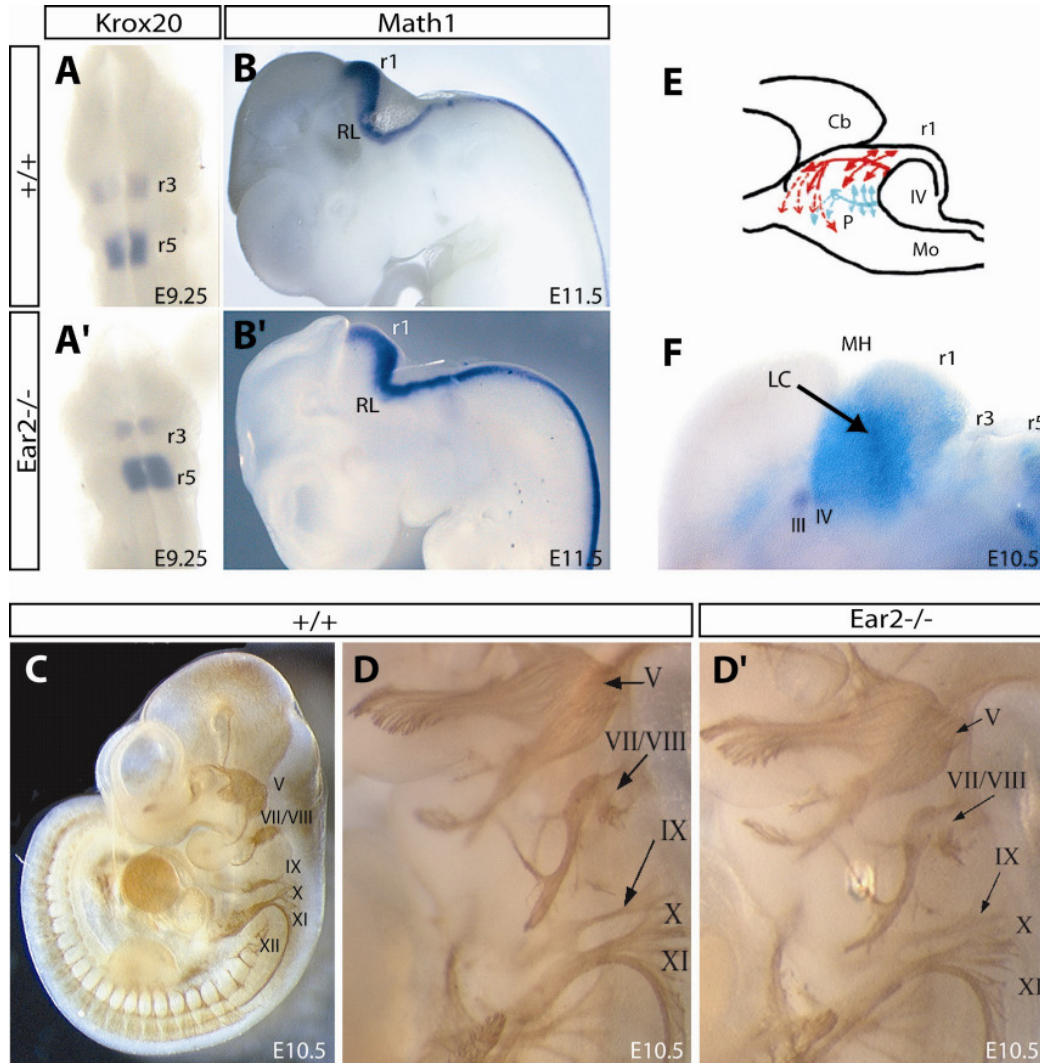


Abb.3.8: Untersuchungen des Rhombencephalons früher Wt- und Ear2^{-/-}-Embryonen
A-B') Expression von Rhombomerspezifischen Markern auf Ear2^{-/-}. Die Expression von *Krox20* (A) und *Math1* (B) ist bei Ear2^{-/-}-Embryonen (A',B') unverändert. **C-D'**) 2H3-Immunohistochemie zur Anfärbung von cranialen Ganglien. D und D' stellen Ausschnitte von C dar. Ear2^{-/-}-Embryonen zeigen keine offensichtlichen Veränderungen der cranialen Nerven. **E**) Schematische Darstellung eines embryonalen Gehirns mit Migrationsrichtung von in Rhombomer1 entstandenen Zellen (Lin et al., 2001). **F**) Die Doppelfärbung eines E10.5 Embryos mit LacZ (türkis) und Phox2a-ISH (blau-schwarz) zeigt überlappende Expression von *Phox2a*-positiven Zellen der LC-Anlage und *Ear2*-positiven Zellen. im Rhombomer1. Cb=Cerebellum; LC=LC-Anlage; MH=Mittel-Hinterhirn-Grenze; Mo=Medulla oblongata; P=Pons; r1, 3, 5=Rhombomer; RL=Rhombische Lippe, IV=4.Ventrikel; III, IV, V, VII,IX, X, XI=Ganglion des 3,4,5,7,9,10,11 Nervs.

Außerdem entstehen aus dem rostralen Bereich der rhombischen Lippe Neuronen verschiedener pontiner Nuklei (Wingate and Hatten, 1999) und der Locus coeruleus (LC) (Lin et al., 2001). Vorläuferzellen desselbigen migrieren nach ihrer Entstehung im rostralen dorsalen Bereich des Rhombomer1 in ventrale Richtung (siehe Abb. 3.8E untere rote Pfeile), die Richtung, in die auch durch das LacZ-Reporterkonstrukt verfolgten ehemals *Ear2* exprimierenden Zellen wandern (Abb.3.2.F mN). LC-Vorläuferzellen exprimieren zunächst

postmitotisch die noradrenerg-typischen Differenzierungsgene *Phox2a* und *Phox2b* (Pattyn et al., 2000a), anschließend die LC-typischen Gene *Dopamin- β -Hydroxylase* (DBH) und *Tyrosin-Hydroxylase* (TH). Doppelfärbungen von Embryonen, die nach einer LacZ-Färbung mit *Phox2a*, dem frühesten Marker von LC-Vorläufern, hybridisiert wurden, zeigen um E10.5 eine Überlappung der *Phox2a*-Expression und LacZ-Färbung in der LC-Anlage im Rhombomer1 (Abb.3.2F, Pfeil), aus denen LC-Vorläufer entstehen, nicht jedoch im caudalen Bereich, der Region, aus der die noradrenergen Zellen der A5 Gruppen und *Locus subceruleus* hervorgehen (Morin et al., 1997; Pattyn et al., 2000b).

3.3.2 Der Locus coeruleus von *Ear2*^{-/-}-Mäusen ist reduziert

Die aus der Rhombischen Lippe des Rhombomer1 entstehenden Vorläuferzellen entwickeln sich zum den äußeren Körnerzellen des Cerebellums (EGL) sowie zahlreichen pontinen Nuklei und dem Locus coeruleus (LC), der als kompakter Nukleus am Boden des Vierten Ventrikels im Pons entsteht. Da ein Defekt in der Spezifikation in den Vorläufern von *Ear2*^{-/-}-Tieren im adulten Gehirn sichtbar sein sollte, wurden diese Strukturen in *Ear2*-defizienten Tieren in Bezug auf neuroanatomische Defekte untersucht.

Vergleichende Nissl-gefärbte serielle Schnitte durch das Gehirn von adulten Wildtyp- und *Ear2*^{-/-}-Mäusen zeigen keine offensichtlichen morphologischen Defekte des Cerebellums oder irgendeiner der pontinen Nuklei (Daten nicht gezeigt), mit Ausnahme des Locus coeruleus, der eine merkliche morphologische Veränderung aufweist (Abb.3.9). Homozygote *Ear2* Mutanten zeigen in Nissl-Färbung von P56 Gehirnen eine starke Reduktion des LC (Abb.3.9D+D'). Aber auch heterozygote Tiere weisen bereits eine merkliche Reduktion des LC auf (Daten nicht gezeigt). Hybridisiert man coronale Schnitte mit den charakteristischen Genen des adulten LC, *Tyrosin Hydroxylase* und *Dopamin β -Hydroxylase*, welche die Synthese des für die LC-Zellen typischen Noradrenalin aus Tyrosin katalysieren (siehe Abb.1.7B) (Goridis and Rohrer, 2002), so wird deutlich, dass der LC in allen Markern in dorsoventraler Richtung reduziert ist (Abb.3.9E'-K').

Das in eigenen ISH-Experimenten neu entdeckte LC-Markergen *FGFR1*, welches neben den Neuronen des Nucleus trigeminalis (MeV) ebenfalls diejenigen des LC anfärbt (Abb.3.9G) zeigt ebenfalls eine Reduktion in dorsoventraler Richtung (Abb.3.9G') und unterstützt damit die Beobachtung in den anderen Markern. Zur präziseren Bestimmung des Defekts wurde der morphologisch sehr heterogene LC auch in sagittaler Richtung untersucht.

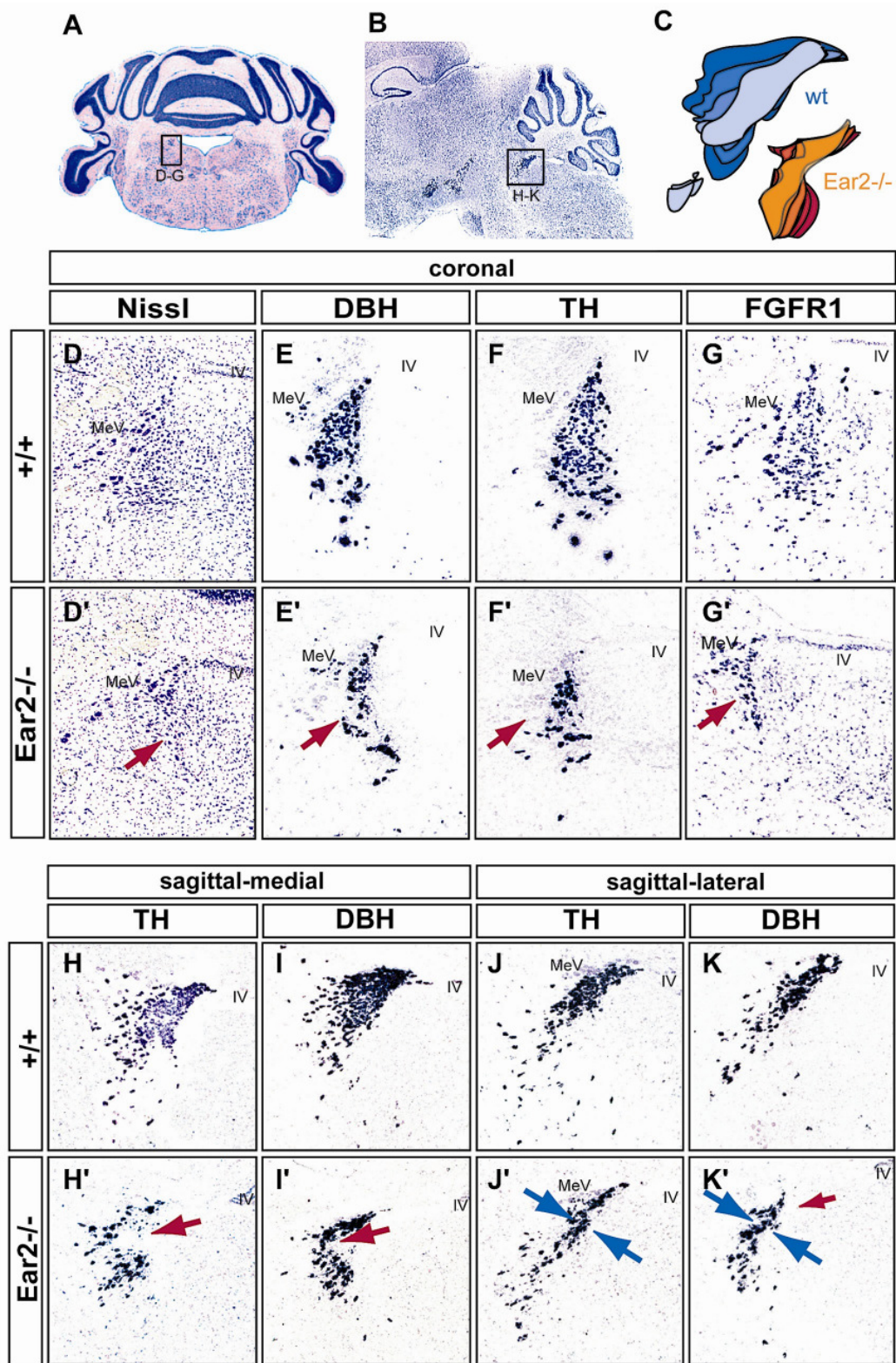


Abb.3.9: Die Anzahl der LC-Zellen im adulten LC von Ear2^{-/-}-Mäusen ist stark reduziert.
 A) Coronaler Schnitt durch P56-Gehirn in der LC-Pons-Region, das Kästchen entspricht dem Ausschnitt von D-G'. B) Sagittaler Schnitt durch P56-Gehirn in der LC-Pons-Region, das Kästchen entspricht dem Ausschnitt von H-K'. C) 3D-Rekonstruktion der Ausdehnung eines ganzen LCs in Wt

und Ear2^{-/-}-Tieren. Nissl-Färbung (B,D,D') sowie *in situ*-Hybridisierung verschiedener Marker auf coronalen (E-G) und sagittalen (H-K) Schnitten von adultem (P56) Wt- (D-K) und Ear2^{-/-}- (D'-K') Gehirn. Die Reduktion des LC bei homozygoten Ear2-defizienten Tieren ist mit Nissl-Färbung (D+D'), den Standardmarkern Dopamin Hydroxylase (E,E',I,I',K,K') und Tyrosin Hydroxylase (F+F',H,H',J,J') und, sowie dem neuentdeckten Marker FGFR1 (G,G') sichtbar gemacht. In den coronalen Schnitten zeigen alle Marker eine Reduktion der mittleren lateralen Zellen des LC (rote Pfeile); mediale sagittale Schnitte (H,H',I,I') deuten auf einen Verlust der zentrocaudalen Zellen hin (rote Pfeile), laterale Schnitte (J,J',K,K') zeigen eine Reduktion der Zellen im mittleren Bereich (blaue Pfeile). IV= Vierter Ventrikel, MeV= mesencephalischer Nucleus des trigeminalen Ganglion.

Sagittale Schnitte sowohl durch den medialen (Abb.3.9C+H,H'+I,I') als auch lateralen (Abb.3.9J,J'+K,K') Bereich des LC zeigen, dass auch in craniocaudaler Richtung eine Reduktion der TH-positiven Zellen vorliegt. In medialen Schnitten (Abb.3.9H', I') fehlen TH- und DBH-positiv Zellen im mittleren LC, in lateralen Schnitten sind weniger Zellen im zentralen Bereich und die Ausdehnung insgesamt auf den mittleren Teil beschränkt (Abb.3.9J', K'). Die Reduktionen beider Ebenen zusammengenommen ergibt die dreidimensionale Rekonstruktion in Abb.3.9C. Eine quantitative Auswertung TH-positiver LC-Zellen auf coronalen Schnitten mehrerer adulter Wildtyp- und Ear2^{-/-}-Gehirne ergab, dass zwei Drittel der LC-Zellen in Ear2^{-/-} fehlen. Von insgesamt 1726 +/-23 LC-Zellen - bereinigt nach Abercrombie (Abercrombie, 1946) - verbleiben im homozygoten Ear2-defizienten Tier 486 +/-22 Zellen (Abb.3.10B). Dies entspricht einer Reduktion um 72%.

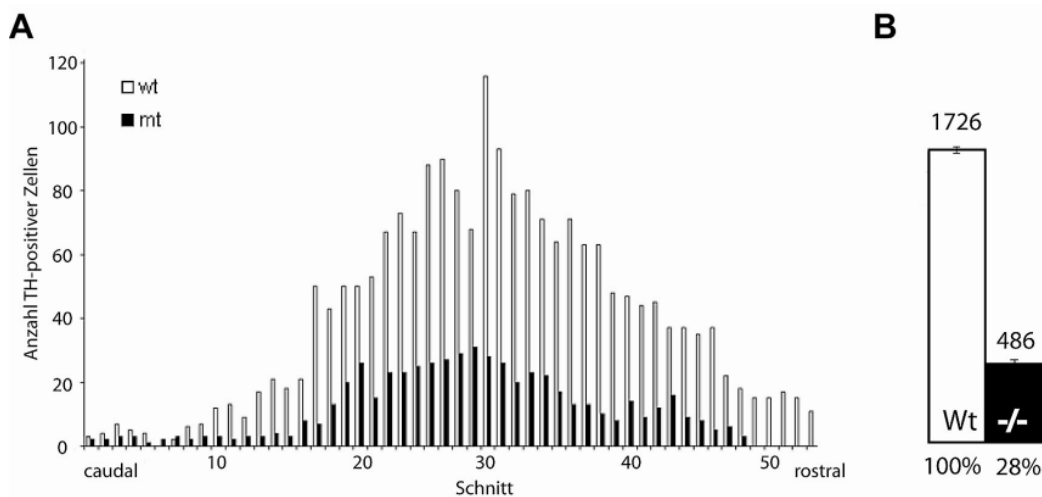


Abb.3.10: Die Anzahl der LC-Zellen von Ear2^{-/-} Mäusen ist auf ein Drittel reduziert.
A) Zellzählungen coronaler 20µm dicker Cryoschnitte von P56 Wildtyp- und Ear2^{-/-}-Gehirnen zeigen Anzahl und Verteilung TH-positiver Zellen. **B)** Die TH-positiven Zellen sind im Ear2^{-/-}-LC um 72% reduziert. Wt= Wildtypzellen, mt= Ear2^{-/-}-Zellen

Auch bei heterozygoten Tieren zeigt sich bereits eine Verminderung der Zellzahl um etwa ein Drittel (Daten nicht gezeigt). Eine Aufstellung der Zellverteilung, zeigt über den ganzen LC verteilt eine Reduktion der LC-Zellen um 65-70%, und das Fehlen der Zellen im rostralem LC (Abb.3.10A).

3.3.3 Dem LC von Ear2^{-/-} Mäusen fehlen Subpopulationen von Zellen und Projektionen

Nach Swanson (1976) können die Zellen des LC aufgrund der Morphologie und Ausrichtung der Zellen in einen dorsalen und ventralen Teil eingeteilt werden (Abb.3.11A, rote Linie). *In situ*-Hybridisierungen sagittaler Schnitte mit *TH* (Abb.3.11A und B) weisen eine starke Reduktion von Zellen im dorsalen Bereich des LC auf (Abb.3.11B, roter Pfeil). Lediglich ein paar Zellen des dorsalen frontalen LC bleiben bestehen (Abb.3.11B obere rote Linie). Genauere Untersuchungen der Subpopulationen des LC anhand von Tyrosin Hydroxylase-Antikörperfärbungen, in dem das Protein im Gegensatz zu den Präzipitaten der ISH durch eine gleichmäßige Verteilung in der Zelle deren Form sichtbar macht, zeigen auf seriellen sagittalen Schnitten von adulten Gehirnen (Abb.3.11C-J), dass vor allem eine Subpopulation des LC fehlt; dies sind die von Swanson (1976) als *densely packed dorsal cells* bezeichneten Zellen des dorsalen LC (Abb.3.11I). Diese Zellen sind in der gleichen Region des LC von Ear2^{-/-}-Tieren nicht mehr vorhanden (Abb.3.11D,F, roter Pfeil). Stattdessen finden sich wenige längliche Zellen (Abb.3.11J) gleicher Gestalt wie diejenigen des ventralen LCs, die von Swanson als multipolare, große, weniger dicht gepackte beschrieben wurden und sich im ventralen LC von Wildtyp und Ear2^{-/-}-Tieren nicht unterscheiden (Abb.3.11G und H).

Durch den Transport des TH-Enzyms vom Zellkern in die Fortsätze können außerdem die aus den TH-positiven Zellen entspringenden Projektionen in die Region ihrer Zielzellen verfolgt werden. Vergleiche zeigen, dass Projektionen des Ear2^{-/-}-LC insgesamt deutlich reduziert sind und vor allem im medialen cranialen und ventralen caudalen Bereich fehlen (Abb.3.11C +D, schwarze Pfeile). Die fehlenden Projektionen im medialen cranialen entstammen normalerweise vermutlich den kleinen runden Zellen im zentralen und anterioren LC, die zusammen mit einigen multipolaren anterioren Zellen zum *Hypothalamus* projizieren (Loughlin et al., 1986b). Die im ventralen caudalen Bereich fehlenden Projektionen könnten sowohl aus den großen multipolaren Neuronen des ventralen LC stammen, die *Cerebellum* und Rückenmark innervieren (Loughlin et al., 1986b), als auch aus Zellen des dorsalen ipsilateralen LC sein, welche zum *cerebralen Cortex* projizieren (Waterhouse et al., 1983). Allerdings ist die Natur der Projektionen hoch divergent. Die meisten LC-Zellen projizieren

zu mehr als einem Gebiet (Aston-Jones, 1995), so dass einer topographischen Subgruppe nicht ausschließlich bestimmte Projektionen zugeordnet werden können.

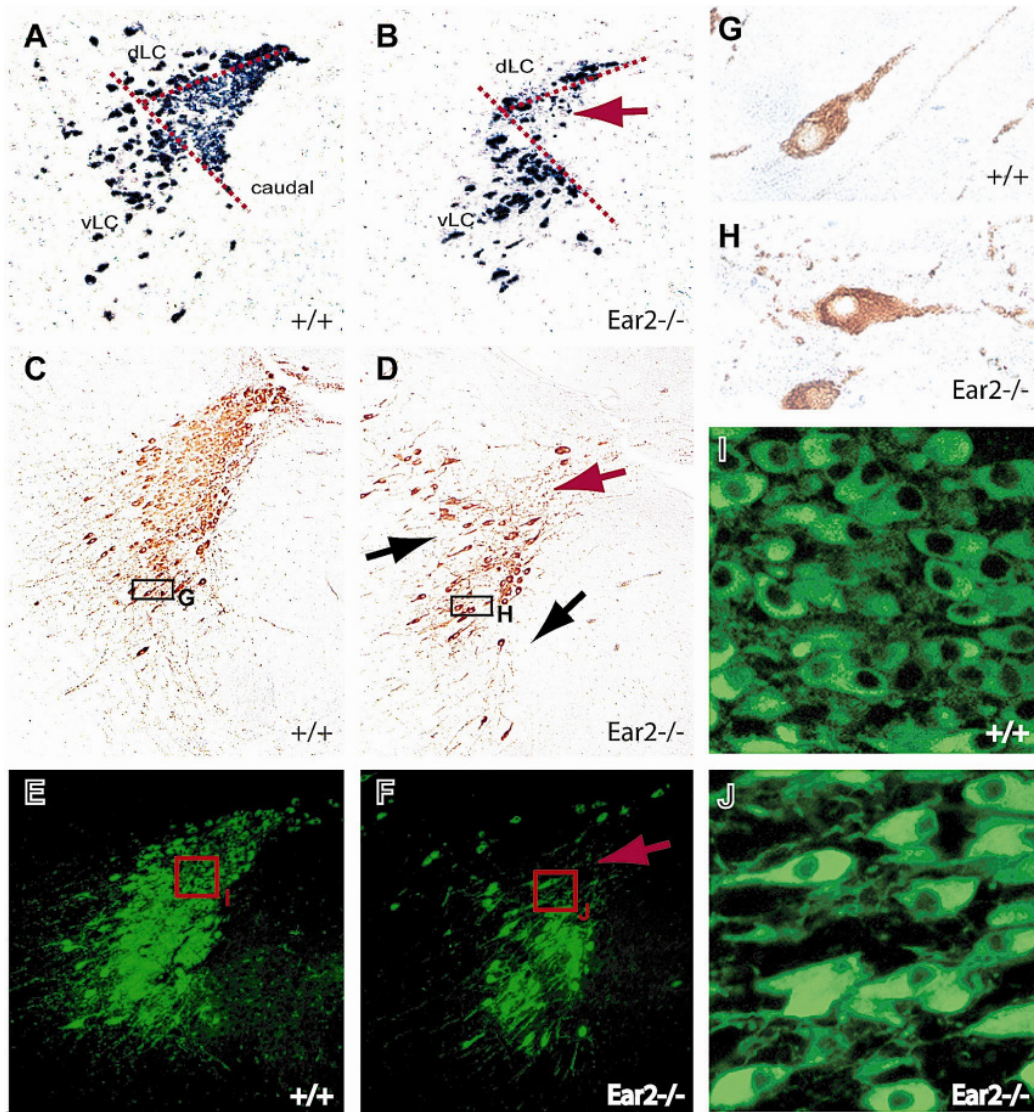


Abb.3.11: Die dichtgepackten Zellen des dorsalen LC sowie ihre Projektionen sind bei Ear2^{-/-} verschwunden: Tyrosin Hydroxylase *in situ*-Hybridisierung (A,B) und Antikörperfärbung (C-J) von adulten Wildtyp- (A,C,E,H,J) und Ear2^{-/-}- (B,D,F,G,I) Gehirnen. Die dichtgepackten Zellen des dorsalen LC (I) sind beim homozygoten Ear2-defizienten Tier (J) vollständig verschwunden (B,D,F rote Pfeile), Zellen des ventralen Bereichs sehen bei Wildtyp (G) und Mutante (H) gleich aus. Gleichzeitig fehlen dem LC von Ear2^{-/-}-Tieren Projektionen im medialen und ventralen Bereich (D, schwarze Pfeile) A-F Vergrößerung 40X.

3.3.4 Die Noradrenergen Zentren A1, 2, 3, 4, 5, 7 sind in *Ear2*^{-/-}-Mäusen unverändert

Der LC ist nur ein Kern des Noradrenergen Systems des Zentralnervensystems, welches sich aus insgesamt sieben Nuklei - vom caudal nach rostral mit A1-A7 bezeichnet - zusammensetzt (Benninghoff, 1985). Auch die Zellen dieser Gruppen entstehen teilweise zeitgleich aus *Ear2*-positiven Regionen, wie z.B. die Gruppe A5 und Locus subcoeruleus, die aus dem caudalen *Rhombencephalon* entstehen (Morin et al., 1997; Pattyn et al., 2000b), in dem *Ear2* zwischen E9-10.5 stark exprimiert ist. Da auch andere in die Ausbildung des noradrenergen Systems involvierte Gene die Bildung mehrerer oder aller Zentren beeinflussen

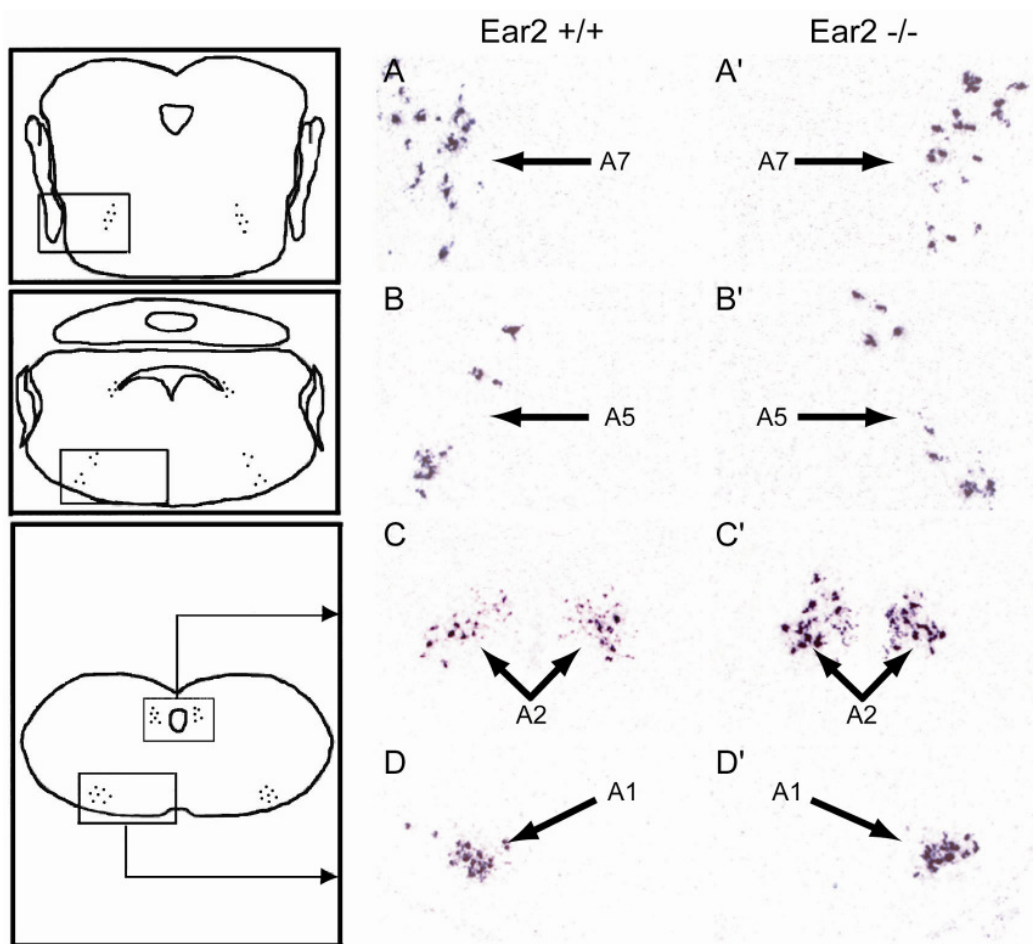


Abb.3.12 Noradrenerge Zentren in Wildtyp und *Ear2*^{-/-} : *In situ*-Hybridisierung von *Dopamin β-Hydroxylase* auf transversen Schnitten durch den Hirnstamm von Wildtyp-Mäusen (A-D) und homozygoten *Ear2*-Mutanten (A'-D') bei E18.5. Dargestellt sind die noradrenergen Zellgruppen A7 (A,A'), A5 (B,B'), A2 (C,C') und A1 (D,D'). Die *DBH*-Expression ist in allen Gruppen gleich. Die Zeichnungen auf der linken Seite zeigen schematisch die Lokalisation der *DBH*-positiven Zellen der jeweiligen Gruppe als schwarze Punkte, die Rahmen geben Ausschnitt und Größe an.

(Pattyn et al., 2000a; Pattyn et al., 2000b; Qian et al., 2001), wurden wegen der starken Reduktion des LC alle Nuklei des noradrenergen Systems bei *Ear2*-defizienten Tieren im Hinblick auf eine allgemeine Veränderung untersucht. Untersuchungen an Gehirnen verschiedenen Alters, beginnend bei E14.5, einem Zeitpunkt, an dem auch die Zellen der A1 und A2 Gruppe bereits gebildet sind, zeigen jedoch, dass ausschließlich Zellen des LC von der Reduktion betroffen sind.

Die Gruppen A1 und A2 im Hirnstamm sowie die Gruppen A5 und L. subcoeloreus (A7) im Bereich um den LC in der Pons weisen auf mit *DBH*-hybridisierten Schnitten weder am Embryonaltag 14.5 (Daten nicht gezeigt) noch E18.5 (Abb.3.12) morphologischen Veränderungen auf. Es liegt weder eine Reduktion der Zellzahl noch eine Veränderung der Verteilung vor.

3.3.5 Der LC ist über den gesamten LC-Entwicklungszeitraum reduziert

Das Fehlen der Subpopulation im adulten LC wirft die Frage auf, ob diese Zellen bereits zu Beginn der LC-Entwicklung nicht angelegt werden oder im Laufe ihrer Migration z.B. durch Zelltod verloren gehen. Dafür wurde die Anlage des *Locus coeruleus* in den Embryonalstadien 14.5 (Abb.3.13A-A'') und 18.5 (Abb.3.13B-B'') anhand der Expression von *TH*, *DBH* und *Phox2a* (Pattyn et al., 2000a), sowie der weiterentwickelte LC im Postnatalstadium 7 (P7) (Abb.3.13C-C'') anhand der LC-Gene *DBH* und *TH* untersucht. Die Markierung der Zellen mit *DBH* zeigt eine Reduzierung des LC in allen untersuchten Stadien. Die fehlenden Zellen scheinen überwiegend aus der in 3.3.3 beschriebenen Population im zentralen caudalen Bereich des LC zu stammen.

Außerdem wurde die Gesamtzellzahl des LC von E14.5 bis ins adulte Stadium anhand von *DBH*-hybridisierten sagittalen Schnitten bestimmt. Zellzählungen dieser Schnitte des gesamten LC ergaben: Die Zellzahl beträgt in *Ear2*^{-/-}-Mäusen bereits bei E14.5 mit 285±/33 LC-Zellen nur etwa ein Drittel der bei Wildtyp Tieren gleichen Wurfes gezählten (789±/34) (bereinigt nach Abercrombie (1946)). Der Unterschied bleibt während der Postnatalentwicklung - trotz Zunahme der Zellen insgesamt - bestehen (bei P7 wurden 1328±/45 *DBH*-positive Zellen in Wildtyp und 463 ±/21 in *Ear2*^{-/-}-Mäusen gezählt).

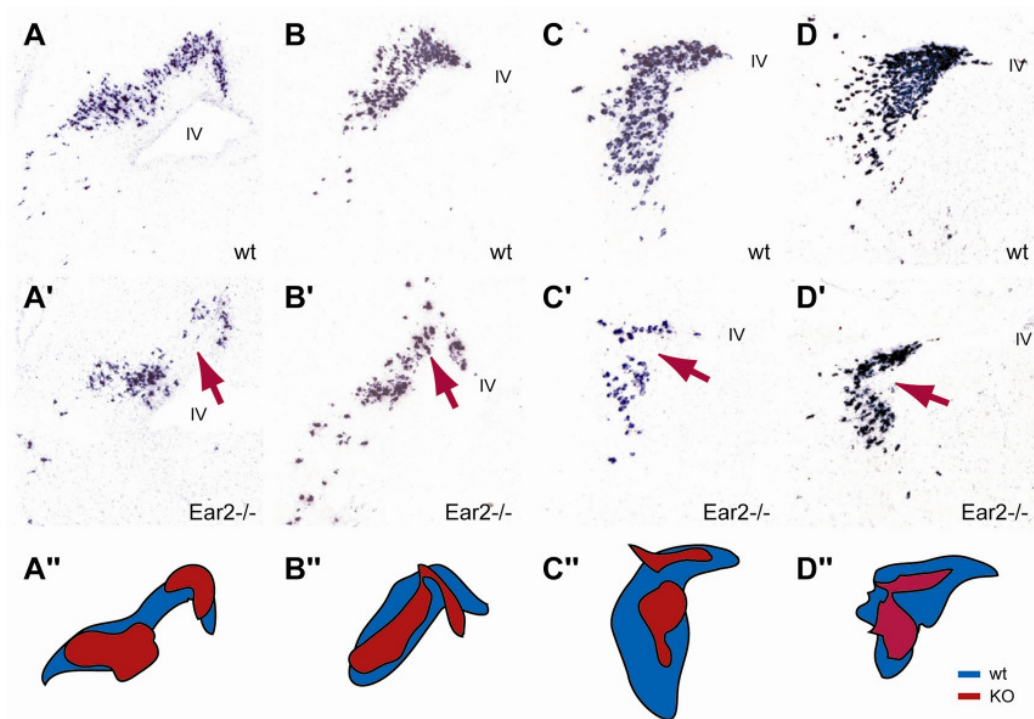


Abb.3.13: Die Subpopulation des zentralen dorsalen LC fehlt bei Ear2^{-/-} während der gesamten Entwicklung *In situ*-Hybridisierung von sagittalen Wildtyp- (A-D) und Ear2^{-/-}- Schnitten (A'-D') mit *DBH*. Die Alterstufen der Tiere sind E14.5 (A,A'), E18.5 (B,B'), P7 (C,C') und P56 (D,D'). Die Zellzahl ist in jedem Stadium im zentralen LC reduziert (rote Pfeile), die Schemata (A''=E14.5, B''=E18.5, C''=P7, D''=P56) geben eine Übersicht über die Ausdehnung des Wildtyp- (blau) im Vergleich zum Ear2^{-/-}-LC. IV= Vierter Ventrikel

Für eine genauere Untersuchung der Subgruppen des sich entwickelnden LC wurden neben den bekannten LC-Markern *TH*, *DBH* und *Phox2a* weitere Marker benötigt. Mit Hilfe der Expressionsdatenbank GenePaint (Visel et al., 2004) konnten drei neue LC-markierende Gene für E14.5 gefunden werden: *DDC* (*Dopa decarboxylase*), *FGF13* (*Fibroblast growth factor13*) und *Lix1* (*Limb expression1*). Alle drei markieren Subpopulationen des LC. *DDC* markiert Zellen des zentralen dorsalen LC (Abb.14D) und zeigt eine hohe Reduktion in Ear2^{-/-} (Abb.3.14D'). *FGF13* markiert neben den zentro-dorsalen Zellen auch Zellen des ventralen Bereichs (Abb.3.14E), die bei Ear2^{-/-}-Embryonen noch vorhanden sind (Abb.3.14E'). *Lix1* markiert eine kleine Zellgruppe am dorsalen Ende des LC, die in Ear2^{-/-} unverändert bleibt (Abb.3.14F+F'). Die Untersuchungen mit diesen neuen und den bereits bekannten Markern zeigen, dass die zentralen caudalen Zellen in Ear2^{-/-}-Mäusen bereits im Embryonalstadium 14.5 fehlt, die Reduktion also zu einem früheren Zeitpunkt stattfinden muss.

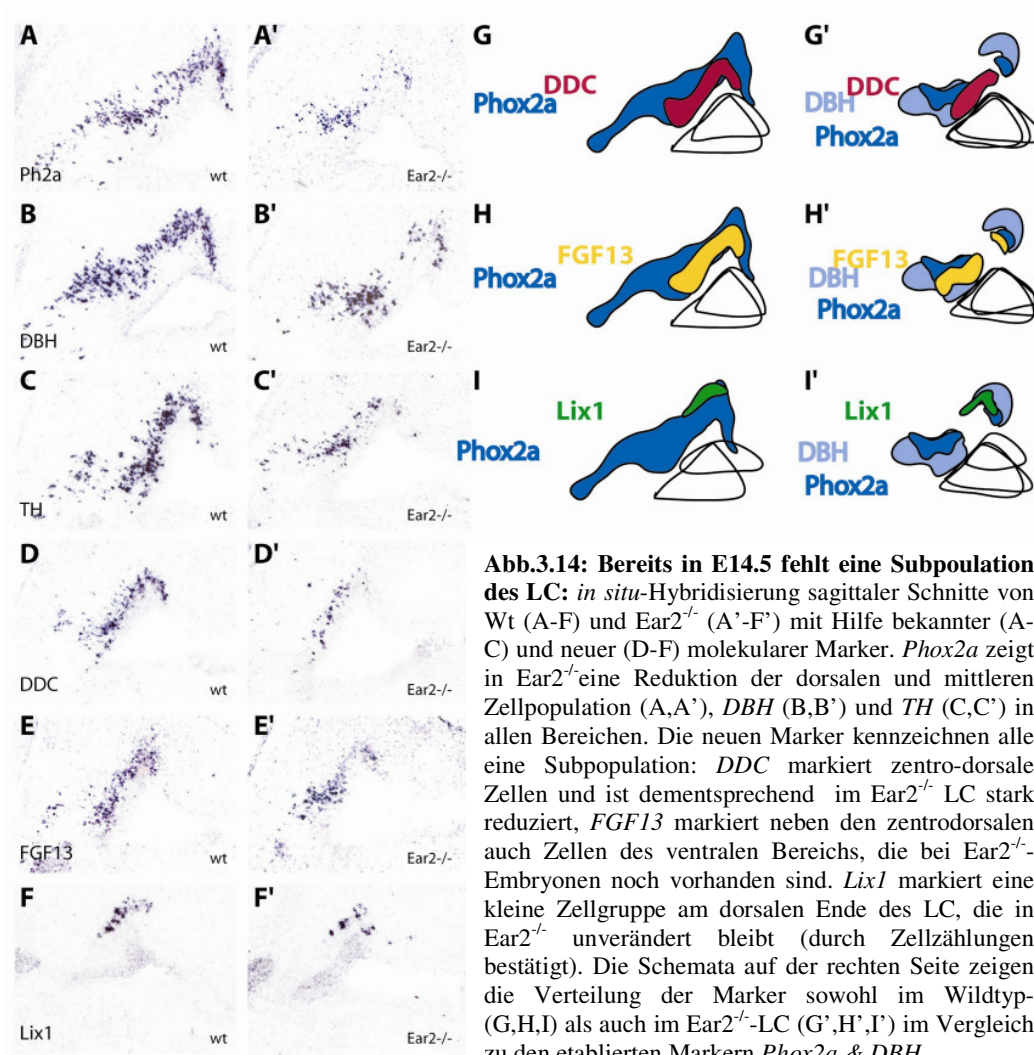


Abb.3.14: Bereits in E14.5 fehlt eine Subpopulation des LC: *in situ*-Hybridisierung sagittaler Schnitte von Wt (A-F) und Ear2^{-/-} (A'-F') mit Hilfe bekannter (A-C) und neuer (D-F) molekularer Marker. *Phox2a* zeigt in Ear2^{-/-} eine Reduktion der dorsalen und mittleren Zellpopulation (A,A'), *DBH* (B,B') und *TH* (C,C') in allen Bereichen. Die neuen Marker kennzeichnen alle eine Subpopulation: *DDC* markiert zentro-dorsale Zellen und ist dementsprechend im Ear2^{-/-} LC stark reduziert, *FGF13* markiert neben den zentrodorsalen auch Zellen des ventralen Bereichs, die bei Ear2^{-/-}-Embryonen noch vorhanden sind. *Lix1* markiert eine kleine Zellgruppe am dorsalen Ende des LC, die in Ear2^{-/-} unverändert bleibt (durch Zellzählungen bestätigt). Die Schemata auf der rechten Seite zeigen die Verteilung der Marker sowohl im Wildtyp- (G,H,I) als auch im Ear2^{-/-}-LC (G',H',I') im Vergleich zu den etablierten Markern *Phox2a* & *DBH*.

3.3.6 Ear2 in der LC-Entwicklungskaskade

Das Expressionsmuster von *Ear2* im *Rhombencephalon* legt eine frühe Funktion von *Ear2* in der Bildung der LC-Vorläuferzellen nahe. Eine drastische Reduktion des LC konnte bereits im Stadium E14.5 beobachtet werden (Abb.3.14). Deshalb wurde die Rolle von *Ear2* zu Beginn der LC-Bildung auf die Gene der LC-Signalkaskade untersucht. Dafür wurde die LC-Anlage in homozygoten Mutanten zu dem Zeitpunkt untersucht, an dem die Expression des ersten Differenzierungsgens der LC Signalkaskade, *Phox2a*, initiiert wird (E9,5 & (Pattyn et al., 2000a)). Dies ist der früheste Zeitpunkt, an dem die Geburt von LC Neuronen beschrieben werden konnte (Taber Pierce, 1972).

Whole mount in situ-Hybridisierungen von E9.5-10.5 Embryonen mit den frühen Genen der Signalkaskade (siehe Abb.1.5) zeigten für *Mash1*, welches zeitlich vor *Phox2a* und *Phox2b* agiert, in homozygoten Mutanten unveränderte Expression (Abb.3.15A und A'). Die zeitlich nachgeschaltet von *Mash1* agierenden Gene *Phox2a* und das durch *Phox2a* aktivierte *Phox2b* weisen jedoch eine fast vollständige Reduktion in der Expression auf (Abb.3.15B und B' sowie C und C'). *Phox2a* ist zu diesem Zeitpunkt im Wildtyp schon in zahlreichen Zellen der LC-Anlage exprimiert (Abb.3.15B), in *Ear2*^{-/-} jedoch nur in einigen Zellen (Abb.3.15B' Pfeil). Ebenso deutlich ist die Situation, für das zeitlich nachgeschaltet von *Phox2a* exprimierte *Phox2b*. Von der Expression in zahlreichen Zellen der Wildtyp-LC-Anlage (Abb.3.15C), verbleibt nur eine in einer handvoll Zellen (Abb.3.15C'). *DBH*, welches zeitlich nachgeschaltet von *Phox2b* in bereits differenzierten LC-Zellen exprimiert ist (Pattyn et al., 2000a), zeigt bei *Ear2*^{-/-}-Embryonen die wie bei *Phox2a* und *2b* beschriebene Zellreduktion in der LC-Anlage, vor allem im dorsalen Bereich (Daten nicht gezeigt).

Der Transkriptionsfaktor *Rnx* wirkt in einer bisher nicht bekannten Seitenkaskade auf *DBH* in LC-Zellen. *Rnx*^{-/-}-Embryonen zeigen in LC-Zellen keine *DBH*-Expression jedoch *Phox2a* und *2b*-Expression (Qian et al., 2001). Auch die Expression von *Rnx* in *Ear2*-defizienten Embryonen ist stark verändert (Abb.3.15D+D'). Zum einen ist die Expression im Vergleich zum Wildtyp in weniger Zellen des LC vorhanden, zum anderen ist *Rnx* darüberhinaus aber auch in Zellen exprimiert, die im Wildtyp-Embryo keine *Rnx*-Expression aufweisen. Dies sind Zellen, die aus dem Bereich der rostralen LC-Anlage in dorsaler cranialer Migration ins *Mesencephalon* abwandern (Abb.3.15D' Pfeil).

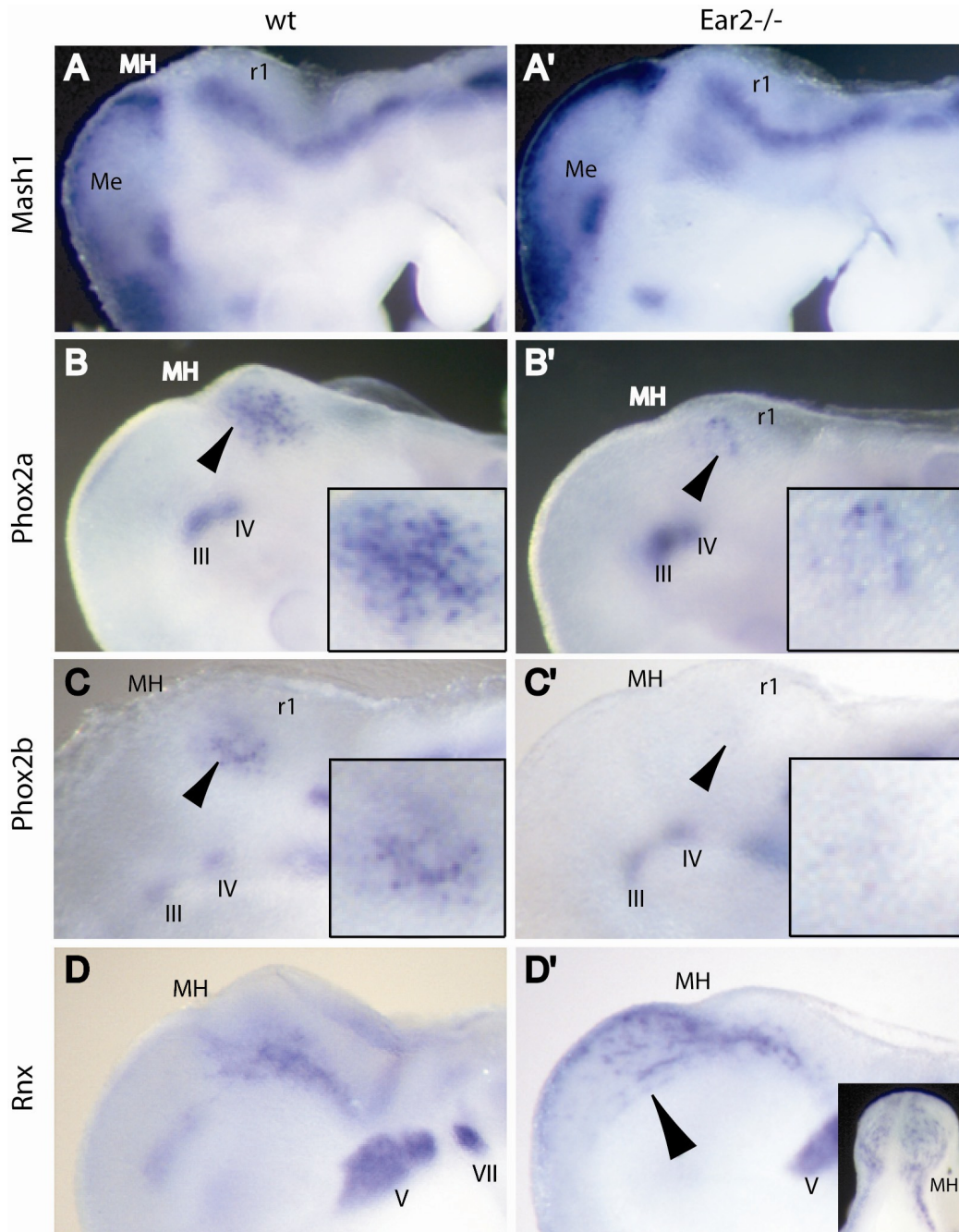


Abb.3.15: Expression von Genen der LC-Signalkaskade auf Ear2^{-/-}- und Wildtyp-Embryonen: whole mount *in situ*-Hybridisierung von E9.5 Wt- (A-D) und Ear2^{-/-}- (A-D') Embryonen mit den Genen der LC-Signalkaskade *Mash1*, *Phox2a*, *Phox2b* und *Rnx*. *Mash1*, das erste Gen in der Signalkaskade ist unverändert (A,A'), während die *Mash1*-regulierten Gene *Phox2a* (B,B') und *Phox2b* (C,C') im Bereich der *Locus coeruleus*-Anlage (Pfeil) fast vollständig reduziert sind. Man beachte die unveränderte *Phox2a* und *2b* Expression in den Ganglien des III und IV cranialen Nervs. Der in einer Seitenkaskade auf *DBH* und *TH* einwirkende Transkriptionsfaktor *Rnx* zeigt eine deutlich veränderte Expression (D,D'). In Ear2^{-/-}-Embryonen sind Zellen zu erkennen, die von der MH ins *Mesencephalon* abwandern (Pfeil), während die Expression in den Ganglien gleich bleibt. Me=Mesencephalon, MH=Mittel-Hinterhirngrenze, r1=Rhombomer1, III=Nucleus oculomotoris, IV=Nucleus trochlearis, V=Nucleus trigeminalis; VII=Nucleus facialis. Vergrößerung 80-fach

3.3.7 Ear2^{-/-} Mäuse zeigen eine veränderte circadiane Rhythmik

Es wurde gezeigt, dass komplexe Kreisläufe neuronale Zentren, die Wachheit, Aufmerksamkeit und den Schlaf-Wach-Zyklus steuern, mit dem circadianen System vernetzen (Aston-Jones et al., 2001; Krout et al., 2002; Legoratti-Sanchez et al., 1989; Vrang et al., 2003). Die Abwesenheit einer großen Population von LC-Neuronen in Ear2^{-/-}-Mäusen (Abb.3.9), welche in die hypothalamische Region projizieren (Loughlin et al., 1986b), in der sich der zentrale circadiane Zeitgeber des *suprachiasmatischen Nucleus* (SCN) befindet, veranlasste zur Untersuchung der Funktionalität der circadianen Uhr in diesen Tieren.

Die folgenden Experimente wurden in Zusammenarbeit mit Dr.Henrik Oster durchgeführt.

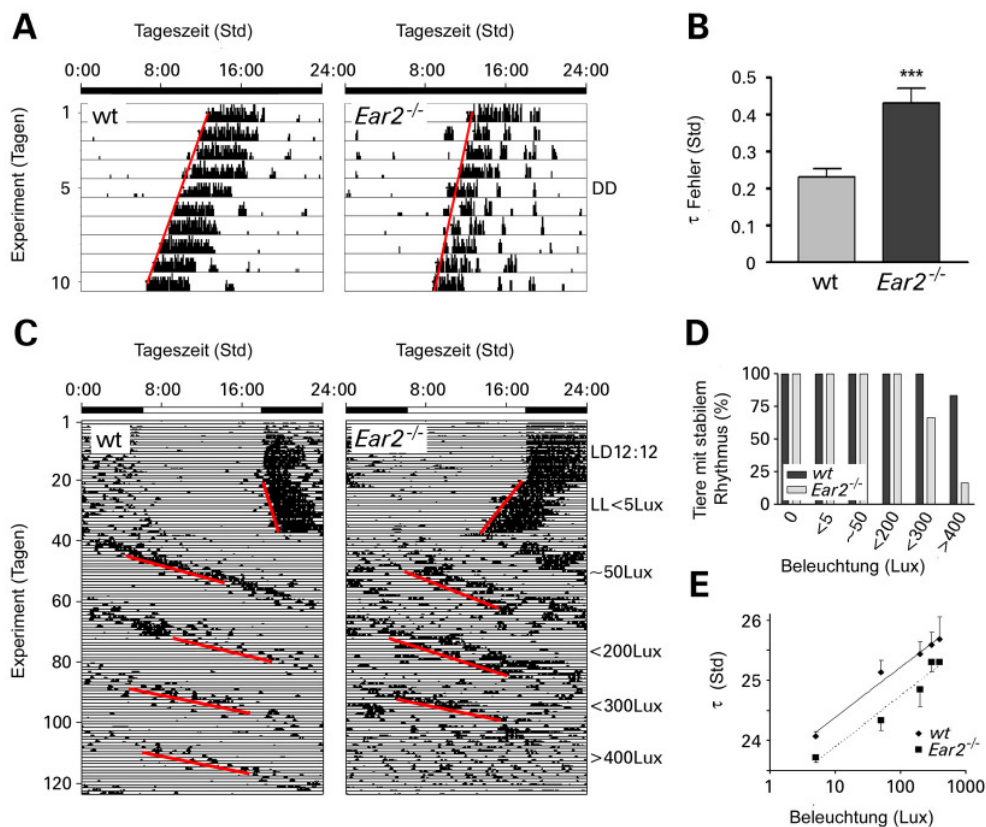


Abb.3.16: Ear2^{-/-}-Mäuse besitzen eine deutlich geringere circadiane Rhythmusstabilität

Typische Beispiele für Aktivitätsmessungen von Wt- und Ear2^{-/-}-Tieren in DD (A) und Langzeitexperimenten mit unterschiedlichen Lichtintensitäten in LL (B). Ear2^{-/-}-Tiere zeigen diffuse Aktivitätsbeginne in Aktogrammen (A) im Vergleich zu Wt-Tieren; der Fehler der Periodenlängen ist erhöht (B). In LL zeigen Ear2^{-/-} deutlich kürzere Periodenlängen als Wt-Tiere (C). In Experimenten, in denen die circadiane Uhr durch konstantes Licht verschiedener Intensitäten erhöhtem Streß ausgesetzt wird, werden Ear2^{-/-}-Tiere deutlich eher arrhythmisch als Wt-Vergleichstiere (C,D). Die Periodenlänge der Aktivität ist bei Ear2^{-/-} signifikant kürzer, sinkt allerdings in der gleichen Rate wie bei Wt-Tieren (E). N_{wt}=12; N_{Ear2^{-/-}}= 12; ***= P<0,001; τ = Periodenlänge.

Ear2-Mutanten zeigten eine normale Anpassung an einen 12h Licht/ 12h Dunkel (LD) Zyklus mit einem Phasenwinkel des Tagesaktivitätsbeginns, d.h. Winkel zwischen Lot und Regressionslinie (rote Linie in 3.16 A und C) entsprechend dem von Wildtyp-Mäusen des gleichen Wurfs (Abb.3.16C und Daten nicht gezeigt).

In konstanter Dunkelheit (DD) zeigten sowohl Wildtyp- als auch *Ear2*-defiziente Tiere einen stabilen endogenen Rhythmus mit Periodenlängen von $23,6 \pm 0,2$ beziehungsweise $23,7 \pm 0,4$ Stunden. Die Stabilität des täglichen Aktivitätbeginns (*onsets*) war jedoch in *Ear2*-defizienten Tieren stark reduziert (Abb.3.16A), d.h. Variabilität des aufeinander folgenden Tagesaktivitätsbeginnes in Relation zur Regressionslinie war in *Ear2*^{-/-} fast verdoppelt im Vergleich zu Wildtypkontrollen des gleichen Experimentes (Abb.3.16B). Diese verringerte Rhythmusexaktheit wurde unter verschiedenen Lichtbedingungen (LD und konstantem Licht verschiedener Intensität (LL)) beibehalten (Daten nicht gezeigt).

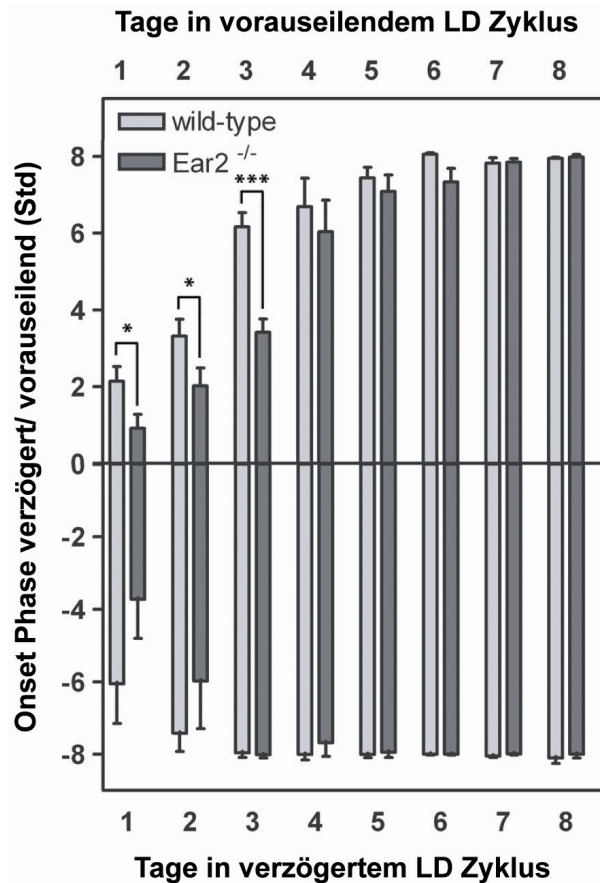


Abb.3.17: Die circadiane Uhr von *Ear2*^{-/-}-Mäusen zeigt eine längere Adaptionzeit nach einem künstliche „Jet Lag“. *Ear2*^{-/-}-Mäuse brauchen eine längere Adaptionzeit bei Lichtpulsen in verkürztem Licht/Dunkel Zyklus, als auch verzögertem Licht/Dunkel Zyklus.

*= P<0,05; ***= P<0,001; N_{wt} =12; N_{*Ear2*^{-/-}} = 12.

Um zu untersuchen, ob die Fähigkeit der circadianen Uhr in Bezug auf Rücksetzung als Reaktion auf Phasen verschiebende Stimuli vorhanden ist, wurden die Tiere zu kurzen (15min) nächtlichen Lichtpulsen und, zur Simulation einer artifiziellen „*Jet Lag*“-Situation, verlagerten LD Zyklen (8h nach vorne/ nach hinten) ausgesetzt.

Akute Phasenverschiebungen nach einem kurzen nächtlichen Lichtpuls waren normal in *Ear2*-Mutanten (Daten nicht gezeigt), während die Kinetik des *Reentrainments* zu verlagerten LD-Zyklen (*Jet Lag*) in der Abwesenheit von *Ear2* erniedrigt waren (Abb.3.17). In 8h nach vorne verlagerten LD-Zyklen zeigten *Ear2*^{-/-}-Mäuse eine signifikant längere Anpassungszeit als Wt-Vergleichstiere, bei nach hinten verlagerten LD-Zyklen eine gerade nicht signifikant veränderte Anpassung (Abb.3.17). Dieser subtile circadiane Phänotyp unter Training- und Freilaufbedingungen gab Anlass, die Uhrfunktion unter stringenteren Konditionen zu untersuchen.

Setzt man nachtaktive Tiere konstanten Lichtbedingungen aus, so wirkt dies als Stressfaktor auf den circadianen Oszillator, der letztendlich bei hohen Lichtintensitäten mit Arrhythmizität reagiert (Aschoff, 1979). Deshalb wurden Wildtyp-Tiere und Mutanten wachsenden Intensitäten konstanten Lichts ausgesetzt und die Stabilität sowie Periodenlänge der Laufradaktivität bestimmt. Aschoff's Regel (Aschoff, 1955) folgend zeigen beide Genotypen erhöhte interne Periodenlängen (τ) proportional zum Logarithmus der jeweiligen Lichtintensität (Lux). In *Ear2* Mutanten waren die τ -Werte bei bestimmten Lichtintensitäten allerdings signifikant kürzer als in Wildtyp-Tieren (Abb.3.16E). Hinzu kommt, dass die Rhythmusstabilität *Ear2*-defizienter Mäuse in LL schwerwiegend reduziert war. Einige Tiere verloren die Rhythmizität bereits bei Lichtintensitäten unter 300 Lux (Abb.3.16C, rechtes Bild, und 3.16D), die meisten wurden erst über 400 Lux arrhythmisch. Im Gegensatz dazu behielt die große Mehrheit der Wildtyp-Tiere bei allen getesteten Lichtintensitäten einen stabilen Laufradrythmus (Abb.3.16C, linkes Bild und 3.16D).

3.3.8 *Ear2*^{-/-}-Mäuse zeigen veränderte Nozizeption

Es ist bekannt, dass der LC eine wichtige Funktion im nozizeptiven System besitzt (Willis, 1995) und Schmerz einen modalitätsspezifisches Ausschüttungsmuster von inhibitorischen Neurotransmittern im LC auslöst (Singewald and Philippu, 1998). Fußschocks erhöhen die LC-Aktivität (Cedarbaum and Aghajanian, 1978), sowie dessen Umsatz und Metabolismus von Noradrenalin (Korf et al., 1973). Aufgrund dieser Einbindung in die Schmerzmodulation wurde eine Untersuchung der Schmerzempfindung von *Ear2*^{-/-}-Tieren anhand eines *Hot Plate*-Versuchs nach R.Wiley (siehe 2.8.3) und O'Callaghan (O'Callaghan and Holtzman, 1975) angeschlossen. In primären Experimenten wurde sowohl die Reaktion auf den primären

Schmerz untersucht, der als ein scharf lokalisierter Schmerz wahrgenommen und zumeist durch A δ -Fasern vermittelt wird, als auch in sekundären Experimenten der sekundäre Schmerz, der als dumpfer brennender Schmerz wahrgenommen und überwiegend durch C-Fasern vermittelt wird (Willis, 1995).

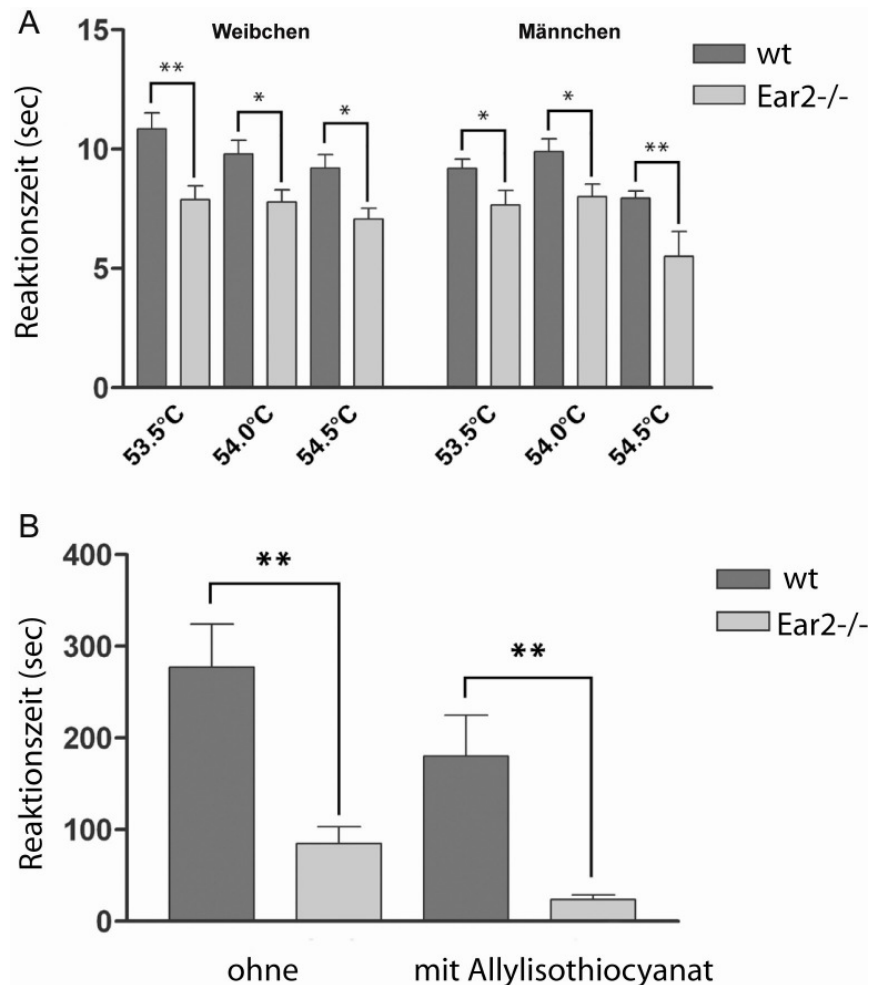


Abb.3.18: Ear2^{-/-}-Mäuse zeigen ein erhöhtes Schmerzempfinden:

A) primäre Nozizeptionsuntersuchungen mit Wt (n=10) und Ear2^{-/-}-Weibchen & Männchen (n=10) bei verschiedenen Temperaturen. Sowohl Ear2^{-/-}-Männchen, als auch Weibchen, zeigen eine schnellere Reaktionszeit als jeweilige Wildtyp-Tiere als Antwort auf *Hot Plate*-Reize. Diese erhöhte Schmerzempfindlichkeit kann bei verschiedenen Temperaturen in beiden Geschlechtern beobachtet werden. Ear2^{-/-}-Männchen weisen eine schnellere Reaktionszeit als Weibchen gleichen Genotyps auf. Statistische Auswertung anhand des Students *unpaired T-test*.

B) Ear2^{-/-}-Mäuse zeigen einen deutlichen Unterschied in der Nozizeption bei künstlicher Analgesie: Sekundäre Nozizeptionsuntersuchungen bei wt (n=10) und Ear2^{-/-}-Männchen (n= 9) gleichen Alters mit und ohne Senföl. Die Ear2^{-/-}-Tiere zeigen sowohl mit, als auch ohne Senföl eine Verkürzung der Reaktionszeit und vermehrte Reaktionen, mit Senföl eine weit stärkere Reduktion. Statistische Auswertung anhand eines *paired T-test*. * P>0,05; ** P>0,001

Zur Ermittlung des primären Schmerzes wurden jeweils beide Genotypen und Geschlechter in Gruppen zu jeweils 10 Tieren Temperaturen zwischen 53,5 und 54,5°C ausgesetzt und ihre Reaktionszeit auf den thermalen Reiz anhand der Verweilzeit auf der Hot Plate bis zur ersten Reaktion (Tatzenheben oder Fusslecken) bestimmt. Sowohl Ear2^{-/-}-Männchen als auch Weibchen zeigen bei allen Temperaturen eine signifikant schnellere Reaktionszeit als jeweilige Wildtypen gleichen Wurfes als Antwort auf die *Hot Plate* Reize (Abb.3.18A) mit deutlicher Verkürzung bei zunehmender Temperatur. Die Reaktionszeiten der Ear2-defizienten Tiere variieren jedoch zwischen Weibchen und Männchen erheblich. Ear2^{-/-}-Männchen zeigten eine deutlich kürze Reaktionszeit als Ear2^{-/-}-Weibchen (Abb.3.18A).

Anschließend wurden Nozizeptionsuntersuchungen zur Wahrnehmung des sekundären Schmerzes vorgenommen. Hierbei werden die Tiere niedrigeren Temperaturen (44°C) für einen längeren Zeitraum ausgesetzt und wiederum die Reaktionszeit auf den diesmal längeren thermalen Reiz bestimmt. Diese Untersuchungen wurden wegen der hohen Variationen zwischen den Geschlechtern nur mit Männchen vorgenommen und zeigten ebenfalls signifikante Unterschiede zwischen Wildtyp- und Ear2^{-/-}-Tieren (Abb.3.18B). Ear2-defiziente Tiere wiesen wesentlich kürzere Reaktionszeiten als Wildtyp-Kontrollmäuse sowohl mit, als auch ohne den Einsatz von Allylthiocyanat (Senföl) auf (Abb.3.18B), jedoch verstärken sich die ohne Senföl gezeigten Unterschiede durch die Erzeugung einer künstlichen Hyperalgesie (Überempfindlichkeit) nochmals enorm.

Sowohl primäre Schmerzempfindung, als auch die Reaktion auf unterschwellige lang andauernde Temperaturreize führen zu kürzeren Reaktionszeiten als bei gleichaltrigen Wildtyp-Tieren des gleichen Wurfes.

3.4 *Ear2* besitzt eine wichtige Funktion im Immunsystem

3.4.1 *Ear2* ist in embryonalem und adultem Thymus exprimiert

Ear2 ist im embryonalen Thymusgewebe bei E14.5 stark (Abb.3.19A) und E18.5 schwach (Daten nicht gezeigt) ubiquitär exprimiert. Auch im adulten Thymus konnten *Ear2*-Transkripte detektiert werden (Abb.3.19E). Vergleiche mit *COUP-TFI* und *Arp1* zeigen, dass diese in der Embryonalphase nicht im Thymusgewebe exprimiert sind (Abb.3.19B+C). Nur in einzelnen Inseln, vermutlich späteren Endothelzellen, zeigt sich Expression. Als Negativkontrolle diente die Hybridisierung von *Ear2* auf homozygoten *Ear2*-Mutanten (Abb.3.19A').

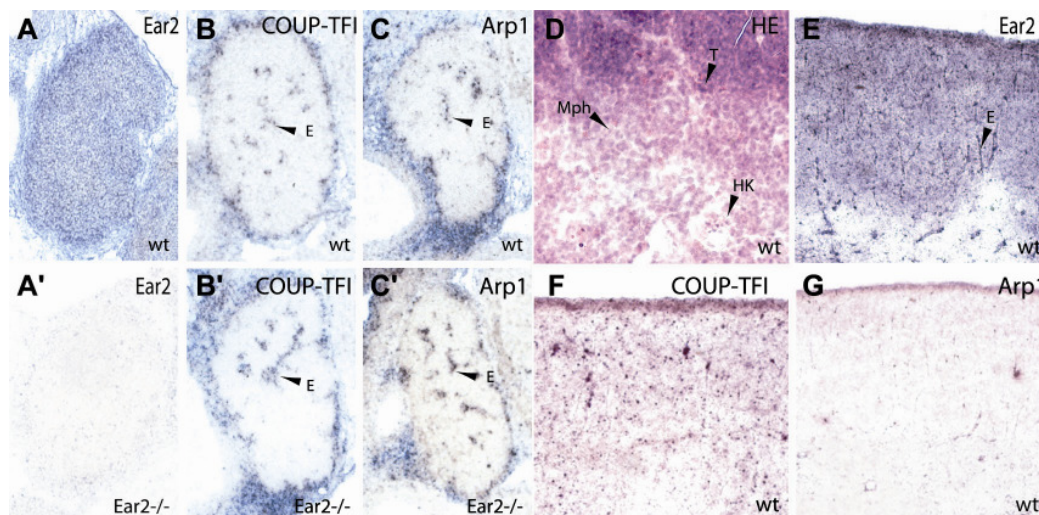


Abb.3.19: *Ear2*-, *COUP-TFI*- und *Arp1*-Expression in embryonalem (E14.5) und adultem Thymus.

In situ-Hybridisierung der drei *COUP-TFs* auf embryonalem E14.5 wt (A-C) und *Ear2*^{-/-} (A'-C'), sowie adultem wt Thymus (E-G). Eine HE-Färbung (D) zeigt die Differenzierung in verschiedene Zelltypen. A) *Ear2* ist ubiquitär über das gesamte Thymusgewebe verteilt B+C) *COUP-TFI* und *Arp1* wiesen ausschließlich Expression in endothelialen Inseln auf. B'+C') Unveränderte *COUP-TFI* und *Arp1* Expression auf *Ear2*^{-/-}. E=Endothelzellen, HK=Hasallsches Körperchen, Mph=Makrophage, T=Thymozyt.

Die prominente ubiquitäre Expression von *Ear2* lässt vermuten, dass es im sich entwickelnden Thymus eine Rolle spielt. Die beiden verwandten Gene *COUP-TFI* und *Arp1* weisen unveränderte Expression auf embryonalem Thymus von *Ear2*^{-/-}-Tieren auf (Abb.3.19B'+C'). Eine alleinige Funktion von *Ear2*, die nicht durch *COUP-TFI* oder *Arp1*

ausgeglichen werden kann, ist deshalb sehr wahrscheinlich. Im adulten Thymus, wo Thymozyten, Hassall'sche Körperchen, Epithelzellen und Makrophagen in HE-Färbung unterscheidbar sind (Abb.3.19D), ist *Ear2* mittelstark in den Thymozyten und sehr stark in Epithelzellen exprimiert. *Arp1*-Transkripte sind gar nicht, COUP-TF-Transkripte schwach in Thymozyten detektierbar.

3.4.2 Alte *Ear2*^{-/-}-Mäuse zeigen morphologische Veränderungen der Milz

Junge homozygote *Ear2*-defiziente Tiere wiesen keine morphologische Veränderung der lymphatischen Organe Thymus und Milz auf. Die Sektion ein Jahr alter *Ear2*^{-/-} und Wt-Weibchen zeigte jedoch, dass *Ear2*^{-/-}-Mäuse, sowohl unter sterilen Tierhausbedingungen, als auch in weniger keimfreien Haltungsbedingungen eine abnormale Milz entwickelten. Die Milz dieser Tiere ist kleiner und wiegt nur etwa die Hälfte einer Wildtyp-Milz. Eine frisch präparierte Wildtyp-Milz wiegt im Durchschnitt 0,16076 g, die der Mutante nur 0,0756g (Abb.3.20B). Des Weiteren besitzt sie eine andere Struktur als die Wildtyp-Vergleichsmilz. Alte *Ear2*^{-/-}-Milzen sind leicht durchscheinend und von weißen Kügelchen durchzogen (Abb.3.20A untere Milz). Histologische Untersuchungen anhand von sagittalen Schnitten ergaben, dass die Milz *Ear2*-defizienter Tiere vergrößerte Follikel mit zahlreichen kleinen Zellen aufweist (Abb.3.20C und D). Diese Zellen sind von kleiner runder Gestalt und besitzen einen großen Zellkern, wie ihn normalerweise B-Zellen besitzen (Abb.3.01D). Das normalerweise vorherrschende Stromagewebe der roten Pulpa ist fast vollständig verschwunden, die Milz besteht fast ausschließlich aus den großen Follikeln (Abb.3.20C). FACS-Analysen 6 Wochen alter Tiere zeigten keine Abnormalitäten der Zellpopulationen (Daten nicht gezeigt). In MLRs (Multiple Lymphozyten Reaktion) konnten jedoch für *Ear2*^{-/-}-T-Zellen wesentlich höhere Proliferationsraten als die gleichaltriger Kontrollzellen detektiert werden (Daten nicht gezeigt).

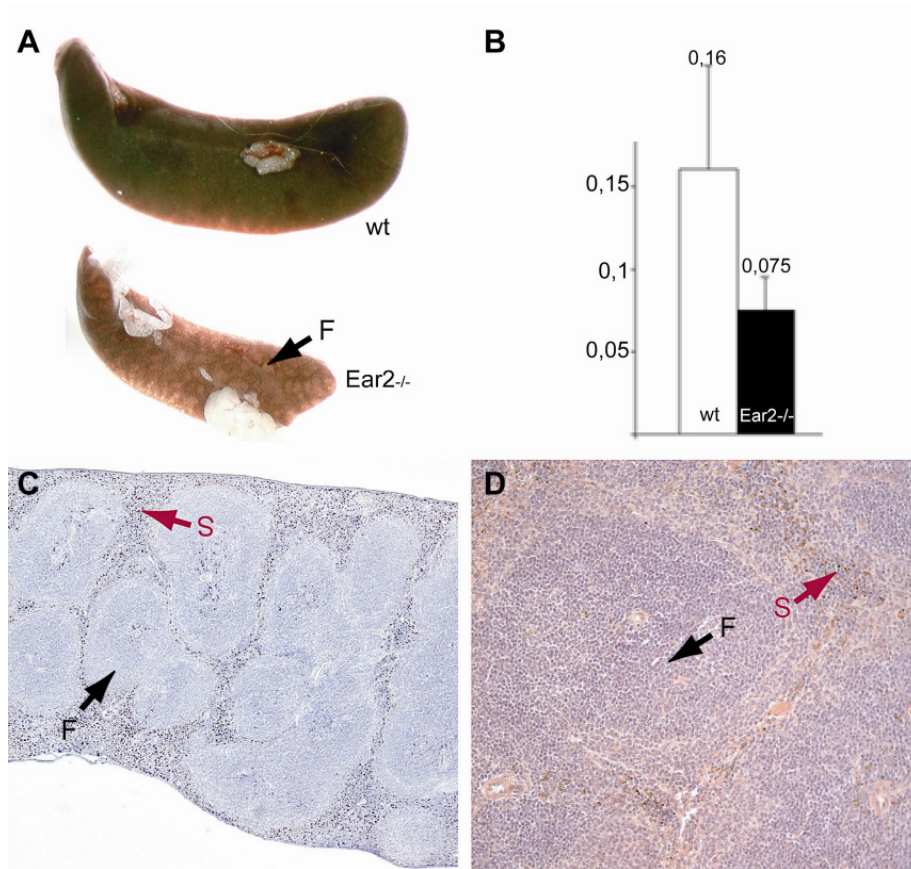


Abb.3..20: Milz von alten Wildtyp und Ear2^{-/-}-Tieren präpariert und geschnitten.

A) Die Milz älterer Ear2^{-/-}- und Wildtyp-Tiere **B)** Gewicht von Wt- und Ear2^{-/-}-Milz in Gramm, N=6 **C)** Nissl-gefärbte Ear2^{-/-}-Milz 10-fach, **D)** HE-gefärbte Ear2^{-/-}-Milz 20-fach F=Follikel; S=Stromazelle
Die Milz Ear2-defizienter Tiere ist stark in Größe/Gewicht und Struktur verändert (A,B). Histologische mit verschiedenen Techniken angefärbte Schnitte zeigen eine überwiegend aus Follikeln bestehende Milz.

4 DISKUSSION

Die hier beschriebene homozygote *Ear2*-Mutation ist embryonal nicht lethal. Eine Mendelsche Entmischung des mutierten Allels konnte nicht detektiert werden. In homozygoten Mäusen ist kein *Ear2*-Transkript detektierbar. Homozygote Tiere zeigen ein normales Reproduktionsverhalten mit geringfügig veringertem Reproduktionsrate und weisen keinen offensichtlichen abnormalen Phänotyp auf. Dies steht im Kontrast zu den embryonal und postnatal lethalen Phänotypen von COUP-TFI und Arp1 (Pereira et al., 1999; Qiu et al., 1997), ermöglicht aber erstmalig funktionelle Untersuchungen eines Mitglieds der COUP-TF Familie am adulten Organismus.

4.1 *Ear2* und die Entwicklung des Locus coeruleus

4.1.1 *Ear2* wird für die Bildung des *Locus coeruleus* benötigt

Vorangegangene Untersuchungen lieferten bisher nur geringe Hinweise auf eine Rolle von *Ear2* im ZNS. So wurde unter anderem die Bildung von *Ear2*/ Arp1 Heterodimeren an Gehirnproteinen (Avram et al., 1999) sowie die Regulation eines Neurotransmittergens in der Ratte durch *Ear2* (Chew et al., 1999) beschrieben.

Die in der Expressionsanalyse beobachtete frühe Expression von *Ear2* im *Rhombencephalon* wurde als Hinweis auf eine wichtige Rolle in der Entwicklung dieses Gehirnbereichs gedeutet, zumal in der Region der rostralen Rhombischen Lippe des r1 keine Coexpression von *Ear2* mit anderen COUP-TFs vorliegt. Untersuchungen zu Morphologie und korrekter Expression der rhombomerspezifischen Marker *Krox20*, *HoxB1* (Marshall et al., 1994; Sham et al., 1993) sowie dem Marker für die Rhombische Lippe *Math1* (Lee and Jessell, 1999) zeigten, wie bei COUP-TFI^{-/-}, keine Veränderungen (Qiu, 1994) und weisen auf eine normale Ausbildung und Identität der Segmente in *Ear2*^{-/-}-Embryonen hin. Da auch die Untersuchung

der aus den Rhombomeren entstehenden cranialen Nerven, die durch Deletion von COUP-TFI aberrante Verzweigungen ausbilden (Qiu, 1994), in *Ear2*-Mutanten normal entwickelt sind, weisen damit trotz der segmentspezifischen Expression von *Ear2* alle Untersuchungen auf eine normale Metamerie hin.

Ear2 zeigt besonders starke Expression im Rhombomer1, und LacZ-Färbungen weisen eine hohe Anzahl *Ear2*-positiver Zellen auf, die aus diesem Bereich migrieren. Durch die Stabilität der β -Galaktosidase ist es möglich, auch ehemals *Ear2*-exprimierende Zellen auf ihrem Migrationsweg zu verfolgen. Da in der rostralen Rhombischen Lippe des Rhombomer1 Vorläuferneuronen zahlreicher pontiner Nuklei und die Körnerzellen des Cerebellums entstehen (Wingate and Hatten, 1999), wurden erwachsene Wildtyp- und *Ear2*^{-/-}-Gehirne auf Veränderungen in Cerebellum und Nuklei des Mittelhirns und Rhombencephalons untersucht. Die Vergleiche adulter Nissl-gefärbter Wildtyp und *Ear2*^{-/-} Gehirne weisen jedoch ein morphologisch unauffälliges *Cerebellum* sowie alle Nuklei im Bereich der *Medulla*, *Pons* und *Mesencephalon* auf. Lediglich der am Boden des Vierten Ventrikels ausgebildete *Locus coeruleus* ist deutlich verkleinert. Auch die Expression des frühen molekularen Markers der cerebellaren Körnerzellen, *Math1* (Lee and Jessell, 1999), ist auf *Ear2*^{-/-} unverändert. Die durch die Deletion von *Ear2* hervorgerufene morphologische Veränderung scheint sich dementsprechend auf die Vorläuferzellen des LC zu beschränken.

Ear2-Expression ist auch im caudalen *Rhombencephalon* und Rückenmark zu finden und überlappt so mit den Entstehungsbereichen anderer noradrenerger Zellpopulationen (Morin et al., 1997; Pattyn et al., 2000a; Qian et al., 2001). Somit konnte eine Beeinträchtigung der Bildung anderer Zentren, wie der *Rnx*-defizienten Maus (Qian et al., 2001), in der alle noradrenergen Zentren betroffen sind, nicht ausgeschlossen werden. Jedoch konnten wie bei *Phox2a*-defizienten Tieren (Morin et al., 1997) auch bei *Ear2*^{-/-}-Tieren keine morphologischen Veränderungen festgestellt werden. Dies könnte zum einen bedeuten, dass *Ear2* ausschließlich für die korrekte Bildung des *Locus coeruleus* notwendig ist oder aber eine Redundanz von COUP-TFI und *Arp1* vorliegt, die ebenfalls starke Expression in den Rhombomeren 2-8 aufweisen (Tsai and Tsai, 1997) und die bei Abwesenheit von *Ear2* dessen Funktion übernehmen und somit die normale Ausbildung ermöglichen.

4.1.2 Neuroanatomische Untersuchungen des adulten *Ear2*^{-/-} LC

Neuroanatomische Untersuchungen der coronal und sagittal geschnittenen LCs homozygoter *Ear2*-defizienter Tiere zeigten sowohl anhand von Nissl-Färbungen als auch anhand der mit den LC-Markern *TH*, *DBH* (Goridis and Rohrer, 2002) sowie dem neu entdeckten Marker *FGFR1* hybridisierten Schnitten eine drastische Reduktion des LC. Durch den Vergleich unabhängiger Methoden und mehrerer Marker konnte eine ausschließliche Veränderung der

Zellen bezüglich der Expression ihrer Neurotransmitter weitgehend ausgeschlossen werden, jedoch nicht bezüglich einer Expressionsveränderung der neben Noradrenalin in LC-Neuronen enthaltenen NPY oder Vasopressin (Caffe et al., 1985; Everitt et al., 1984).

Die dreidimensionale Ausbreitung des LC in einer Rekonstruktion zeigt, dass vor allem Zellen des zentralen und dorsalen posterioren LC-Bereichs fast vollständig verschwunden sind, während Zellen des ventralen Bereichs keine Reduktion aufweisen. Zwar kann eine grundsätzliche Veränderung der ventralen LC-Zellen nicht ausgeschlossen werden, ist aber aufgrund der Zellmorphologie, die mit der von ventralen Wildtyp-LC-Zellen übereinstimmt, eher unwahrscheinlich. Die quantitative Analyse anhand der Zellzählungen TH-positiver LC-Neurone nach Swanson (1976) zeigt, dass im adulten Stadium insgesamt 70% der Zellen fehlen. TH-Färbungen zeigen überdies, dass im Mutanten-LC die fusiformen dichtgepackten Zellen im dorsalen LC (Swanson, 1976) vollständig verschwunden sind und Teilbereiche des dorsalen LC durch wenige zerstreute Zellen des multipolaren Typs besiedelt sind, während die großen multipolaren, weniger dicht gepackten Zellen des ventralen LC (Swanson, 1976) verbleiben. Zusammengenommen lässt sich konstatieren, dass der Wegfall von *Ear2* eine drastische Reduktion der LC-Zellen insgesamt zur Folge hat.

Die Analyse der LC-Projektionen anhand von TH-Antikörperfärbung, welche neben dem Zellsoma auch die Dendriten und Axone sichtbar macht, weist, entsprechend der hohen reduzierten Zellzahl, eine deutlich reduzierte Zahl von neuronalen Verbindungen auf.

Nach den Ergebnissen anderer Gruppen, welche die Zellen des LC im Hinblick auf ihre überwiegenden Projektionsziele weiter unterteilen (Loughlin et al., 1986a; Loughlin et al., 1986b), fehlen in *Ear2*^{-/-} die kleinen runden Zellen im zentralen frontalen Bereich, die, außer einigen wenigen multipolaren Zellen im anterioren LC, als einzige LC-Zellen zum *Hypothalamus* projizieren (Loughlin et al., 1986b). Daraus resultierend zeigen Zielgebiete im *Hypothalamus* eine Beeinträchtigung, wie die Untersuchungen zum im *Hypothalamus* gelegenen circadianen Schrittmacher des Suprachiasmatischen Nukleus zeigen. Da auch die Zellpopulation im dorsalen ipsilateralen Bereich, die zum *cerebralen Cortex* projizieren (Waterhouse et al., 1983), starke Reduktionen aufweisen, sind auch funktionelle Beeinträchtigungen dieses Bereichs zu erwarten.

Dies kann mithilfe von Zählungen der Varikositäten, dies sind lokale Verdickungen der Axone zur synaptischen Transmission, im *cerebralen Cortex* validiert werden. Am geeignetsten hierfür ist eine DBH-Antikörperfärbung, da hier im Gegensatz zu TH Signale von dopaminergen Neuronen ausgeschlossen werden können (siehe auch Abb.1.7B). TH-Färbungen konnten aus diesem Grund bisher keine zufrieden stellenden Ergebnisse liefern.

Da die meisten Neurone des LC aufgrund ihrer Projektionen (Aston-Jones, 1995; Loughlin et al., 1986a; Loughlin et al., 1986b) und nicht ausschließlich aufgrund ihrer Zellmorphologie unterteilt werden können, könnten Experimente mit neuronalen Transportern, die nach Injektion in eine Ausgangszelle entlang der Axone und transsynaptisch transportiert werden und so die Zielzellen markieren, weitere Subpopulationen und Beeinträchtigungen von Projektionszielen identifizieren. Anhand dieser Ergebnisse könnten dann auch genauere Aussagen über die fehlenden Projektionen vor allem in den von anderen Neurotransmittern wie Dopamin und Serotonin überlagerten Zielgebieten getroffen werden.

4.1.3 Untersuchung des LC anhand bekannter und neuer Markergene

Zur Untersuchung verschiedener Subpopulationen in einer frühen Entwicklung des LC um E14.5 wurden vor allem im Hinblick auf das Fehlen einiger Subpopulationen aus GenePaint.org (Visel et al., 2004) und Literatur Kandidaten für Markergene ausgewählt und ihre Expression auf Wildtyp und *Ear2^{-/-}*-Embryonen verglichen. Diese molekularen Marker stellen ein wichtiges Werkzeug zur Charakterisierung der verschiedenen in der Entwicklung befindlichen, noch migrierenden Subpopulationen dar, für die bisher keine weiteren außer den bekannten Markern *Phox2a*, *DBH* und *TH* zur Verfügung standen. Außerdem bieten sie die Möglichkeit die Zellen unabhängig von ihren Neurotransmittern zu untersuchen. *DDC* (*dopa decarboxylase*) und *FGF13* (*fibroblast growth factor 13*) markieren eine Subpopulation im zentralen Bereich, *Lix1* (*Limb expression1*) im dorsalen Bereich. Alle Marker (*DDC*, *FGF13*, *DBH*, *Phox2a*, *TH*) zeigten eine Reduktion im zentralen LC-Bereich. *Lix1*, welches Zellen im dorsalen caudalen LC markiert, weist unveränderte Zellzahlen auf. Dies zeigt, dass bereits in diesem frühen Stadium die kompakten Zellen im zentrodorsalen LC (Swanson, 1976) nicht mehr vorhanden sind, Zellen anderer Bereiche jedoch vollständig erhalten bleiben. Es bestätigt zusätzlich, dass die Ursache für das Fehlen der Zellen direkt bei der Entstehung zu suchen ist. Aber auch die Tatsache, dass mit verschiedenen Markern unterschiedliche Bereiche angefärbt werden können, verdeutlicht die Heterogenität der LC-Zellen bereits im Stadium der Entwicklung (Brunet and Pattyn, 2002).

Neben der Nutzung als Marker gibt die Expression neuer Gene im LC auch gleichzeitig Hinweise auf neue Kandidaten-Gene, die eine Funktion in Differenzierungs- oder Syntheseprozessen der LC-Neuronen besitzen könnten.

DDC ist ein Enzym, das in die Synthese der Neurotransmitter Dopamin und Serotonin involviert ist, indem es L-DOPA decarboxyliert (Christenson et al., 1972). Damit steht es in

der Synthesekette zwischen TH und DBH. Erstaunlicherweise wurde es bisher nicht als Marker früher LC-Neuronen in der Literatur beschrieben. Völlig unerwartet ist die Expression von FGF13. FGFs sind Liganden, die Fibroblasten und epitheliale Zellen zum Wachstum stimulieren (Amaya et al., 1991; Deng et al., 1994; Feldman et al., 1995). *FGF13* ist im ZNS der Maus weit gestreut und spezifisch in hohem Maße im Rückenmark, Mittelhirn und *Cortex* in differenzierenden migrierenden Zellen exprimiert, welche die proliferierende Zellschicht des Neuroepitheliums verlassen haben (Hartung et al., 1997). Für das humane Homolog konnte neben der Expression in fetalem und adultem Gehirn, mit starker Expression in *Cerebellum* und *Cortex*, nachgewiesen werden, dass es *in vitro* die Anzahl und den Grad der phenotypischen Differenzierung corticaler Neuronen erhöht (Greene et al., 1998). Die hohe Expression in differenzierenden LC-Neuronen könnte auf eine ähnliche Auswirkung in Neuronen dieses Typs hinweisen.

Der dritte neue Marker, *Lix1*, ist ein in unserer Arbeitsgruppe isoliertes Gen unbekannter Funktion mit Homologen in Mensch, Huhn und Drosophila (Swindell et al., 2001). Expression wurde bisher in den Beinanlagen, *Rhombencephalon* und *Substantia nigra* beschrieben (Moeller et al., 2002). Berücksichtigt man die Expression in der *Substantia nigra*, so könnte es eine Funktion in der Differenzierung dopaminerger und noradrenerger Neuronen besitzen.

4.1.4 Einordnung von Ear2 in die LC-Signalkaskade

Es konnte gezeigt werden, dass die Expression der für die Entwicklung des LC bekannten Transkriptionsfaktoren bei *Ear2^{-/-}*-Embryonen drastisch verändert ist. Das in der Vorläuferregion der LC-Anlage exprimierte *Mash1* zeigt allerdings in allen untersuchten Embryonalstadien (E8-11) unveränderte Expression. Somit scheint die Signalkaskade und damit die Induktion durch BMPs (Guo et al., 1999; Vogel-Hopker and Rohrer, 2002) bis hierhin normal zu verlaufen, wenn auch die *Ear2*-Expression zum Zeitpunkt der BMP-Funktion in der rostralen Rhombischen Lippe des Rhombomer1 um E8.5 für eine deutlich früher anzusiedelnde Funktion von *Ear2* spricht. Erst die zeitlich nach *Mash1* agierenden in postmitotischen LC-Vorläuferzellen exprimierten Gene *Phox2a* und *Phox2b* (Goridis and Rohrer, 2002) werden durch das Fehlen von *Ear2* verändert exprimiert. Beide sind in homozygot *Ear2*-defizienten Tieren nur noch in einer Handvoll Zellen in einem Teil der LC-Anlage exprimiert, *Phox2b* in noch weniger Zellen als *Phox2a*. Zu einem späteren Zeitpunkt (E10.5) sind nur wenige *DBH*-positive Zellen im ventralen Bereich der LC-Anlage zu erkennen.

Da die Signalkaskade erst bei *Phox2a* drastisch verändert ist, spricht dies für Probleme bei der Differenzierung der Vorläuferzellen. Dies hieße, dass die Zellen zwar gebildet wurden, aber keine Differenzierung durchlaufen und infolgedessen *Phox2a* nicht exprimieren (Morin et al., 1997; Pattyn et al., 2000a; Pattyn et al., 1997). *Phox2a* wird nur in einer kleinen Subpopulation exprimiert. Entweder wird Ear2 für die Differenzierung dieser Zellen nicht benötigt, weil diese z.B. zu einem späteren Zeitpunkt stattfindet oder die Funktion bei Abwesenheit von Ear2 von einem anderen Gen, z.B. COUP-TF übernommen wird. Wie neuroanatomische Untersuchungen und Zellzählungen späterer Stadien zeigten, differenzieren sich die *Phox2a*-positiven Zellen anschließend normal und zeigen keine Veränderung der Proliferationsrate.

Bei Annahme einer linearen Signalkaskade Mash1>Phox2a>Phox2b>DBH/TH (Brunet and Pattyn, 2002; Goridis and Rohrer, 2002) (siehe Abb.4.1A) muss die Funktion von Ear2 aufgrund unveränderter Mash1-Expression während der Mash1-Expression oder kurz danach, jedoch vor der Expression der Phox-Gene angesiedelt sein.

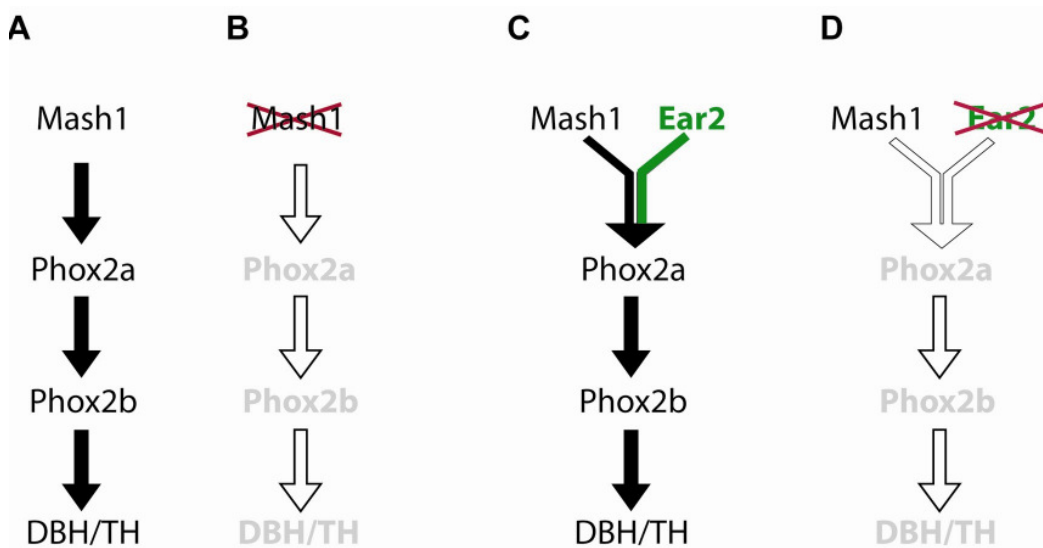


Abb. 4.1 Eingliederung von Ear2 in die LC-Signalkaskade

A) Bisher bekannte Signalkaskade: Mash1, Phox2a und 2b wirken in einer linearen Kaskade (Brunet and Pattyn, 2002). B) Situation in Mash1^{-/-}-Embryonen: bei Deletion von Mash1 werden Phox2a, Phox2b und DBH sowie TH nicht mehr exprimiert. C) Erweiterte Signalkaskade nach Experimenten mit Ear2^{-/-}-Embryonen. Ear2 aktiviert zusammen mit Mash1 die Expression des LC-Neuronen differenzierenden Transkriptionsfaktors Phox2a. Phox2a aktiviert Phox2b, welches wiederum die Expression der typischen noradrenergen Schlüsselenzyme TH und DBH aktiviert.

D) Gestörte Expressionskaskade in Ear2^{-/-}-Embryonen. Durch den Wegfall von Ear2 kann Mash1 allein die Phox2a-Expression nicht mehr aktivieren, die restliche Kaskade wird gestört exprimiert.

Möglicherweise ist Ear2 zu Beginn der Mash1-Aktivität als Coaktivator von Mash1 notwendig, um die Expression von Phox2a zu aktivieren, das dann wiederum die Phox2b-

Expression induziert (Abb.4.1C), ähnlich der Funktion von Mash1 im „Determinantenmodell“ (Bertrand et al., 2002). Beim Fehlen von Ear2 wird zwar noch Mash1 exprimiert, die Expression der folgenden Transkriptionsfaktoren unterbleibt jedoch (Abb.4.1D) und zeigt damit ähnlich drastische Auswirkungen wie die Ausschaltung von Mash1 (Abb.4.1B) (Hirsch et al., 1998). Allerdings bleiben in Ear2-defizienten Tieren noch einige Phox2a exprimierende Zellen bestehen, die ihrem Schicksal durch das Fehlen von Ear2 entkommen können. Wie oben erwähnt könnte für diese Zellen keine Ear2-Expression notwendig sein oder die Funktion bei Ausfall von Ear2 von einem anderen Gen übernommen werden. Die gleichzeitig veränderte Rnx-Expression weist darauf hin, dass Ear2 neben seiner Coaktivatorfunktion vermutlich gleichzeitig die Expression des Transkriptionsfaktors Rnx unterdrückt. Dieser scheint für die Aktivierung von DBH und TH verantwortlich zu sein, da bei Ausfall die Expression von DBH nicht aber die von Phox2a und Phox2b verändert ist (Qian et al., 2001). Seine Funktion und Stellung innerhalb der LC-Entwicklungskaskade ist jedoch noch ungeklärt. Da eine höhere Expression von DBH und TH in Ear2^{-/-}-Embryonen unterbleibt, scheint bei den zusätzlich Rnx exprimierenden Zellen, die aus dem Rhombomer1 abwandern, eine grundsätzliche Veränderung der Identität vorzuliegen.

4.1.5 Verbleib der fehlenden LC-Zellen

Entwicklungsgeschichtlich gehen die Vorläuferzellen dieses Kerns in einer Hauptentwicklungsphase um Embryonaltag 8.5-9 (Vogel-Hopker and Rohrer, 2002) aus der rostralen Rhombischen Lippe des Rhombomer1 hervor (Guo et al., 1999; Lin et al., 2001), einer Region, in welcher *Ear2* in hohem Maße exprimiert ist. Doppel-Färbungen von *Ear2* mit dem frühesten Marker der Vorläuferzellen, dem Transkriptionsfaktor Phox2a (Pattyn et al., 2000a), zeigen eine Überlappung der Expressionsmuster in der LC-Anlage im Rhombomer 1. Die ehemals *Ear2*-exprimierenden Zellen können anhand von Färbung des LacZ-Reporterkonstrukts einer Ear2^{+LacZ}-Maus auf ihrer cranio-ventralen Migration verfolgt werden und weisen den gleichen Migrationsweg wie den für die LC-Vorläuferzellen beschriebenen (Lin et al., 2001) auf. Allerdings migrieren zu diesem Zeitpunkt viele LacZ-positive Zellen von der rostralen rhombischen Lippe in ventrale Richtung, so dass eine Einzelidentifizierung nicht möglich ist. Mit DBH hybridisierte Embryonen weisen jedoch bereits im Embryonaltag 10.5, dem frühesten Zeitpunkt, an dem die LC Anlage mit diesem Marker sichtbar gemacht werden kann (Morin et al., 1997), eine starke Reduktion der LC-Anlage auf.

Doch was geschieht mit den in der LC-Anlage fehlenden Zellen? Folgende Möglichkeiten sollen nun anhand der Ergebnisse diskutiert werden:

1. Sie werden gar nicht gebildet.
2. Sie werden zwar gebildet, aber differenzieren sich nicht.
3. Sie werden zwar gebildet, aber differenzieren sich durch fehlende/veränderte Positionsinformationen zu anderen Neuronentypen.

1. Die Zellen des LC werden gar nicht erst gebildet.

Wenn LC-Neurone gar nicht entstehen, müsste dies bereits zu einem frühen Zeitpunkt im Bereich des Rhombomer1 zu erkennen sein. Da diese Zellen, falls Ear2 eine direkte Funktion auf sie ausübt, vorher Ear2 exprimiert haben, sollten LacZ-Färbungen heterozygoter und homozygoter Embryonen im Bereich des Rhombomer1 Unterschiede in der Anzahl LacZ-positiver Zellen aufweisen. Von Embryonaltag 9 bis 11 sind jedoch keine offensichtlichen Unterschiede in der Anzahl Ear2-positiver Zellen im Rhombomer 1 zu erkennen. Allerdings kann nicht vollständig ausgeschlossen werden, dass keine Zellen fehlen, da die Gesamtzahl der LC-Vorläuferzellen sehr gering ist, aber zahlreiche andere LacZ-positive Zellen im Rhombomer1 ventral migrieren. Die Ergebnisse mit potentiellen Interaktionspartnern aus der LC-Signalkaskade sprechen jedoch dafür, dass die LC-Vorläuferzellen angelegt werden, aber in der weiteren Entwicklung fehlgeleitet werden.

2. Sie werden zwar gebildet, aber differenzieren sich nicht.

Wenn die normalerweise Phox2a-positiven Zellen nicht fehlen, ist die wahrscheinlichste Möglichkeit, dass sie keiner Differenzierung unterliegen. Ein Charakteristikum in der Differenzierung befindlicher Neuronen ist die Expression von Differenzierungsgenen, im Fall von LC-Neuronen *Phox2a* und *Phox2b*. Beide konnten jedoch in Ear2^{-/-}-Embryonen nur in einigen wenigen Zellen in der LC-Anlage nachgewiesen werden, die sich dann, wie die Untersuchungen adulter Gehirne zeigen, zu noradrenergen LC-Zellen entwickeln. Da die anderen Zellen das für die Differenzierung aller noradrenergen Zellen notwendige Phox2b (Pattyn et al., 2000b) und für den LC notwendige Phox2a (Morin et al., 1997) nicht exprimieren, differenzieren sie sich nicht zu LC-Zellen. Nissl-Färbungen adulter Gehirne zeigen jedoch keine zusätzlichen im LC vorhandenen Zellen, die weder TH noch DBH exprimieren. Dementsprechend müssen diese Zellen im adulten Stadium fehlen. Um ausschließen zu können, dass diese Zellen gebildet werden und zu einem späteren Zeitpunkt Apoptose unterliegen und um die Entwicklung der LC-Vorläuferzellen zu verfolgen, wurde der LC verschiedener Entwicklungsstadien mit Hilfe des Markers *DBH* untersucht, der während der gesamten Entwicklung deutlich und ausschließlich in LC-Zellen exprimiert ist

(Goridis and Rohrer, 2002). Zellzählungen ergaben, dass das Verhältnis der Zellzahl von Wildtyp und Mutante in allen Altersstadien gleich ist. Dies spricht für eine normale Proliferation der Zellen und gegen erhöhte Apoptose, zumindest nach E14.5. Ob die Zellen zu einem frühen Stadium verstärkt Apoptose unterliegen, kann jedoch aufgrund des losen Arrangements in frühen Embryonen nicht festgestellt werden (Pattyn et al., 2000a).

3. Sie werden zwar gebildet, aber differenzieren sich durch fehlende/veränderte Positionsinformationen zu anderen Neuronentypen.

LC-Vorläuferzellen könnten sich durch veränderte Positionsinformationen, z.B. einen veränderten BMP-Gradienten zu anderen Neuronentypen differenzieren. Damit wären sie durch noradrenerge Differenzierungsmarker nicht mehr nachweisbar und würden auf anderen Wegen in andere Zielgebiete migrieren. Es konnte gezeigt werden, dass es in frühen *Ear2*^{-/-}-Embryonen Zellen gibt, die von der RRL und Mittel-/Hinterhirn-Grenze vermehrt in andere Gehirnbereiche abwandern. Anscheinend haben sie ihre Identität geändert und exprimieren nun den Transkriptionsfaktor *Rnx*. Diese Untersuchungen legen nahe, dass durch das Fehlen von *Ear2* das Migrationsverhalten dieser Zellen verändert wird. Dies würde auch bedeuten, dass die charakteristische *Phox2a*-Expression unterbleibt, so wie sie in *Ear2*^{-/-}-Embryonen zu beobachten ist. Studien anderer Gruppen zeigen eine ähnliche Situation bei Embryonen, in denen die BMP-Signalisierung unterbleibt (Vogel-Hopker and Rohrer, 2002). Die Bildung der Zellen mit einer anschließend geänderten Entwicklung wird außerdem durch die bisherigen Erkenntnisse zur Bildung einzelner Subpopulationen gestützt. Während in Zebrafisch für die ersten *Phox2a*-exprimierenden Zellen eine dorsale Entstehung mit anschließender ventraler Migration nachgewiesen werden konnte (Guo et al., 1999) (siehe Abb. 3.8E grüne Pfeile), konnte im Huhn eine zusätzliche Gruppe von LC-Vorläufern nachwiesen werden (Lin et al., 2001), die dorsal als EGL-Vorläuferzellen entstehen, zunächst in dorsaler cranialer Richtung wandern und dann bei Erreichen des rostralen Endes des *Cerebellum*-Territoriums *Phox2a*-Expression induzieren und in ventrale Migration wechseln (Lin et al., 2001). Das Fehlen des dorsalen Teils in der frühen DBH markierten LC-Anlage um E10.5, spricht für den selektiven Ausfall einer Populationsentstehung: die *Rnx*-Expression auf *Ear2*^{-/-} lässt vermuten, dass eine Subpopulation durch Mißspezifikation in andere Bereiche migriert und darum im LC fehlt.

Zusammengenommen verdeutlichen die Untersuchungen zur Reduktion des Locus coeruleus die komplexe Ontogenese dieses aus verschiedenen Untereinheiten bestehenden Zentrums. Damit liefert diese Arbeit neben der Erweiterung der LC-Entwicklungsgene um einen neuen Mitspieler einen weiteren Beweis für die heterogene Entstehung und Zusammensetzung (Brunet and Pattyn, 2002) dieses wichtigen Zentrums des Zentralnervensystems.

4.2 Funktionelle Implikationen des reduzierten Locus coeruleus

4.2.1 Circadiane Uhr

In der vorliegenden Studie konnte gezeigt werden, dass die Reduktion des *Locus coeruleus* zu einer Beeinträchtigung der Rhythmusstabilität des circadianen Systems führt.

Der SCN ist Sitz des zentralen circadianen Schrittmachers der Säugetiere (Klein, 1991), durch den wichtige Körperfunktionen auf einen 24h Rhythmus synchronisiert werden. Dem *Locus coeruleus* wird als größte Neuronensammlung des Noradrenergen Systems und somit Hauptbildungszentrum von Noradrenalin im ZNS eine besondere Rolle im Erweckungssystem zugeschrieben (Jones, 2003). Ziel mehrerer Untersuchungen in den letzten Jahren war es darum, nach einer bereits elektrophysiologisch gezeigten bidirektionalen Verbindung (Legoratti-Sanchez et al., 1989) eine neuronale Verbindung zwischen beiden Zentren aufzuzeigen (Aston-Jones et al., 2001; Krout et al., 2002).

Der in den neuroanatomischen Untersuchungen festgestellte LC-Defekt bei *Ear2^{-/-}*-Tieren, der vor allem die zum *Hypothalamus* projizierenden Zellen betrifft, zog die Frage nach sich, ob *Ear2^{-/-}*-Tiere eine veränderte Funktion des circadianen Systems aufweisen und demzufolge bereits eine Reduktion der LC-Zellen und damit Reduktion ihrer Projektionen funktionelle Auswirkungen zeigt. Da homozygote *Ear2*-defiziente Mäuse im Gegensatz zu den bisherigen Mutanten mit verändertem LC (*Phox2a^{-/-}* und *Rnx^{-/-}*) überlebensfähig sind (Morin et al., 1997; Qian et al., 2001; Shirasawa et al., 2000), konnten erstmals nicht invasive funktionelle Studien an einem reduzierten LC vorgenommen werden.

Für die Untersuchung der circadianen Rhythmik wurde die Technik der Laufrad-Aktivitätsmessungen verwendet, die ein sehr zuverlässiges Verfahren zur Untersuchung der inneren Uhr darstellt (Albrecht and Oster, 2001). Ein direkter Defekt der circadianen Uhr im SCN konnte weitestgehend ausgeschlossen werden: *Ear2^{-/-}*-Tiere zeigten eine unter normalen Bedingungen funktionierende circadiane Uhr mit allerdings geringerer Rhythmusstabilität. Dies steht im Widerspruch zu Experimenten mit LC-Lesionen, die eine vollständige Arrhythmie zumindest bestimmter rhythmischer Verhaltensweisen LC-lesionierter Tiere beschreiben (Zamoshchina, 1997).

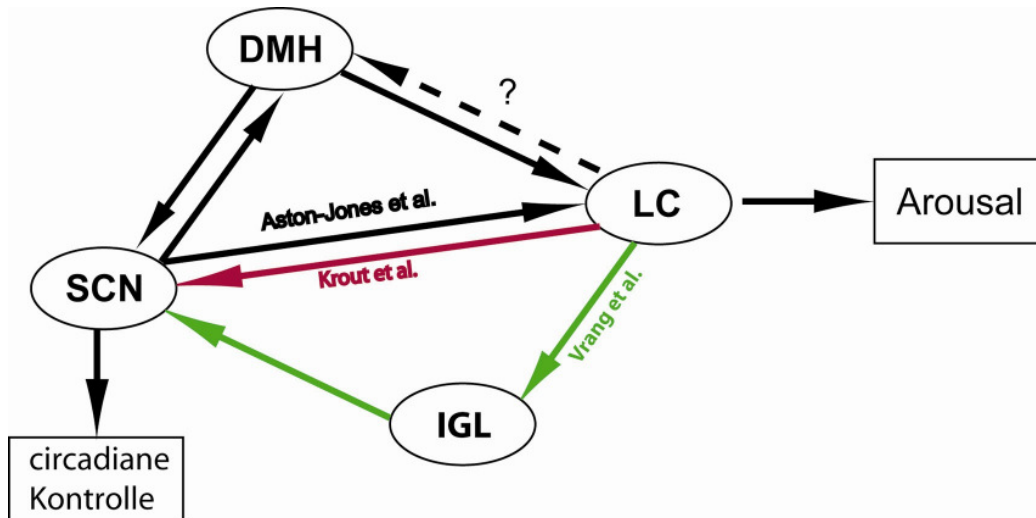


Abb. 4.2 Netz der Projektionen zwischen LC und SCN. In der Literatur wurden bisher im SCN zum DMH und LC projizierende Neurone, im DBH zum SCN und LC projizierende Neurone beschrieben Aston-Jones et al. (2001). Krout et al. (2002) konnten eine Projektion vom LC zum SCN nachweisen. Eine Verbindung vom LC zum DMH wurde bisher nicht beschrieben. Außerdem konnten Vrang et al. (2003) eine Verbindung von LC über das IGL zum SCN nachweisen.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit decken sich mit den Beobachtungen ihrer „Shamoperierten“ Kontrolltiere, d.h. Tiere mit einer Operation ohne Zerstörung des LC. Dies spricht für eine Beeinträchtigung des LC bereits durch Durchtrennung von Verbindungen. Allerdings wurde das Ausmaß der Läsionen nicht beschrieben, und bei $Ear2^{-/-}$ -Tieren ist auch nur ein Teil des LCs reduziert, so dass ein verminderter Effekt nicht auszuschließen ist.

In Experimenten, welche die Uhr in Stressbedingungen versetzen (Aschoff, 1979), konnte gezeigt werden, dass das circadiane System von $Ear2^{-/-}$ -Tieren einen erhöhten Hang zur Instabilität und Arrhythmizität besitzt. Das Fehlen von LC-Zellen führt zu einer zwar prinzipiell funktionierenden, aber anfälligeren circadianen Uhr. Eine Erklärung ist vermutlich in fehlenden bzw. verminderten Projektionen zu finden. Normalerweise werden die aus dem SCN kommenden Signale, vermutlich in indirekten Projektionen, über den Nucleus Paraventricularis und dorsomedialen Nucleus des Hypothalamus an das Erweckungssystem weitergeleitet (Aston-Jones et al., 2001; Buijs et al., 2003). Eine Rückkopplung, wie sie in Projektionsstudien (Krout et al., 2002) und elektrophysiologisch beschrieben wurde (Legoratti-Sanchez et al., 1989; Deboer et al., 2003), scheint jedoch gestört zu sein, so dass sie gar nicht oder zumindest verzögert stattfindet. Diese Annahme konnte durch „Jet Lag“-Experimente bestätigt werden. Generell findet eine Adaption an die Verschiebung bei $Ear2^{-/-}$ statt, jedoch wird sowohl bei vorausseilenden als auch verzögerten Zyklus eine längere Zeitspanne benötigt. Somit wird deutlich, dass bereits die Zerstörung der Mehrheit der LC-

Zellen und damit direkter oder indirekter Projektionen zwischen LC und SCN zu einer verlangsamten Adaptionsfähigkeit der circadianen Uhr führen kann.

Dass bei *Ear2^{-/-}*-Tieren die Modulation des circadianen System über den LC nicht stärker beeinträchtigt ist, könnte am Verbleib von Neuronen im LC liegen, die aufgrund der vielfältigen Projektionen, die Funktion der anderen zumindest teilweise übernehmen könnten. Die Innervierung des SCN durch andere Gruppen des noradrenergen Systems konnte bereits durch die Studien anderer Gruppen weitestgehend ausgeschlossen werden (Aston-Jones, 1995; Krout et al., 2002). Außerdem besteht die Möglichkeit, dass die Kommunikation zwischen SCN und Schlaf-Wach-System teilweise über die Nuclei anderer monoaminerger Systeme verläuft, für die bereits eine Beeinflussung des Schlaf-Wach-Systems nachgewiesen wurde. Diese Möglichkeit bestätigen u.a. Untersuchungen nach der Reduktion serotonerger Neuronen in medialen Teil der medianen *Raphe Nuclei*, von denen der SCN dichte serotonerge Innervationen erhält, die zu einer veränderten circadianen Rhythmik führen (Morin, 1999). Jedoch zeigten sich hier, anders als im Noradrenergen System von *Ear2^{-/-}*, Auswirkungen in einem früheren Beginn und späteren Ende der nächtlichen Aktivitätsphase, einer längeren Dauer der Aktivitätsphase und erhöhter Sensitivität der circadianen rhythmischen Antwort auf Licht (Morin, 1999).

Es konnte gezeigt werden, dass die durch *Ear2* verursachte Reduktion des *Locus coeruleus* zu Funktionsstörungen im circadianen System führt. Damit ist neben elektrophysiologischen (Legoratti-Sanchez et al., 1989), physiologischen (Deboer et al., 2003) und lesionsgestützten Untersuchungen (Zamoshchina, 1997) erstmalig ein genetischer Beweis der Verknüpfung von LC/ Erweckungssystem und SCN/ innerer Uhr anhand von in vivo Experimenten am LC-reduzierten, aber sonst intakten, Organismus erbracht.

Um eine direkte Beeinträchtigung der circadianen Uhr durch *Ear2* auszuschließen – *Ear2* ist schwach und ohne zyklische Schwankungen im SCN exprimiert – sollte in weiteren Experimenten die Expression typischer circadianer Gene, wie *Per1* oder *Cry2* im SCN analysiert werden. Außerdem wäre eine Untersuchung der (zyklischen) Expression dieser Gene im *Locus coeruleus* sinnvoll, um zu klären, ob der LC als periphere Uhr fungiert deren molekularer Mechanismus (z.B. negative Rückkopplung) in *Ear2^{-/-}*-Tieren beeinträchtigt ist. Desweiteren könnten Experimente zur nicht durch Licht induzierten Phasenverschiebung klären, ob nicht-photische Verbindungen über das *Intergeniculate Leaflet* für die Störungen der circadianen Rhythmusstabilität verantwortlich sind.

4.2.2 Schmerzempfinden

Es konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass die Reduktion des *Locus coeruleus* auch zu Beeinträchtigungen der Schmerzmodulation führt. Der *Locus coeruleus* leitet bei Schmerzstimuli in aufsteigenden Projektionen Signale an den *Thalamus* und *Cortex* weiter, wo dann unter Einbeziehung anderer Gehirnbereiche das Signal in ein Schmerzgefühl umgewandelt wird (Basbaum and Fields, 1978; Aston-Jones, 1995). Außerdem partizipiert er an der durch bilaterale noradrenerge, in absteigenden Bahnen ins Rückenmark verlaufenden (Clark and Proudfit, 1991; Proudfit and Clark, 1991) Projektionen vermittelten Inhibierung der spinalen nozizeptiven Übertragung (Ossipov et al., 1985). Deshalb wurde neben den bereits diskutierten Auswirkungen auf das circadiane System auch die Auswirkung der LC-Reduktion von *Ear2*^{-/-}-Mäusen auf die Schmerzempfindung untersucht. Für die Untersuchungen wurde die *Hot Plate*-Methode gewählt, da sie einen zuverlässigen Test für die auf höheren Ebenen integrierten Schmerzeffekte darstellt (Kieffer, 1999). Trotz des gemischten genetischen Hintergrunds der Versuchstiere konnte eindeutig gezeigt werden, dass bei *Ear2*^{-/-}-Mäusen die durch thermale Nozizeptoren wahrgenommene und anschließend durch A δ -Fasern vermittelte Schmerzempfindung in beiden Geschlechtern temperaturabhängig um bis zu 35% höher liegt als in Wildtyp-Kontrollen. Für homozygote *Ear2*-defiziente Männchen konnte außerdem gezeigt werden, dass auch die durch Polymodale Nozizeptoren wahrgenommene und anschließend durch langsam leitende unmyelinisierte C-Fasern vermittelte Schmerzempfindung drastisch – um bis zu 200% - erhöht ist. Künstliche entzündliche Hyperalgesie vermittelt durch Allylisothiozyanat verstärkt die Schmerzempfindung nochmals.

Normalerweise wird durch Aktivierung von LC-Neuronen Antinozizeption hervorgerufen. Die ins Rückenmark absteigenden noradrenergen, schmerzmodulierenden Projektionen entstammen zu 80% dem *Locus coeruleus* (Westlund et al., 1981; Westlund et al., 1982; Westlund et al., 1983), die anderen überwiegend dem Locus subcoeruleus (Westlund et al., 1981). Da *Ear2*^{-/-}-Mäusen 70% der LC-Zellen fehlen, war trotz intaktem L. subcoeruleus eine starke Beeinträchtigung der Nociceptionsmodulation zu erwarten. Da die durch C-Fasern vermittelte Schmerzempfindung stärker erhöht ist die durch α 2-Fasern vermittelte, deutet dies auf einen überwiegenden Verlust der Modulation von C-Fasern hin. Diese Beeinträchtigung des Systems kann sowohl durch die fehlenden Projektionen, als auch durch geringere Ausschüttung von Noradrenalin hervorgerufen werden, die durch Aktivierung von LC-Neuronen hervorgerufen wird (Jones, 1991; West et al., 1993). Frühere Untersuchungen konnten bereits nach bilateralen elektrothermischen Läsionen des LC und des umliegenden Gewebes zeigen, dass eine negative Korrelation von Noradrenalin im Lendenbereich des Rückenmarks zum Ausmaß der LC-Läsionsgröße vorliegt (Ossipov et al., 1985), wobei der

Noradrenalingehalt in verschiedenen Bereichen des Rückenmarks durch Lesionen um bis zu 70% reduziert werden kann (Karoum et al., 1980; Nygren and Olson, 1977). Da bei Lesionsstudien aber auch immer umliegendes Gewebe zerstört wird, können Nebeneffekte nicht vollständig ausgeschlossen werden. In *Ear2*-defizienten Tieren ist jedoch ausschließlich der LC reduziert, somit konnten Randeffekte, wie die Zerstörung von Projektionen anderer involvierter Nuklei ausgeschlossen und erstmalig nicht invasive funktionelle Untersuchungen vorgenommen werden.

Da bisher keine Messungen von Noradrenalin oder der synthetisierenden Enzyme in Cortex und Rückenmark vorgenommen wurden, könnten NA-Messungen in LC und Rückenmark Aufschluß geben, wieviel geringer die Produktion und Ausschüttung von NA in *Ear2*-defizienten Mäusen insgesamt ausfällt. Durch Messungen an den inhibitorischen Synapsen im dorsalen Horn des Rückenmarks könnte geklärt werden ob die Beeinträchtigung der Inhibition durch zu geringe NA-Gehalt an jeder Synapse begründet ist oder die Hauptursache in der geringeren Anzahl bzw. kompletten Ausfall der inhibitorischen noradrenergen Synapsen liegt, so dass weniger Synapsen moduliert werden oder die Schmerzmodulation nur über die anderen, weniger effektiven Neurotransmitter (Belcher et al., 1978; Engberg and Marshall, 1971) verläuft. Eine Verfolgung der noradrenergen Projektionen mit Hilfe neuronaler Reporter oder DBH-Antikörperfärbung könnte weiteren Aufschluss geben, wieviele Projektionen im Rückenmark fehlen. Da bisherige LC-Lesionsexperimente zur Untersuchung der Schmerzvermittlung auch einen erhöhten Noradrenalingehalt in Cortex und Mittelhirn nachweisen konnten (Hammond and Proudfit, 1980), sollten auch weitere Untersuchungen auf die Noradrenalinverteilung im Cortex und Mittelhirn von *Ear2*^{-/-}-Mäusen zielen. Somit könnte geklärt werden, ob die höhere Schmerzempfindung ausschließlich durch den Ausfall absteigender oder teilweise auch durch den Ausfall aufsteigender Verbindungen verursacht wird.

4.3 *Ear2* in der Lymphozytenentwicklung

Bisher gibt es in der Literatur keine Hinweise auf eine Funktion von *Ear2* oder eines anderen COUP-TFs im Immunsystem. Die in dieser Arbeit generierten Daten zeigen deshalb einen ganz neuen Funktionsbereich der COUP-TFs auf.

Zwar zeigen Northern Blot-Daten zur Expression von *Ear2* im adulten Thymus keine oder am Rande der Nachweisbarkeit vorhandene Expression in diesem Organ, die ISH von Schnitten aus adultem und embryonalem Thymusgewebe weisen jedoch eindeutig spezifische *Ear2*-Expression auf. Im embryonalen Thymus um E14.5, wenn die zwei Lappen in den vorderen

mittleren Brustkorbraum gewandert sind und durch Fusion den fetalen Thymus gebildet haben, ist *Ear2* als einziger COUP-TF Rezeptor in den unreifen Lymphozyten exprimiert, die aus der fetalen Leber stammen und sich zu diesem Zeitpunkt bereits zu DN-Zellen differenzieren (Surh, 1999). Zum Zeitpunkt der ersten reifen SP-Zellen, um E18, ist *Ear2* nur noch sehr schwach exprimiert.

Da auch die komparative Expressionsanalyse auf embryonalem Wildtyp- und *Ear2*^{-/-}-Thymus keine Veränderung der Expression von COUP-TFI und Arp1 zeigt, scheint *Ear2* zu diesem Zeitpunkt eine nicht redundante Funktion in der Thymusentwicklung zu besitzen. Der Thymus nimmt bei der Selektion von T-Zellen eine Monopolstellung ein (Sprent, 1993; Surh, 1999). Die Selektion von abwehrpotenten T-Zellen findet innerhalb der pubertären Postnatalzeit statt, anschließend verliert der Thymus seine Funktion und kann keine T-Zellen mehr herstellen (Sprent, 1993). Die Zeitskala der Expression von *Ear2* im sich entwickelnden Thymus deutet auf eine Funktion in der Thymozytendifferenzierung hin. Untersuchungen der im Thymus produzierten Lymphozyten weisen in FACS-Analysen allerdings keine Unterschiede in Anzahl und Verhältnis der *Ear2*-defizienten Zellen im Vergleich zu Wildtyp-Zellen auf. Alle Zellen werden somit in „normalem“ Verhältnis gebildet. Funktionelle Analysen anhand eines MLR, in dem Thymozyten durch körperfremde Antigene zur Proliferation stimuliert werden (Mangi and Kantor, 1975), zeigten jedoch signifikante Unterschiede. *Ear2*^{-/-}-Zellen sind so verändert, dass sie bei exogenen Reizen stärker proliferieren als Wildtypzellen. Dies zeigt eine veränderte Funktion bzw. Funktionstüchtigkeit der Thymozyten. *Ear2*^{-/-}-Tiere könnten demnach stärker von allergischen Überreaktionen betroffen sein, da sie auf körperfremde Reize hyperreagieren. Preliminäre vergleichende Untersuchungen von Tieren in reizarmer und reizstarker Umgebung konnten dies jedoch bisher nicht bestätigen. Es wurden keine äußeren allergischen Reaktionen beobachtet.

Morphologisch-anatomische Untersuchungen junger Wildtyp- und *Ear2*^{-/-}-Tiere zeigen keine äußerlichen Unterschiede in Thymus oder Milz. In einigen 4-5 Monate alten *Ear2*^{-/-}-Weibchen konnten jedoch morphologische Veränderungen der Milz in Größe und Erscheinung sowie vermehrt Nekrosen beobachtet werden. Bei einjährigen weiblichen Mäusen zeigen alle homozygoten Tiere eine veränderte geschrumpfte Milz. Sektionen weisen eine stark vergrößerte weiße (lymphatische Follikel) und kaum noch vaskularisierte rote Pulpa auf. Dies weist auf Veränderungen im Immunsystem hin. Da junge Tiere eine äußerlich normale Milz aufweisen, scheint es sich um eine Alterserscheinung zu handeln bzw. eine langsame Veränderung, die erst nach einer bestimmten Entwicklungszeit sichtbar wird. Eine so gestaltete Milz kann vermutlich ihrer Aufgabe, funktionsfähige B-Lymphozyten bereitzustellen und Blutzellen abzubauen (Janeway, 2002), nicht mehr nachkommen. Während ihrer Entwicklung werden vorgereifte B-Zellen in die Peripherie ausgesandt, um in

einer sekundären Differenzierungsphase in den sekundären lymphoiden Organen, Milz und Lymphknoten, auf spezifische Antigene zu treffen. Dort unterliegen sie einer zweiten Selektion. Anschließend vermehren sie sich in klonaler Expansion. Aus diesen Klonen differenzieren sich entweder B-Gedächtniszellen oder Antikörper-sekretierende Plasmazellen (Lam, 1999). Die vergrößerten Follikel in der alten *Ear2*^{-/-}-Milz weisen auf veränderte B-Lymphozyten hin, wobei jeder Follikel einen veränderten B-Lymphozyten repräsentiert, der so starker klonaler Expansion unterliegt, dass allmählich das umliegende Gewebe verdrängt wird. Bei einer so hohen Anzahl entarteter B-Zellen, die einer leukämischen Entwicklung gleicht, wäre eine stark verkürzte Lebenszeit von *Ear2*-defizienten Mäusen zu erwarten (Kuby, 1997). Erstaunlicherweise zeigten die bisher untersuchten *Ear2*^{-/-}-Mäuse jedoch eine normale Lebensspanne.

Es konnte weder in embryonaler noch in adulter Milz *Ear2*-Expression detektiert werden. Das Knochenmark als Bildungsort der B-Zellen (Surh, 1999) wurde jedoch nicht untersucht, da Expression in diesem Gewebe nur schwer von dem hier sehr hohen Hintergrundsignal zu unterscheiden ist. Somit konnte nur im Thymus starke *Ear2*-Expression nachgewiesen werden. Zusammen mit der beobachteten veränderten Proliferation von Thymozyten in der MLR könnte dies bedeuten, dass die leukämischen B-Zell-Klone in der Milz durch veränderte T-Zellen zu erhöhter Proliferation aktiviert werden.

Um endgültige Gewissheit darüber zu erhalten, ob es sich bei den entarteten Zellen ausschließlich um B-Lymphozyten handelt, ist die Expression von typischen Markern dieser Zellen, wie CD21, CD32 oder CD40 (Kuby, 1997) zu testen. Desweiteren könnten FACS-Analysen älterer Tiere Aufschluss darüber geben, ob sich die immunologischen Zellpopulationen in ihrer Anzahl oder Zusammensetzung im Alter verändert haben. Dies könnte die Vermutung einer leukämischen Reaktion bestätigen.

4.4 *Ear2* im Lipidstoffwechsel

Aus bisherigen Untersuchungen ist bekannt, dass COUP-TFs zahlreiche Gene des Lipidstoffwechsels regulieren (Pereira 2000). COUP-TFI und Arp1 regulieren Apolipoproteine (Kardassis et al., 1998), Enzyme der β -Oxidation der Fettsäuren (Nishiyama et al., 1998), und in die Fettsäuresynthese involvierte Enzyme (Baes et al., 1995). Für *Ear2* wurde bisher eine Repression der Apolipoproteine ApoB, ApoCIII und ApoAII nachgewiesen (Ladas et al., 1992). Zwar ist bekannt, dass *COUP-TFs* während der Embryogenese auch Expression in mesodermalen und endodermalen Geweben der Organogenese aufweisen (Jonk et al., 1994; Pereira et al., 1995), *COUP-TFI* unter anderem in embryonalem Magen und

Pankreas (Pereira et al., 1995), *Arp1* in Hepatoblasten zu Beginn der Leberentwicklung (Zhang et al., 2002). Eine Expression in adulten lipidmetabolischen Organen wurde bisher nicht beschrieben. Für *Ear2* konnte bisher nur eine Expression in fetaler und adulter Leber anhand von Northern Blots nachgewiesen werden (Ladias and Karathanasis, 1991; Miyajima et al., 1988). Nicht eindeutig geklärt war jedoch bisher die Verteilung der Expression innerhalb des Organs und ihre Stärke. Die bisherigen Expressionsdaten konnten anhand der in dieser Arbeit gewonnenen Daten dahingehend bestätigt werden, dass *Ear2* in hohem Maße in embryonaler Leber verschiedener Altersstadien exprimiert ist. Die Expression ist zu allen Stadien ubiquitär, verändert aber ihre Stärke und ist im adulten Stadium nur noch in geringer Stärke vorhanden. *Arp1*, das allgemein in der Literatur mit starker Expression in embryonalen Organen beschrieben wurde (Pereira et al., 1995), weist jedoch - im Vergleich zu *Ear2* - nur geringe Expressionsstärke auf. Ähnliches konnte in Magen und Darm beobachtet werden. Auch hier ist *Ear2* in hohem Maße in der *Mucosa* des Dün- und Dickdarms zu finden; *Arp1* ist hier nicht oder nur sehr schwach exprimiert. In adulten Stadien dieser Organe konnte jedoch nur noch geringe, meist ubiquitäre *Ear2*-mRNA-Konzentrationen detektiert werden. Im adulten Stadium ist *COUP-TFI* wesentlich stärker und spezifischer als *Ear2* in der Leber exprimiert. Apolipoproteine, die von allen drei COUP-TFs reguliert werden (Ladias et al., 1992), werden in der Darmmucosa sowie der Leber synthetisiert. Deshalb sollten regulatorische Proteine eine Überlappung des Expressionsmusters aufweisen. Da die COUP-TFs hier zu verschiedenen Zeitpunkten exprimiert sind, weist dies darauf hin, dass ihnen zu unterschiedlichen Zeitpunkten eine Bedeutung in der Regulation zukommt, mit einem Schwerpunkt der *Ear2*-Funktion in der Embryogenese. Zu einem späteren Zeitpunkt könnte die Funktion dann von einem anderen COUP-TF übernommen werden. Da der Nukleärrezeptor HNF4 bei der Regulation der meisten Apolipoproteine als Cofaktor auftritt (Pereira et al., 2000), kann in diesem Zusammenhang auch der Vergleich mit seinem Expressionsmuster weitere Hinweise geben.

Die oben genannten von *Ear2* regulierten Apolipoproteine sind für den Fettsäure und Cholesterol-Transport im Blut zuständig. Deshalb ist zu erwarten, dass dieser bei Deletion von *Ear2* verändert ist und homozygote *Ear2*-defiziente Tiere veränderte Fettstoffwechselwerte aufweisen. Preliminäre Daten, die im Rahmen dieser Arbeit von der Firma Frimorpho generiert wurden, sind im Anhang aufgeführt und zeigen eine Veränderung der lipidmetabolischen Parameter in *Ear2*-defizienten Mäusen. Adulte Tiere zeigen signifikante Erhöhungen in den Blutspiegeln von HDL und Cholesterol. Erhöhte Cholesterolspiegel werden allgemein mit einem erhöhten Risiko für Herzkrankheiten in Verbindung gebracht (Young et al., 2004), bei erhöhten HDL-Spiegeln zeigten klinische Studien allerdings den umgekehrten Effekt (Frick et al., 1987; Rubins et al.,

1999). Für andere Komponenten des Lipidstoffwechsels konnten schwache Veränderungen festgestellt werden. Eine Ursache dafür kann die durch die geringe Tierzahl schwierige statistische Auswertung sein. Um dies auszuschließen, könnte neben einer größeren Anzahl von Tieren eine cholesterinreiche Diät vor den Messungen die Unterschiede zwischen Wildtyp- und *Ear2*^{-/-}-Tieren weiter verstärken.

Komparative Expressionsanalyse und Blutlipidmessungen bestätigen die Vermutung, *Ear2* könnte ein entscheidender Teil der Signaltransduktion sein, die den Lipidmetabolismus und die Cholesterolhomeostase reguliert (Ladias et al., 1992). Um genauere Aussagen über die Funktion von *Ear2* im Lipidstoffwechsel treffen zu können, sind jedoch weitere Untersuchungen notwendig. Ein Spektrum von Markergenen des Lipidmetabolismus könnte durch Vergleich von *Ear2*^{-/-}- und Wildtyp- Geweben durch *Ear2* regulierte Gene aufzeigen. Untersuchungen an verschiedenen Organen älterer Tiere können Auskunft über eventuelle Folgeerscheinungen der hohen Cholesterolwerte, wie z.B. Verfettungen oder Cholesterol-Ablagerungen als Zeichen hohen freien Cholesterols geben. Durch histologische Untersuchungen der Gefäße alter *Ear2*^{-/-}-Tiere könnte die Frage nach der Entwicklung arteriosklerotischer Ablagerungen und somit die Frage nach Aufhebung oder Akkumulation der Effekte geklärt werden.

4.5 Komparative Expressionsanalyse der COUP-TFs

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden die Expressionsmuster der drei Orphan Rezeptoren *COUP-TFI*, *Arp1* und *Ear2*, untersucht. Neben einer grundsätzlichen Analyse der *Ear2* Expression, über die bisher fast nichts bekannt war (Jonk et al., 1994; Ladias et al., 1992), bildete die komparative Untersuchung des Expressionsmusters aller drei COUP-TF Mitglieder einen besonderen Schwerpunkt. *Ear2*-Expression konnte sowohl über die gesamte Embryogenese hinweg als auch im adulten Organismus detektiert werden. Neben einer stark spezifischen Expression in Zellen und Gewebetypen unterschiedlicher Herkunft, die sich nicht auf ein Organ oder Organsystem beschränkt, ist *Ear2* darüber hinaus, wie in der bisherigen Literatur beschrieben ubiquitär (Jonk et al., 1994) exprimiert. Die schwache ubiquitäre *Ear2*-Expression konnte durch parallele Untersuchung von LacZ-Embryonen, die über den ganzen Körper verteilt nukleäres Signal in der Dermis aufweisen, als Hintergrundsignal ausgeschlossen werden.

Northern Blots embryonaler Gewebe zeigen *Ear2*-Expression beginnend mit schwacher Expression bei Embryonaltag 4.5, stärkerer ab E8.5 mit einem Höhepunkt um E10.5. Die schwache Expression von E4.5-7.5 ist vermutlich keine embryonale, sondern auf *Ear2*-

Transkripte der im Präparat bis E7.5 ebenfalls enthaltenen extraembryonalem Gewebe oder maternalen Uterus zurückzuführen, in dem *Ear2*-Expression detektiert werden konnte. Dafür spricht ebenfalls, dass in ISH und LacZ-Färbung bei E7.0 keine *Ear2*-Expression aufweisen.

Die im Northern Blot festgestellte hohe *Ear2*-Expression um E9-10 konnte als eine spezifische Expression zunächst in den Rhombomeren 1, 3, 5 später in der gesamte Rhombische Lippe des sich entwickelnden Hinterhirns ausgemacht werden. Diese Expression unterscheidet sich in ihrer Stärke und Spezifität von der Expression in den meisten anderen Organen, in denen meist niedrige und über das gesamte Organ verteilte Expression vorherrscht. Da die Expression im Rhombencephalon bereits um E8.5, zum Zeitpunkt der Entwicklung der ersten Rhombomere (Theiler, 1989) einsetzt, während der Rhombomerbildung bis E9.5 an Stärke zunimmt und sich stark abgegrenzt in einzelnen Rhombomeren befindet, weist dies auf eine mögliche Funktion in der Ausbildung der Segmente oder eine in der Entwicklung des Hinterhirns und seiner Derivative ähnlich wichtige Funktionen wie sein naher Verwandter *COUP-TFI* (Qiu et al., 1997) hin. Auch eine beobachtete komplementäre Expression von *Ear2* und *COUP-TFI*, das nicht im Rhombomer1, wohl aber in den caudalen Rhombomeren exprimiert ist (Tsai and Tsai, 1997), unterstützt die Vermutung, dass *Ear2* eine nicht redundante Funktion in der Metamerie des Rhombencephalons besitzt. Da *Ear2* sowohl in der späten Embryogenese, als auch im adultem Organismus bis auf schwache Expression in den Purkinje Zellen des *Cerebellums* keine weitere starke Expression aufweist, scheint sich die Funktion von *Ear2* im Zentralnervensystem im Gegensatz zu *COUP-TFI* und *Arp1*, die auch in adulten Stadien im Gehirn exprimiert sind (Tsai and Tsai, 1997), auf den frühen Zeitpunkt zwischen E8.5-10.5 zu beschränken und aufgrund der fehlenden Überlappung von *COUP-TFI* und *Arp1* im Rhombomer1 zumindest dort nicht redundant zu sein (wie auch die Ergebnisse dieser Arbeit zum Locus coeruleus zeigen). Die in Abb.3.2 D+E sowie Abb.3.2 G+H beobachteten Unterschiede der *in situ*-Hybridisierung und LacZ-Färbung sind durch die Stabilität der β -Galaktosidase zu erklären. So zeigen ehemals *Ear2*-exprimierende Zellen, in denen aufgrund des Reporterkonstrukts in einem Allel β -Galaktosidase synthetisiert wurde, auch noch dann ein Signal, wenn die *Ear2*-Expression bereits vorüber ist. Die zusätzlich angefärbten Bereiche können dementsprechend als Regionen angesehen werden, in die ehemals *Ear2*-exprimierende Zellen abgewandert sind.

Es konnte in mehreren Organen eine komplementäre Expression von *Ear2* und *Arp1/COUP-TFI* sowohl während der Organogenese, als auch im adulten Stadium gezeigt werden. Lunge und Niere zeigen dies besonders anschaulich.

In der Lunge beschränkt sich die *Ear2*-Expression in allen Stadien (E14.5, 18.5, adult) überwiegend auf das epitheliale Gewebe der Bronchien und Bronchiolen, diejenige von *COUP-TFI* und *Arp1* dagegen auf das Mesenchym der Lunge. Dies spricht für eine nicht redundante Funktion von *Ear2*. Bisher wurde in der Literatur nur für *Arp1* eine Expression in der Lunge beschrieben (Jonk et al., 1994; Malpel et al., 2000). Untersuchungen zeigen, dass *Arp1* über die Regulation der Retinsäure-Expression eine wichtige Rolle in der Ausbildung von Verzweigungen der Atemwege besitzt (Malpel et al., 2000), die in der Maus um E13.5 einsetzt. Zu diesem Zeitpunkt ist *Arp1* bereits im Mesenchym exprimiert. Die schon in E14.5 im Epithel der Bronchien und Bronchiolen vorhandene und bis adulte Stadium anhaltende *Ear2*-Expression lässt vermuten, dass *Ear2* eine Rolle in der Ausbildung und Funktion der das Epithel bildenden Becherzellen sowie späteren Prozessen spielen könnte.

In der Niere konnten *Ear2*-Transkripte ab E14.5 im Cortextbereich, in dem sich zu diesem Zeitpunkt distale und proximale Tubuli sowie Glomeruli befinden, um E18.5 im tubulären System nachgewiesen werden. *COUP-TFI* und *Arp1* sind embryonal im corticalen Nierengewebe mit Ausnahme der Glomeruli, im adulten Stadium in den Glomeruli exprimiert. Die komplementären und komplementierenden Expressionsmuster weisen auf eine von *COUP-TFI* und *Arp1* unabhängige Funktion von *Ear2* in der Entwicklung des tubulären Systems hin. Bisher konnte nur für *seven-up*, das *COUP-TFI* Homolog bei *Drosophila*, eine Funktion in der Entwicklung der Insekten-Niere (den Malpighischen Gefäßen) nachgewiesen werden. Dort reguliert *seven-up* die Zellproliferation, indem es die Transkription von Zell-Zyklus Regulatoren reguliert (Kerber et al., 1998).

In der vorliegenden Arbeit konnte in ISH und LacZ-Färbung auch *Ear2*-Expression in Teilen der adulten weiblichen Geschlechtsorgane gezeigt werden: in reifenden Follikeln, Gelbkörper und Gebärmutterschleimhaut. Für *Arp1* konnte Expression in Gebärmutterschleimhaut und Bindegewebe des Eierstocks nachgewiesen werden. In Gebärmutterschleimhaut (Lefebvre et al., 1992) und Gelbkörper (Ivell et al., 1985) konnten auch für das durch *Ear2* regulierte *Oxytocin* Transkripte nachgewiesen werden. *Oxytocin*-Expression wird hormonell durch Östrogen und Retinsäure über direkte Promotoraktivierung induziert (Adan et al., 1993; Richard and Zingg, 1990; Richard and Zingg, 1991; Zingg et al., 1995). *Ear2* und *Arp1* wiederum reprimieren diese Östrogen-stimulierte Transkription des humanen *Oxytocin*, indem sie an eine mit dem *response element* des Östrogens überlappende Promotorregion binden (Chu and Zingg, 1997). Die mit *Oxytocin* überlappende Expression von *Ear2* bekräftigt somit die bereits bestehenden Daten. Für *COUP-TF* konnte im Menschen bereits eine Funktion in der Transkriptionsmodulation steroider Enzyme in verschiedenen Zelltypen und follikulären Stadien in zyklierenden Ovarien nachgewiesen werden (Sato et al., 2003).

Die Aktivierung in reifenden Follikeln und Gelbkörper lässt eine Beteiligung von *Ear2* in der für COUP-TFI beschriebenen Transkriptionsmodulation vermuten.

Die Expressionsdaten bestätigen bereits bestehende Daten über Expression von *Ear2* in der Leber der Maus (Ladiaz et al., 1992; Miyajima et al., 1988), korrigieren vorherige Annahmen bezüglich der rein ubiquitären Expression (Jonk et al., 1994) und erweitern die *Ear2*-Expressionsorte um bisher nicht bekannte Aktivierung in Thymus, Lunge, Niere, Ovar, Uterus und *Rhombencephalon*. Die Expressionsdaten liefern neue Hinweise zur Funktion von *Ear2* und eventuellen Redundanzen innerhalb der COUP-TF Mitglieder und ermöglichen weitere gezielte Untersuchungen zur funktionellen Analyse in *Ear2*-defizienten Tieren.

5 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

°C	Grad Celsius
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
Abb.	Abbildung
Adcy	Adenylatcyclase
ANR	<i>anterior neural ridge</i>
Apo	Apolipoprotein
Arp1	<i>Apolipoprotein regulating protein 1</i>
ATP	Adenosintriphosphat
BMP	<i>Bone morphogenetic protein</i>
bp	Basenpaare, 1000bp = 1kb
cDNA	komplementäre DNA
COUP-TFI	<i>Chicken ovalbumin upstream transcription factor I</i>
DBD	DNA-Bindungsdomäne
DBH	Dopamin β-Hydroxylase
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DIG	Digoxigenin
DMH	<i>dosomedialer Nukleus des Hypothalamus</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dsDNA	doppelsträngige DNA
E	embryonaler Tag
Ear2	v-erb-A-related Protein2
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EF1α	Elongationsfaktor 1α
EtOH	Ethanol
FGF	<i>Fibroblast growth factor</i>
GATA	<i>GATA binding protein</i>
gDNA	genomische DNA
HAND	<i>heart and neural crest derivatives expressed transcript</i>
HDL	<i>high density lipoprotein</i>
HNF4	<i>hepatocyte nuclear factor</i>
Ig	Immunglobuline
IGL	<i>intergeniculate leaflet</i>
ISH	<i>in situ</i> -Hybridisierung
LacZ	Teilabschnitt des β-Galaktosidasegens
LBD	Ligandbindungsdomäne
LC	<i>Locus coeruleus (dorsaler Teil=dLC, ventraler=vLC)</i>

LCAT	Lecitin-Cholesterol-Acetyl-Transferase
LDL	<i>low density lipoprotein</i>
Lix1	Limb expression1
LPL	Lipoprotein Lipase
M	Mol pro Liter
Mash1	<i>mouse archaete homolog 1</i>
MeV	mesencephalischer Nukleus des trigeminalen Ganglion
MHC	<i>Major Histability Complex</i>
min	Minute
ml	Milliliter
MLR	<i>multiple lymphocytes reaction</i>
mRNA	<i>messenger-RNA</i>
ng	Nanogramm
NHR	Nukleärer Hormonrezeptor
NS	Nervensystem
P	postnataler Tag
PBS	Phosphatpuffer, salzhaltig
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
PFA	Paraformaldehyd
Phox2a,b	<i>paralog homeodomain protein</i>
PK	Proteinnase
PNS	Peripheres Nervensystem
PVN	Nucleus Paraventricularis
R	<i>Rhombomer</i>
REM	<i>rolling eye movement</i>
RL	Rhombische Lippe
RNA	Ribonukleinsäure
Rnx	auch Tlx3 = <i>T-cell leukemia, homeobox 3</i>
rpm	Umdrehungen pro Minute
RRL	Rostrale Rhombische Lippe
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkription mit anschließender PCR
SCN	<i>suprachiasmatischer Nukleus</i>
SDS	Natrium-Dodecylsulfat
Sp6	Sp6-Bakteriophagen-Promoter
SSC	Natrium-Citratpuffer, salzhaltig
SVN	<i>superior vestibular nucleus</i>
SWS	<i>slow wave sleep</i>
T/B	Tyramid/Biotin
T7	T7-Bakteriophagen-Promoter
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-Puffer, EDTA-haltig
TCR	T-Zell Rezeptormoleküle
TGF	<i>transforming growth factors</i>
TH	Tyrosin Hydroxylase
TR	<i>testis receptor</i>
U	<i>unit</i> (Einheit)
VLDL	<i>very low density lipoprotein</i>
wmISH	<i>whole mount in situ</i> -Hybridisierung
ZNS	Zentralnervensystem

6 LITERATURVERZEICHNIS

Abercrombie, M. J., ML (1946). Quantitative histology of Wallerian degeneration I. Nuklear population in rabbit sciatic nerve. *J Anat Lond Vol.80*, 37-50.

Adachi, M., Browne, D., and Lewis, E. J. (2000). Paired-like homeodomain proteins Phox2a/Arx and Phox2b/NBPhox have similar genetic organization and independently regulate dopamine beta-hydroxylase gene transcription. *DNA Cell Biol 19*, 539-554.

Adan, R. A., Cox, J. J., Beischlag, T. V., and Burbach, J. P. (1993). A composite hormone response element mediates the transactivation of the rat oxytocin gene by different classes of nuclear hormone receptors. *Mol Endocrinol 7*, 47-57.

Aghajanian, G. K., Cedarbaum, J. M., and Wang, R. Y. (1977). Evidence for norepinephrine-mediated collateral inhibition of locus coeruleus neurons. *Brain Res 136*, 570-577.

Akhtar, R. A., Reddy, A. B., Maywood, E. S., Clayton, J. D., King, V. M., Smith, A. G., Gant, T. W., Hastings, M. H., and Kyriacou, C. P. (2002). Circadian cycling of the mouse liver transcriptome, as revealed by cDNA microarray, is driven by the suprachiasmatic nucleus. *Curr Biol 12*, 540-550.

Albrecht, U., and Eichele, G. (2003). The mammalian circadian clock. *Curr Opin Genet Dev 13*, 271-277.

Albrecht, U., and Oster, H. (2001). The circadian clock and behavior. *Behav Brain Res 125*, 89-91.

Alroy, I., Towers, T. L., and Freedman, L. P. (1995). Transcriptional repression of the interleukin-2 gene by vitamin D3: direct inhibition of NFATp/AP-1 complex formation by a nuclear hormone receptor. *Mol Cell Biol 15*, 5789-5799.

Altschul, S. F., Madden, T. L., Schaffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., and Lipman, D. J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res 25*, 3389-3402.

Amaya, E., Musci, T. J., and Kirschner, M. W. (1991). Expression of a dominant negative mutant of the FGF receptor disrupts mesoderm formation in *Xenopus* embryos. *Cell 66*, 257-270.

Arima, K., and Akashi, T. (1990). Involvement of the locus coeruleus in Pick's disease with or without Pick body formation. *Acta Neuropathol (Berl) 79*, 629-633.

Arkell, R., and Beddington, R. S. (1997). BMP-7 influences pattern and growth of the developing hindbrain of mouse embryos. *Development 124*, 1-12.

- Aschoff, J. (1955). [Daily periodicity in mice strains under constant environmental conditions]. *Pflugers Arch* 262, 51-59.
- Aschoff, J. (1979). Circadian rhythms: influences of internal and external factors on the period measured in constant conditions. *Z Tierpsychol* 49, 225-249.
- Assmann, G., Schulte, H., von Eckardstein, A., and Huang, Y. (1996). High-density lipoprotein cholesterol as a predictor of coronary heart disease risk. The PROCAM experience and pathophysiological implications for reverse cholesterol transport. *Atherosclerosis* 124 Suppl, S11-20.
- Aston-Jones, G. (1985). Behavioral functions of locus coeruleus derived from cellular attributes. *Physiol Psych* 13, 118-126.
- Aston-Jones, G., Akaoka, H., Charley, P., and Chouvet, G. (1991). Serotonin selectively attenuates glutamate-evoked activation of noradrenergic locus coeruleus neurons. *J Neurosci* 11, 760-769.
- Aston-Jones, G., and Bloom, F. E. (1981a). Activity of norepinephrine-containing locus coeruleus neurons in behaving rats anticipates fluctuations in the sleep-waking cycle. *J Neurosci* 1, 876-886.
- Aston-Jones, G., and Bloom, F. E. (1981b). Nonrepinephrine-containing locus coeruleus neurons in behaving rats exhibit pronounced responses to non-noxious environmental stimuli. *J Neurosci* 1, 887-900.
- Aston-Jones, G., Chen, S., Zhu, Y., and Oshinsky, M. L. (2001). A neural circuit for circadian regulation of arousal. *Nat Neurosci* 4, 732-738.
- Aston-Jones, G., Ennis, M., Pieribone, V. A., Nickell, W. T., and Shipley, M. T. (1986). The brain nucleus locus coeruleus: restricted afferent control of a broad efferent network. *Science* 234, 734-737.
- Aston-Jones, G. S., M.T.; Grzanna, R. (1995). The Locus coeruleus, A5 and A7 noradrenergic cell groups. In *The Rat Nervous System*, G. Paxinus, ed. (San Diego, Academic Press), pp. 183-213.
- Atweh, S. F., and Kuhar, M. J. (1977). Autoradiographic localization of opiate receptors in rat brain. II. The brain stem. *Brain Res* 129, 1-12.
- Auerbach, R. (1960). Morphogenetic interactions in the development of the mouse thymus gland. *Dev Biol* 2, 271-284.
- Avram, D., Fields, A., Pretty On Top, K., Nevriy, D. J., Ishmael, J. E., and Leid, M. (2000). Isolation of a novel family of C(2)H(2) zinc finger proteins implicated in transcriptional repression mediated by chicken ovalbumin upstream promoter transcription factor (COUP-TF) orphan nuclear receptors. *J Biol Chem* 275, 10315-10322.
- Avram, D., Ishmael, J. E., Nevriy, D. J., Peterson, V. J., Lee, S. H., Dowell, P., and Leid, M. (1999). Heterodimeric interactions between chicken ovalbumin upstream promoter-transcription factor family members ARP1 and ear2. *J Biol Chem* 274, 14331-14336.
- Baes, M., Castelein, H., Desmet, L., and Declercq, P. E. (1995). Antagonism of COUP-TF and PPAR alpha/RXR alpha on the activation of the malic enzyme gene promoter: modulation by 9-cis RA. *Biochem Biophys Res Commun* 215, 338-345.
- Baker, K. G., Tork, I., Hornung, J. P., and Halasz, P. (1989). The human locus coeruleus complex: an immunohistochemical and three dimensional reconstruction study. *Exp Brain Res* 77, 257-270.
- Baldo, B. A., Daniel, R. A., Berridge, C. W., and Kelley, A. E. (2003). Overlapping distributions of orexin/hypocretin- and dopamine-beta-hydroxylase immunoreactive fibers in rat brain regions mediating arousal, motivation, and stress. *J Comp Neurol* 464, 220-237.

- Bally-Cuif, L., and Wassef, M. (1995). Determination events in the nervous system of the vertebrate embryo. *Curr Opin Genet Dev* 5, 450-458.
- Barnhart, K. M., and Mellon, P. L. (1994). The sequence of a murine cDNA encoding Ear-2, a nuclear orphan receptor. *Gene* 142, 313-314.
- Basbaum, A. I., and Fields, H. L. (1978). Endogenous pain control mechanisms: review and hypothesis. *Ann Neurol* 4, 451-462.
- Beddington, R. S., and Robertson, E. J. (1998). Anterior patterning in mouse. *Trends Genet* 14, 277-284.
- Belcher, G., Ryall, R. W., and Schaffner, R. (1978). The differential effects of 5-hydroxytryptamine, noradrenaline and raphe stimulation on nociceptive and non-nociceptive dorsal horn interneurons in the cat. *Brain Res* 151, 307-321.
- Benninghoff, A. A., K; Firbas, P; Fritsch, O; Gruber, H; Mayr, R; Neuhuber, W; Petsche, H; Rager, G; (1985). *Makroskopische und mikroskopische Anatomie des Menschen, 3.Band Nervensystem, Haut und Sinnesorgane* (München, Urban & Schwarzenberg).
- Berg, J. M. S., L.; Tymoczko, J.L. (2003). *Biochemie, Vol 5.Aufl., Spektrum-Akademischer Verlag*.
- Berridge, C. W., and Foote, S. L. (1991). Effects of locus coeruleus activation on electroencephalographic activity in neocortex and hippocampus. *J Neurosci* 11, 3135-3145.
- Berridge, C. W., and Foote, S. L. (1996). Enhancement of behavioral and electroencephalographic indices of waking following stimulation of noradrenergic beta-receptors within the medial septal region of the basal forebrain. *J Neurosci* 16, 6999-7009.
- Berridge, C. W., and O'Neill, J. (2001). Differential sensitivity to the wake-promoting actions of norepinephrine within the medial preoptic area and the substantia innominata. *Behav Neurosci* 115, 165-174.
- Berridge, C. W., and Waterhouse, B. D. (2003). The locus coeruleus-noradrenergic system: modulation of behavioral state and state-dependent cognitive processes. *Brain Res Brain Res Rev* 42, 33-84.
- Bertrand, N., Castro, D. S., and Guillemot, F. (2002). Proneural genes and the specification of neural cell types. *Nat Rev Neurosci* 3, 517-530.
- Bird, S. J., and Kuhar, M. J. (1977). Iontophoretic application of opiates to the locus coeruleus. *Brain Res* 122, 523-533.
- Bissonnette, R. P., Brunner, T., Lazarchik, S. B., Yoo, N. J., Boehm, M. F., Green, D. R., and Heyman, R. A. (1995). 9-cis retinoic acid inhibition of activation-induced apoptosis is mediated via regulation of fas ligand and requires retinoic acid receptor and retinoid X receptor activation. *Mol Cell Biol* 15, 5576-5585.
- Bosler, O., and Beaudet, A. (1985). VIP neurons as prime synaptic targets for serotonin afferents in rat suprachiasmatic nucleus: a combined radioautographic and immunocytochemical study. *J Neurocytol* 14, 749-763.
- Brodal, P., and Brodal, A. (1981). The olivocerebellar projection in the monkey. Experimental studies with the method of retrograde tracing of horseradish peroxidase. *J Comp Neurol* 201, 375-393.
- Brunet, J. F., and Pattyn, A. (2002). Phox2 genes - from patterning to connectivity. *Curr Opin Genet Dev* 12, 435-440.

- Buijs, R. M., van Eden, C. G., Goncharuk, V. D., and Kalsbeek, A. (2003). The biological clock tunes the organs of the body: timing by hormones and the autonomic nervous system. *J Endocrinol* 177, 17-26.
- Burbach, J. P., Lopes da Silva, S., Cox, J. J., Adan, R. A., Cooney, A. J., Tsai, M. J., and Tsai, S. Y. (1994). Repression of estrogen-dependent stimulation of the oxytocin gene by chicken ovalbumin upstream promoter transcription factor I. *J Biol Chem* 269, 15046-15053.
- Caffe, A. R., van Leeuwen, F. W., Buijs, R. M., de Vries, G. J., and Geffard, M. (1985). Coexistence of vasopressin, neurophysin and noradrenaline immunoreactivity in medium-sized cells of the locus coeruleus and subcoeruleus in the rat. *Brain Res* 338, 160-164.
- Cambronero, F., and Puelles, L. (2000). Rostrocaudal nuclear relationships in the avian medulla oblongata: a fate map with quail chick chimeras. *J Comp Neurol* 427, 522-545.
- Campbell, N. C. (2003). *Biologie*. In, J. Markl, ed. (Berlin, Spektrum Akademischer Verlag).
- Carter, M. E., Gulick, T., Moore, D. D., and Kelly, D. P. (1994). A pleiotropic element in the medium-chain acyl coenzyme A dehydrogenase gene promoter mediates transcriptional regulation by multiple nuclear receptor transcription factors and defines novel receptor-DNA binding motifs. *Mol Cell Biol* 14, 4360-4372.
- Castelli, W. P., Garrison, R. J., Wilson, P. W., Abbott, R. D., Kalousdian, S., and Kannel, W. B. (1986). Incidence of coronary heart disease and lipoprotein cholesterol levels. The Framingham Study. *Jama* 256, 2835-2838.
- Cedarbaum, J. M., and Aghajanian, G. K. (1976). Noradrenergic neurons of the locus coeruleus: inhibition by epinephrine and activation by the alpha-antagonist piperoxane. *Brain Res* 112, 413-419.
- Cedarbaum, J. M., and Aghajanian, G. K. (1977). Catecholamine receptors on locus coeruleus neurons: pharmacological characterization. *Eur J Pharmacol* 44, 375-385.
- Cedarbaum, J. M., and Aghajanian, G. K. (1978). Activation of locus coeruleus neurons by peripheral stimuli: modulation by a collateral inhibitory mechanism. *Life Sci* 23, 1383-1392.
- Chan-Palay, V., and Asan, E. (1989). Alterations in catecholamine neurons of the locus coeruleus in senile dementia of the Alzheimer type and in Parkinson's disease with and without dementia and depression. *J Comp Neurol* 287, 373-392.
- Chen, J. D., and Evans, R. M. (1995). A transcriptional co-repressor that interacts with nuclear hormone receptors. *Nature* 377, 454-457.
- Chew, L. J., Huang, F., Boutin, J. M., and Gallo, V. (1999). Identification of nuclear orphan receptors as regulators of expression of a neurotransmitter receptor gene. *J Biol Chem* 274, 29366-29375.
- Christenson, J. G., Dairman, W., and Udenfriend, S. (1972). On the identity of DOPA decarboxylase and 5-hydroxytryptophan decarboxylase (immunological titration-aromatic L-amino acid decarboxylase-serotonin-dopamine-norepinephrine). *Proc Natl Acad Sci U S A* 69, 343-347.
- Chu, K., Boutin, J. M., Breton, C., and Zingg, H. H. (1998). Nuclear orphan receptors COUP-TFII and Ear-2: presence in oxytocin-producing uterine cells and functional interaction with the oxytocin gene promoter. *Mol Cell Endocrinol* 137, 145-154.
- Chu, K., and Zingg, H. H. (1997). The nuclear orphan receptors COUP-TFII and Ear-2 act as silencers of the human oxytocin gene promoter. *J Mol Endocrinol* 19, 163-172.
- Clark, F. M., and Proudfit, H. K. (1991). Projections of neurons in the ventromedial medulla to pontine catecholamine cell groups involved in the modulation of nociception. *Brain Res* 540, 105-115.

- Clevers, H. C., and Grosschedl, R. (1996). Transcriptional control of lymphoid development: lessons from gene targeting. *Immunol Today* 17, 336-343.
- Cooney, A. J., Leng, X., Tsai, S. Y., O'Malley, B. W., and Tsai, M. J. (1993). Multiple mechanisms of chicken ovalbumin upstream promoter transcription factor-dependent repression of transactivation by the vitamin D, thyroid hormone, and retinoic acid receptors. *J Biol Chem* 268, 4152-4160.
- Cooney, A. J., Tsai, S. Y., O'Malley, B. W., and Tsai, M. J. (1992). Chicken ovalbumin upstream promoter transcription factor (COUP-TF) dimers bind to different GGTC A response elements, allowing COUP-TF to repress hormonal induction of the vitamin D₃, thyroid hormone, and retinoic acid receptors. *Mol Cell Biol* 12, 4153-4163.
- Cordier, A. C., and Haumont, S. M. (1980). Development of thymus, parathyroids, and ultimobranchial bodies in NMRI and nude mice. *Am J Anat* 157, 227-263.
- Cowan, W. M. F., T.E. (1982). *Neuronal Development* (ed Spitzer,NC), 377-415 (Plenum, New York 1982).
- Dahlstrom, A., and Fuxe, K. (1965). Evidence for the existence of an outflow of noradrenaline nerve fibres in the ventral roots of the rat spinal cord. *Experientia* 21, 409-410.
- Deboer, T., Vansteensel, M. J., Detari, L., and Meijer, J. H. (2003). Sleep states alter activity of suprachiasmatic nucleus neurons. *Nat Neurosci* 6, 1086-1090.
- Deng, C. X., Wynshaw-Boris, A., Shen, M. M., Daugherty, C., Ornitz, D. M., and Leder, P. (1994). Murine FGFR-1 is required for early postimplantation growth and axial organization. *Genes Dev* 8, 3045-3057.
- Descarries, L., and Saucier, G. (1972). Disappearance of the locus coeruleus in the rat after intraventricular 6-hydroxydopamine. *Brain Res* 37, 310-316.
- Despres, J. P., Lemieux, I., Dagenais, G. R., Cantin, B., and Lamarche, B. (2000). HDL-cholesterol as a marker of coronary heart disease risk: the Quebec cardiovascular study. *Atherosclerosis* 153, 263-272.
- Dowell, P., Ishmael, J. E., Avram, D., Peterson, V. J., Nevriy, D. J., and Leid, M. (1999). Identification of nuclear receptor corepressor as a peroxisome proliferator-activated receptor alpha interacting protein. *J Biol Chem* 274, 15901-15907.
- Dunlap, J. C. (1999). Molecular bases for circadian clocks. *Cell* 96, 271-290.
- Echelard, Y., Epstein, D. J., St-Jacques, B., Shen, L., Mohler, J., McMahon, J. A., and McMahon, A. P. (1993). Sonic hedgehog, a member of a family of putative signaling molecules, is implicated in the regulation of CNS polarity. *Cell* 75, 1417-1430.
- Engberg, I., and Marshall, K. C. (1971). Mechanism of noradrenaline hyperpolarization in spinal cord motoneurons of the cat. *Acta Physiol Scand* 83, 142-144.
- Escriva, H., Safi, R., Hanni, C., Langlois, M. C., Saumitou-Laprade, P., Stehelin, D., Capron, A., Pierce, R., and Laudet, V. (1997). Ligand binding was acquired during evolution of nuclear receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 6803-6808.
- Everitt, B. J., Hokfelt, T., Terenius, L., Tatemoto, K., Mutt, V., and Goldstein, M. (1984). Differential co-existence of neuropeptide Y (NPY)-like immunoreactivity with catecholamines in the central nervous system of the rat. *Neuroscience* 11, 443-462.

- Feldman, B., Poueymirou, W., Papaioannou, V. E., DeChiara, T. M., and Goldfarb, M. (1995). Requirement of FGF-4 for postimplantation mouse development. *Science* 267, 246-249.
- Fink, P. J., and Bevan, M. J. (1995). Positive selection of thymocytes. *Adv Immunol* 59, 99-133.
- Foote, S. L., Aston-Jones, G., and Bloom, F. E. (1980). Impulse activity of locus coeruleus neurons in awake rats and monkeys is a function of sensory stimulation and arousal. *Proc Natl Acad Sci U S A* 77, 3033-3037.
- Foote, S. L., Bloom, F. E., and Aston-Jones, G. (1983). Nucleus locus ceruleus: new evidence of anatomical and physiological specificity. *Physiol Rev* 63, 844-914.
- Foote, S. L., and Morrison, J. H. (1987). Extrathalamic modulation of cortical function. *Annu Rev Neurosci* 10, 67-95.
- Francois-Bellan, A. M., and Bosler, O. (1992). Convergent serotonin and GABA innervation of VIP neurons in the suprachiasmatic nucleus demonstrated by triple labeling in the rat. *Brain Res* 595, 149-153.
- Fraser, S., Keynes, R., and Lumsden, A. (1990). Segmentation in the chick embryo hindbrain is defined by cell lineage restrictions. *Nature* 344, 431-435.
- Frick, M. H., Elo, O., Haapa, K., Heinonen, O. P., Heinsalmi, P., Helo, P., Huttunen, J. K., Kaitaniemi, P., Koskinen, P., Manninen, V., and et al. (1987). Helsinki Heart Study: primary-prevention trial with gemfibrozil in middle-aged men with dyslipidemia. Safety of treatment, changes in risk factors, and incidence of coronary heart disease. *N Engl J Med* 317, 1237-1245.
- Galliot, B., de Vargas, C., and Miller, D. (1999). Evolution of homeobox genes: Q50 Paired-like genes founded the Paired class. *Dev Genes Evol* 209, 186-197.
- Genest, J., Jr., McNamara, J. R., Ordovas, J. M., Jenner, J. L., Silberman, S. R., Anderson, K. M., Wilson, P. W., Salem, D. N., and Schaefer, E. J. (1992). Lipoprotein cholesterol, apolipoprotein A-I and B and lipoprotein (a) abnormalities in men with premature coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol* 19, 792-802.
- Georgopoulos, K. (1997). Transkriptional factors required for lymphoid lineage commitment. *Curr Opin Immunol* 9, 222-227.
- Gesi, M., Soldani, P., Giorgi, F. S., Santinami, A., Bonaccorsi, I., and Fornai, F. (2000). The role of the locus coeruleus in the development of Parkinson's disease. *Neurosci Biobehav Rev* 24, 655-668.
- Giguere, V. (1999). Orphan nuclear receptors: from gene to function. *Endocr Rev* 20, 689-725.
- Gilbert, S. F. (1997a). Early vertebrate development: neurulation and the ectoderm. In *Developmental Biology* (Sunderland, Massachusetts, Sinauer Associates), pp. 253-306.
- Gilbert, S. F. (1997b). Transcriptional regulation of gene expression: transcription factors and the activation of specific promoters. In *developmental biology* (Sunderland, Massachusetts, Sinauer Associates), pp. 391-430.
- Goldman, G., and Coleman, P. D. (1981). Neuron numbers in locus coeruleus do not change with age in Fisher 344 rat. *Neurobiol Aging* 2, 33-36.
- Gordon, T., Castelli, W. P., Hjortland, M. C., Kannel, W. B., and Dawber, T. R. (1977). High density lipoprotein as a protective factor against coronary heart disease. The Framingham Study. *Am J Med* 62, 707-714.
- Goridis, C., and Rohrer, H. (2002). Specification of catecholaminergic and serotonergic neurons. *Nat Rev Neurosci* 3, 531-541.

- Grant, S. J., Aston-Jones, G., and Redmond, D. E., Jr. (1988). Responses of primate locus coeruleus neurons to simple and complex sensory stimuli. *Brain Res Bull* 21, 401-410.
- Greene, J. M., Li, Y. L., Yourey, P. A., Gruber, J., Carter, K. C., Shell, B. K., Dillon, P. A., Florence, C., Duan, D. R., Blunt, A., *et al.* (1998). Identification and characterization of a novel member of the fibroblast growth factor family. *Eur J Neurosci* 10, 1911-1925.
- Greenfield, J. B., FD. (1953). The brain-stem lesions in Parkinsonism. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 16, 2134-2126.
- Grzanna, R., and Molliver, M. E. (1980). The locus coeruleus in the rat: an immunohistochemical delineation. *Neuroscience* 5, 21-40.
- Grzanna, R. M., M.E. (1980). Cytoarchitecture and dendrite morphology of central noradrenergic neurons. In *The Reticular Formation Revisited*, J. A. B. Hobson, M.A.B., ed. (New York, Raven Press), pp. 83-97.
- Guo, S., Brush, J., Teraoka, H., Goddard, A., Wilson, S. W., Mullins, M. C., and Rosenthal, A. (1999). Development of noradrenergic neurons in the zebrafish hindbrain requires BMP, FGF8, and the homeodomain protein soulless/Phox2a. *Neuron* 24, 555-566.
- Guyenet, P. G., and Aghajanian, G. K. (1977). Excitation of neurons in the nucleus locus coeruleus by substance P and related peptides. *Brain Res* 136, 178-184.
- Guyenet, P. G., and Aghajanian, G. K. (1979). ACh, substance P and met-enkephalin in the locus coeruleus: pharmacological evidence for independent sites of action. *Eur J Pharmacol* 53, 319-328.
- Halberg, F., and Visscher, M. B. (1952). A difference between the effects of dietary calorie restriction on the estrous cycle and on the 24-hour adrenal cortical cycle in rodents. *Endocrinology* 51, 329-335.
- Hammond, D. L., and Proudfit, H. K. (1980). Effects of locus coeruleus lesions on morphine-induced antinociception. *Brain Res* 188, 79-91.
- Harkmark, W. (1954). Cell migrations from the rhombic lip to the inferior olive, the nucleus raphe and the pons; a morphological and experimental investigation on chick embryos. *J Comp Neurol* 100, 115-209.
- Harrison, S. C. (1991). A structural taxonomy of DNA-binding domains. *Nature* 353, 715-719.
- Hartung, H., Feldman, B., Lovec, H., Coulier, F., Birnbaum, D., and Goldfarb, M. (1997). Murine FGF-12 and FGF-13: expression in embryonic nervous system, connective tissue and heart. *Mech Dev* 64, 31-39.
- Hastings, M. H., Ebling, F. J., Grosse, J., Herbert, J., Maywood, E. S., Mikkelsen, J. D., and Sumova, A. (1995). Immediate-early genes and the neural bases of photic and non-photic entrainment. *Ciba Found Symp* 183, 175-189; discussion 190-177.
- Henle, J. (1868). *Handbuch der Nervenlehre des Menschen*. In *Handbuch der systematischen Anatomie* (Braunschweig, Vieweg und Sohn).
- Herzig, U., Cadenas, C., Sieckmann, F., Sierralta, W., Thaller, C., Visel, A., and Eichele, G. (2001). Development of high-throughput tools to unravel the complexity of gene expression patterns in the mammalian brain. *Novartis Found Symp* 239, 129-146; discussion 146-159.
- Hirsch, M. R., Tiveron, M. C., Guillemot, F., Brunet, J. F., and Goidis, C. (1998). Control of noradrenergic differentiation and Phox2a expression by MASH1 in the central and peripheral nervous system. *Development* 125, 599-608.

- Hobson, J. A., McCarley, R. W., and Wyzinski, P. W. (1975). Sleep cycle oscillation: reciprocal discharge by two brainstem neuronal groups. *Science* 189, 55-58.
- Horlein, A. J., Naar, A. M., Heinzl, T., Torchia, J., Gloss, B., Kurokawa, R., Ryan, A., Kamei, Y., Soderstrom, M., Glass, C. K., and et al. (1995). Ligand-independent repression by the thyroid hormone receptor mediated by a nuclear receptor co-repressor. *Nature* 377, 397-404.
- Houart, C., Westerfield, M., and Wilson, S. W. (1998). A small population of anterior cells patterns the forebrain during zebrafish gastrulation. *Nature* 391, 788-792.
- Howard, M., Foster, D. N., and Cserjesi, P. (1999). Expression of HAND gene products may be sufficient for the differentiation of avian neural crest-derived cells into catecholaminergic neurons in culture. *Dev Biol* 215, 62-77.
- Hunt, P., Gulisano, M., Cook, M., Sham, M. H., Faiella, A., Wilkinson, D., Boncinelli, E., and Krumlauf, R. (1991a). A distinct Hox code for the branchial region of the vertebrate head. *Nature* 353, 861-864.
- Hunt, P., Whiting, J., Nonchev, S., Sham, M. H., Marshall, H., Graham, A., Cook, M., Allemann, R., Rigby, P. W. J., Guilisano, M., et al. (1991b). The branchial Hox code and its implications for gene regulation, patterning of the nervous system and head evolution. *Development* 2, 63-77.
- Ivell, R., Brackett, K. H., Fields, M. J., and Richter, D. (1985). Ovulation triggers oxytocin gene expression in the bovine ovary. *FEBS Lett* 190, 263-267.
- Jameson, S. C., Hogquist, K. A., and Bevan, M. J. (1995). Positive selection of thymocytes. *Annu Rev Immunol* 13, 93-126.
- Janeway, C. A. T., P.; Walport, M. (2002). *Lehrbuch Immunologie, Vol 5. Auflage* (Stuttgart, Spektrum Akademischer Verlag).
- Janss, A. J., Jones, S. L., and Gebhart, G. F. (1987). Effect of spinal norepinephrine depletion on descending inhibition of the tail flick reflex from the locus coeruleus and lateral reticular nucleus in the rat. *Brain Res* 400, 40-52.
- Johnson, A. D. (1995). The price of repression. *Cell* 81, 655-658.
- Jones, B. E. (2003). Arousal systems. *Front Biosci* 8, s438-451.
- Jones, S. L., and Gebhart, G. F. (1986). Quantitative characterization of ceruleospinal inhibition of nociceptive transmission in the rat. *J Neurophysiol* 56, 1397-1410.
- Jones, S. L., and Gebhart, G. F. (1987). Spinal pathways mediating tonic, coeruleospinal, and raphe-spinal descending inhibition in the rat. *J Neurophysiol* 58, 138-159.
- Jones, S. L. (1991). Descending noradrenergic influences on pain. *Prog Brain Res* 88, 381-394.
- Jonk, L. J., de Jonge, M. E., Pals, C. E., Wissink, S., Vervaart, J. M., Schoorlemmer, J., and Kruijer, W. (1994). Cloning and expression during development of three murine members of the COUP family of nuclear orphan receptors. *Mech Dev* 47, 81-97.
- Jouvet, M. (1969). Biogenic amines and the states of sleep. *Science* 163, 32-41.
- Joyner, A. L., ed. (1993). *Gene targeting a practical approach* (Oxford).
- Kandel, E. R., Schwarz, J.H., Jessell, T.M. (2000). The induction and patterning of the nervous system. In *principles of neuroscience* (McGraw-Hill), pp. 1019-1040.

- Kardassis, D., Sacharidou, E., and Zannis, V. I. (1998). Transactivation of the human apolipoprotein CII promoter by orphan and ligand-dependent nuclear receptors. The regulatory element CIIC is a thyroid hormone response element. *J Biol Chem* 273, 17810-17816.
- Karolson, P. D., D.; Koolmann, J. (1994). Kurzes Lehrbuch der Biochemie für Mediziner und Naturwissenschaftler, Vol 14 (Stuttgart, Georg Thieme Verlag).
- Karoum, F., Commissiong, J. W., Neff, N. H., and Wyatt, R. J. (1980). Biochemical evidence for uncrossed and crossed locus coeruleus projections to the spinal cord. *Brain Res* 196, 237-241.
- Kaufmann, M. H., Bard, J.B.L. (1999). The brain and spinal cord, The neural crest. In *The anatomical basis of mouse development* (London, New York, Academic Press), pp. 171-192; 147-149.
- Kerber, B., Fellert, S., and Hoch, M. (1998). Seven-up, the Drosophila homolog of the COUP-TF orphan receptors, controls cell proliferation in the insect kidney. *Genes Dev* 12, 1781-1786.
- Kieffer, B. L. (1999). Opioids: first lessons from knockout mice. *Trends Pharmacol Sci* 20, 19-26.
- Kilbourn, M. R., Sherman, P., and Abbott, L. C. (1998). Reduced MPTP neurotoxicity in striatum of the mutant mouse tottering. *Synapse* 30, 205-210.
- Klein, D. C. M., R.Y. and Reppert, S.M. (1991). *Suprachiasmatic Nucleus: The Mind's clock* (New York, Oxford University Press).
- Kliwer, S. A., Umesono, K., Heyman, R. A., Mangelsdorf, D. J., Dyck, J. A., and Evans, R. M. (1992). Retinoid X receptor-COUP-TF interactions modulate retinoic acid signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 1448-1452.
- Klinge, C. M., Silver, B. F., Driscoll, M. D., Sathya, G., Bambara, R. A., and Hilf, R. (1997). Chicken ovalbumin upstream promoter-transcription factor interacts with estrogen receptor, binds to estrogen response elements and half-sites, and inhibits estrogen-induced gene expression. *J Biol Chem* 272, 31465-31474.
- Knecht, A. K., and Harland, R. M. (1997). Mechanisms of dorsal-ventral patterning in noggin-induced neural tissue. *Development* 124, 2477-2488.
- Korf, J., Aghajanian, G. K., and Roth, R. H. (1973). Increased turnover of norepinephrine in the rat cerebral cortex during stress: role of the locus coeruleus. *Neuropharmacology* 12, 933-938.
- Krout, K. E., Kawano, J., Mettenleiter, T. C., and Loewy, A. D. (2002). CNS inputs to the suprachiasmatic nucleus of the rat. *Neuroscience* 110, 73-92.
- Kuby, J. (1997). *Immunology*, Vol 3rd Edition (New York, W.H. Freeman And Company).
- Ladiaz, J. A., Hadzopoulou-Cladaras, M., Kardassis, D., Cardot, P., Cheng, J., Zannis, V., and Cladaras, C. (1992). Transcriptional regulation of human apolipoprotein genes ApoB, ApoCIII, and ApoAII by members of the steroid hormone receptor superfamily HNF-4, ARP-1, EAR-2, and EAR-3. *J Biol Chem* 267, 15849-15860.
- Ladiaz, J. A., and Karathanasis, S. K. (1991). Regulation of the apolipoprotein AI gene by ARP-1, a novel member of the steroid receptor superfamily. *Science* 251, 561-565.
- Lam, K.-P. R., K (1999). B-cell development. In *Inflammation*, G. j. L. S. R., ed. (Philadelphia), pp. 151-165.
- Lavrentiadou, S. N., Hadzopoulou-Cladaras, M., Kardassis, D., and Zannis, V. I. (1999). Binding specificity and modulation of the human ApoCIII promoter activity by heterodimers of ligand-dependent nuclear receptors. *Biochemistry* 38, 964-975.

- Le Douarin, N. M., and Jotereau, F. V. (1975). Tracing of cells of the avian thymus through embryonic life in interspecific chimeras. *J Exp Med* 142, 17-40.
- Lee, K. J., and Jessell, T. M. (1999). The specification of dorsal cell fates in the vertebrate central nervous system. *Annu Rev Neurosci* 22, 261-294.
- Lefebvre, D. L., Giaid, A., and Zingg, H. H. (1992). Expression of the oxytocin gene in rat placenta. *Endocrinology* 130, 1185-1192.
- Ligoratti-Sanchez, M. O., Guevara-Guzman, R., and Solano-Flores, L. P. (1989). Electrophysiological evidences of a bidirectional communication between the locus coeruleus and the suprachiasmatic nucleus. *Brain Res Bull* 23, 283-288.
- Leng, X., Cooney, A. J., Tsai, S. Y., and Tsai, M. J. (1996). Molecular mechanisms of COUP-TF-mediated transcriptional repression: evidence for transrepression and active repression. *Mol Cell Biol* 16, 2332-2340.
- Levine, M., and Manley, J. L. (1989). Transcriptional repression of eukaryotic promoters. *Cell* 59, 405-408.
- Liem, K. F., Jr., Tremml, G., Roelink, H., and Jessell, T. M. (1995). Dorsal differentiation of neural plate cells induced by BMP-mediated signals from epidermal ectoderm. *Cell* 82, 969-979.
- Lim, K. C., Lakshmanan, G., Crawford, S. E., Gu, Y., Grosveld, F., and Engel, J. D. (2000). Gata3 loss leads to embryonic lethality due to noradrenaline deficiency of the sympathetic nervous system. *Nat Genet* 25, 209-212.
- Lin, J. C., Cai, L., and Cepko, C. L. (2001). The external granule layer of the developing chick cerebellum generates granule cells and cells of the isthmus and rostral hindbrain. *J Neurosci* 21, 159-168.
- Lo, L., Morin, X., Brunet, J. F., and Anderson, D. J. (1999). Specification of neurotransmitter identity by Phox2 proteins in neural crest stem cells. *Neuron* 22, 693-705.
- Lodish, H. B., D.; Berk, A.; Zipursky, S.L.; Matsudaira, P.; Darnell, J. (1996). Eukaryotische Transkriptionsfaktoren, Der RNA-Polymerase II Transkriptionsstartkomplex, Aktivitätsregulation von eukaryotischen TRanskriptionsfaktoren. In *Molekulare Zellbiologie* (Berlin, Walter de Gruyter & Co), pp. 461-483.
- Lou, D. Q., Tannour, M., Selig, L., Thomas, D., Kahn, A., and Vasseur-Cognet, M. (1999). Chicken ovalbumin upstream promoter-transcription factor II, a new partner of the glucose response element of the L-type pyruvate kinase gene, acts as an inhibitor of the glucose response. *J Biol Chem* 274, 28385-28394.
- Loughlin, S. E., Foote, S. L., and Bloom, F. E. (1986a). Efferent projections of nucleus locus coeruleus: topographic organization of cells of origin demonstrated by three-dimensional reconstruction. *Neuroscience* 18, 291-306.
- Loughlin, S. E., Foote, S. L., and Fallon, J. H. (1982). Locus coeruleus projections to cortex: topography, morphology and collateralization. *Brain Res Bull* 9, 287-294.
- Loughlin, S. E., Foote, S. L., and Grzanna, R. (1986b). Efferent projections of nucleus locus coeruleus: morphologic subpopulations have different efferent targets. *Neuroscience* 18, 307-319.
- Lumsden, A., and Keynes, R. (1989). Segmental patterns of neuronal development in the chick hindbrain. *Nature* 337, 424-428.
- Lumsden, A., and Krumlauf, R. (1996). Patterning the vertebrate neuraxis. *Science* 274, 1109-1115.

- Malpel, S., Mendelsohn, C., and Cardoso, W. V. (2000). Regulation of retinoic acid signaling during lung morphogenesis. *Development* 127, 3057-3067.
- Mangi, R. J., and Kantor, F. S. (1975). The multiple mixed lymphocyte reaction: variables important in the test as a measure of lymphocyte competence in man. *Yale J Biol Med* 48, 217-228.
- Margalit, D., and Segal, M. (1979). A pharmacologic study of analgesia produced by stimulation of the nucleus locus coeruleus. *Psychopharmacology (Berl)* 62, 169-173.
- Marin, F., and Puelles, L. (1995). Morphological fate of rhombomeres in quail/chick chimeras: a segmental analysis of hindbrain nuclei. *Eur J Neurosci* 7, 1714-1738.
- Marshall, H., Nonchev, S., Sham, M. H., Muchamore, I., Lumsden, A., and Krumlauf, R. (1992). Retinoic acid alters hindbrain Hox code and induces transformation of rhombomeres 2/3 into a 4/5 identity. *Nature* 360, 737-741.
- Marshall, H., Studer, M., Popperl, H., Aparicio, S., Kuroiwa, A., Brenner, S., and Krumlauf, R. (1994). A conserved retinoic acid response element required for early expression of the homeobox gene Hoxb-1. *Nature* 370, 567-571.
- Martinez, S., Wassef, M., and Alvarado-Mallart, R. M. (1991). Induction of a mesencephalic phenotype in the 2-day-old chick prosencephalon is preceded by the early expression of the homeobox gene en. *Neuron* 6, 971-981.
- Mathis, L., Sieur, J., Voiculescu, O., Charnay, P., and Nicolas, J. F. (1999). Successive patterns of clonal cell dispersion in relation to neuromeric subdivision in the mouse neuroepithelium. *Development* 126, 4095-4106.
- Mavridis, M., Degryse, A. D., Lategan, A. J., Marien, M. R., and Colpaert, F. C. (1991). Effects of locus coeruleus lesions on parkinsonian signs, striatal dopamine and substantia nigra cell loss after 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine in monkeys: a possible role for the locus coeruleus in the progression of Parkinson's disease. *Neuroscience* 41, 507-523.
- Mayor, R., and Aybar, M. J. (2001). Induction and development of neural crest in *Xenopus laevis*. *Cell Tissue Res* 305, 203-209.
- McBride, R. L., Ozment, R. V., and Sutin, J. (1985). Neonatal 6-hydroxydopamine destroys spinal cord noradrenergic axons from the locus coeruleus, but not those from lateral tegmental cell groups. *J Comp Neurol* 235, 375-383.
- Mietus-Snyder, M., Sladek, F. M., Ginsburg, G. S., Kuo, C. F., Ladas, J. A., Darnell, J. E., and Karathanasis, S. K. (1992). Antagonism between apolipoprotein AI regulatory protein 1, Ear3/COUP-TF, and hepatocyte nuclear factor 4 modulates apolipoprotein CIII gene expression in liver and intestinal cells. *Mol Cell Biol* 12, 1708-1718.
- Miller, J. F., and Osoba, D. (1967). Current concepts of the immunological function of the thymus. *Physiol Rev* 47, 437-520.
- Miyajima, N., Kadowaki, Y., Fukushige, S., Shimizu, S., Semba, K., Yamanashi, Y., Matsubara, K., Toyoshima, K., and Yamamoto, T. (1988). Identification of two novel members of erbA superfamily by molecular cloning: the gene products of the two are highly related to each other. *Nucleic Acids Res* 16, 11057-11074.
- Miyata, K. S., Zhang, B., Marcus, S. L., Capone, J. P., and Rachubinski, R. A. (1993). Chicken ovalbumin upstream promoter transcription factor (COUP-TF) binds to a peroxisome proliferator-responsive element and antagonizes peroxisome proliferator-mediated signaling. *J Biol Chem* 268, 19169-19172.

- Mlodzik, M., Hiromi, Y., Weber, U., Goodman, C. S., and Rubin, G. M. (1990). The *Drosophila* seven-up gene, a member of the steroid receptor gene superfamily, controls photoreceptor cell fates. *Cell* *60*, 211-224.
- Moeller, C., Yaylaoglu, M. B., Alvarez-Bolado, G., Thaller, C., and Eichele, G. (2002). Murine *Lix1*, a novel marker for substantia nigra, cortical layer 5, and hindbrain structures. *Brain Res Gene Expr Patterns* *1*, 199-203.
- Moga, M. M., and Moore, R. Y. (1997). Organization of neural inputs to the suprachiasmatic nucleus in the rat. *J Comp Neurol* *389*, 508-534.
- Moore, K. J., Fitzgerald, M. L., and Freeman, M. W. (2001). Peroxisome proliferator-activated receptors in macrophage biology: friend or foe? *Curr Opin Lipidol* *12*, 519-527.
- Moore, R. Y., and Lenn, N. J. (1972). A retinohypothalamic projection in the rat. *J Comp Neurol* *146*, 1-14.
- Morin, L. P. (1999). Serotonin and the regulation of mammalian circadian rhythmicity. *Ann Med* *31*, 12-33.
- Morin, X., Cremer, H., Hirsch, M. R., Kapur, R. P., Golidis, C., and Brunet, J. F. (1997). Defects in sensory and autonomic ganglia and absence of locus coeruleus in mice deficient for the homeobox gene *Phox2a*. *Neuron* *18*, 411-423.
- Mrosovsky, N. (1996). Methods of measuring phase shifts: why I continue to use an Aschoff type II procedure despite the skepticism of referees. *Chronobiol Int* *13*, 387-392.
- Nishiyama, C., Hi, R., Osada, S., and Osumi, T. (1998). Functional interactions between nuclear receptors recognizing a common sequence element, the direct repeat motif spaced by one nucleotide (DR-1). *J Biochem (Tokyo)* *123*, 1174-1179.
- Nygren, L. G., and Olson, L. (1977). A new major projection from locus coeruleus: the main source of noradrenergic nerve terminals in the ventral and dorsal columns of the spinal cord. *Brain Res* *132*, 85-93.
- O'Callaghan, J. P., and Holtzman, S. G. (1975). Quantification of the analgesic activity of narcotic antagonists by a modified hot-plate procedure. *J Pharmacol Exp Ther* *192*, 497-505.
- Ochoa, A., Bovard-Houppermans, S., and Zakin, M. M. (1993). Human apolipoprotein A-IV gene expression is modulated by members of the nuclear hormone receptor superfamily. *Biochim Biophys Acta* *1210*, 41-47.
- Olpe, H. R., and Jones, R. S. (1982). Excitatory effects of ACTH on noradrenergic neurons of the locus coeruleus in the rat. *Brain Res* *251*, 177-179.
- Olpe, H. R. B., V. (1981). Vasopressin activates noradrenergic neurons in the rat locus coeruleus: A microiontophoretic investigation. *Eur J Pharmacol* *73*, 377-378.
- O'Malley, B. W., and Conneely, O. M. (1992). Orphan receptors: in search of a unifying hypothesis for activation. *Mol Endocrinol* *6*, 1359-1361.
- Ossipov, M. H., Chatterjee, T. K., and Gebhart, G. F. (1985). Locus coeruleus lesions in the rat enhance the antinociceptive potency of centrally administered clonidine but not morphine. *Brain Res* *341*, 320-330.
- Panda, S., Antoch, M. P., Miller, B. H., Su, A. I., Schook, A. B., Straume, M., Schultz, P. G., Kay, S. A., Takahashi, J. S., and Hogenesch, J. B. (2002). Coordinated transcription of key pathways in the mouse by the circadian clock. *Cell* *109*, 307-320.

- Parr, B. A., Shea, M. J., Vassileva, G., and McMahon, A. P. (1993). Mouse Wnt genes exhibit discrete domains of expression in the early embryonic CNS and limb buds. *Development* *119*, 247-261.
- Pattyn, A., Goridis, C., and Brunet, J. F. (2000a). Specification of the central noradrenergic phenotype by the homeobox gene Phox2b. *Mol Cell Neurosci* *15*, 235-243.
- Pattyn, A., Hirsch, M., Goridis, C., and Brunet, J. F. (2000b). Control of hindbrain motor neuron differentiation by the homeobox gene Phox2b. *Development* *127*, 1349-1358.
- Pattyn, A., Morin, X., Cremer, H., Goridis, C., and Brunet, J. F. (1997). Expression and interactions of the two closely related homeobox genes Phox2a and Phox2b during neurogenesis. *Development* *124*, 4065-4075.
- Pattyn, A., Morin, X., Cremer, H., Goridis, C., and Brunet, J. F. (1999). The homeobox gene Phox2b is essential for the development of autonomic neural crest derivatives. *Nature* *399*, 366-370.
- Pereira, F. A., Qiu, Y., Tsai, M. J., and Tsai, S. Y. (1995). Chicken ovalbumin upstream promoter transcription factor (COUP-TF): expression during mouse embryogenesis. *J Steroid Biochem Mol Biol* *53*, 503-508.
- Pereira, F. A., Qiu, Y., Zhou, G., Tsai, M. J., and Tsai, S. Y. (1999). The orphan nuclear receptor COUP-TFII is required for angiogenesis and heart development. *Genes Dev* *13*, 1037-1049.
- Pereira, F. A., Tsai, M. J., and Tsai, S. Y. (2000). COUP-TF orphan nuclear receptors in development and differentiation. *Cell Mol Life Sci* *57*, 1388-1398.
- Proudfit, H. K., and Clark, F. M. (1991). The projections of locus coeruleus neurons to the spinal cord. *Prog Brain Res* *88*, 123-141.
- Qian, Y., Fritzsche, B., Shirasawa, S., Chen, C. L., Choi, Y., and Ma, Q. (2001). Formation of brainstem (nor)adrenergic centers and first-order relay visceral sensory neurons is dependent on homeodomain protein Rnx/Tlx3. *Genes Dev* *15*, 2533-2545.
- Qiu, Y., Pereira, F. A., DeMayo, F. J., Lydon, J. P., Tsai, S. Y., and Tsai, M. J. (1997). Null mutation of mCOUP-TFI results in defects in morphogenesis of the glossopharyngeal ganglion, axonal projection, and arborization. *Genes Dev* *11*, 1925-1937.
- Qiu, Y. C., A. J.; Kuratani S.; De Mayo F.J.; Tsai, S.Y.; Tsai, M. J. (1994). Spatiotemporal expression patterns of chicken ovalbumin upstream promoter-transcription factors in the developing mouse central nervous system: evidence for a role in segmental patterning of the diencephalon. *Proc Natl Acad Sci U S A* *91*, 4451-4455.
- Rasmussen, K., Morilak, D. A., and Jacobs, B. L. (1986). Single unit activity of locus coeruleus neurons in the freely moving cat. I. During naturalistic behaviors and in response to simple and complex stimuli. *Brain Res* *371*, 324-334.
- Reil, J. C. (1809). Das verlängerte Rückenmark, die hinteren, seitlichen und vorderen Schenkel des kleinen Gehirns und die theils strangförmig, theils als Ganglienketten in der Axe des Rückenmarks und Gehirns fortlaufende graue Substanz. *Arch f. d. Physiol* *9*, 505-514.
- Reissmann, E., Ernsberger, U., Francis-West, P. H., Rueger, D., Brickell, P. M., and Rohrer, H. (1996). Involvement of bone morphogenetic protein-4 and bone morphogenetic protein-7 in the differentiation of the adrenergic phenotype in developing sympathetic neurons. *Development* *122*, 2079-2088.
- Renkawitz, R. (1990). Transcriptional repression in eukaryotes. *Trends Genet* *6*, 192-197.
- Rensing, L., Meyer-Grahe, U., and Ruoff, P. (2001). Biological timing and the clock metaphor: oscillatory and hourglass mechanisms. *Chronobiol Int* *18*, 329-369.

Richard, S., and Zingg, H. H. (1990). The human oxytocin gene promoter is regulated by estrogens. *J Biol Chem* 265, 6098-6103.

Richard, S., and Zingg, H. H. (1991). Identification of a retinoic acid response element in the human oxytocin promoter. *J Biol Chem* 266, 21428-21433.

Rodriguez, C. I., and Dymecki, S. M. (2000). Origin of the precerebellar system. *Neuron* 27, 475-486.
Room, P., Postema, F., and Korf, J. (1981). Divergent axon collaterals of rat locus coeruleus neurons: demonstration by a fluorescent double labeling technique. *Brain Res* 221, 219-230.

Rubins, H. B., Robins, S. J., Collins, D., Fye, C. L., Anderson, J. W., Elam, M. B., Faas, F. H., Linares, E., Schaefer, E. J., Schectman, G., *et al.* (1999). Gemfibrozil for the secondary prevention of coronary heart disease in men with low levels of high-density lipoprotein cholesterol. Veterans Affairs High-Density Lipoprotein Cholesterol Intervention Trial Study Group. *N Engl J Med* 341, 410-418.

Russell, G. V. (1955). The nucleus locus coeruleus (dorsolateralis tegmenti). *Tex Rep Biol Med* 13, 939-988.

Sara, S. J., and Devauges, V. (1989). Idazoxan, an alpha-2 antagonist, facilitates memory retrieval in the rat. *Behav Neural Biol* 51, 401-411.

Sato, Y., Suzuki, T., Hidaka, K., Sato, H., Ito, K., Ito, S., and Sasano, H. (2003). Immunolocalization of nuclear transcription factors, DAX-1 and COUP-TF II, in the normal human ovary: correlation with adrenal 4 binding protein/steroidogenic factor-1 immunolocalization during the menstrual cycle. *J Clin Endocrinol Metab* 88, 3415-3420.

Satoh, K., Tohyama, M., Yamamoto, K., Sakumoto, T., and Shimizu, N. (1977). Noradrenaline innervation of the spinal cord studied by the horseradish peroxidase method combined with monoamine oxidase staining. *Exp Brain Res* 30, 175-186.

Segal, M., and Sandberg, D. (1977). Analgesia produced by electrical stimulation of catecholamine nuclei in the rat brain. *Brain Res* 123, 369-372.

Sherrington, C. S. (1906). *The integrative Action of the Nervous System* (New Haven, Yale University Press).

Sham, M. H., Vesque, C., Nonchev, S., Marshall, H., Frain, M., Gupta, R. D., Whiting, J., Wilkinson, D., Charnay, P., and Krumlauf, R. (1993). The zinc finger gene Krox20 regulates HoxB2 (Hox2.8) during hindbrain segmentation. *Cell* 72, 183-196.

Shigeta, H., Newbold, R. R., McLachlan, J. A., and Teng, C. (1996). Estrogenic effect on the expression of estrogen receptor, COUP-TF, and lactoferrin mRNA in developing mouse tissues. *Mol Reprod Dev* 45, 21-30.

Shimamura, K., and Rubenstein, J. L. (1997). Inductive interactions direct early regionalization of the mouse forebrain. *Development* 124, 2709-2718.

Shirasawa, S., Arata, A., Onimaru, H., Roth, K. A., Brown, G. A., Horning, S., Arata, S., Okumura, K., Sasazuki, T., and Korsmeyer, S. J. (2000). RnX deficiency results in congenital central hypoventilation. *Nat Genet* 24, 287-290.

Shortman, K., Egerton, M., Spangrude, G. J., and Scollay, R. (1990). The generation and fate of thymocytes. *Semin Immunol* 2, 3-12.

Singewald, N., and Philippu, A. (1998). Release of neurotransmitters in the locus coeruleus. *Prog Neurobiol* 56, 237-267.

Sladek, F. M., Zhong, W. M., Lai, E., and Darnell, J. E., Jr. (1990). Liver-enriched transcription factor HNF-4 is a novel member of the steroid hormone receptor superfamily. *Genes Dev* 4, 2353-2365.

- Sprent, J. T. (1993). T-Lymphocytes and the thymus. In *Fundamental Immunology*, W. Paul, ed. (New York, Raven Press), pp. 75-110.
- Stanford, S. C. (1995). Central noradrenergic neurones and stress. *Pharmacol Ther* 68, 297-242.
- Stanke, M., Junghans, D., Geissen, M., Goridis, C., Ernsberger, U., and Rohrer, H. (1999). The Phox2 homeodomain proteins are sufficient to promote the development of sympathetic neurons. *Development* 126, 4087-4094.
- Staples, J. E., Gasiewicz, T. A., Fiore, N. C., Lubahn, D. B., Korach, K. S., and Silverstone, A. E. (1999). Estrogen receptor alpha is necessary in thymic development and estradiol-induced thymic alterations. *J Immunol* 163, 4168-4174.
- Storch, K. F., Lipan, O., Leykin, I., Viswanathan, N., Davis, F. C., Wong, W. H., and Weitz, C. J. (2002). Extensive and divergent circadian gene expression in liver and heart. *Nature* 417, 78-83.
- Streit, A., Berliner, A. J., Papanayotou, C., Sirulnik, A., and Stern, C. D. (2000). Initiation of neural induction by FGF signalling before gastrulation. *Nature* 406, 74-78.
- Suh, H. H., Fujimoto, J. M., and Tseng, L. L. (1989). Differential mechanisms mediating beta-endorphin- and morphine-induced analgesia in mice. *Eur J Pharmacol* 168, 61-70.
- Surh, C. D., and Sprent, J. (1994). T-cell apoptosis detected in situ during positive and negative selection in the thymus. *Nature* 372, 100-103.
- Surh, C. D. S., J. (1999). The Thymus and the T-Cell development. In *Imflammation*, G. j. L. S. R., ed. (Philadelphia), pp. 137-149.
- Swanson, L. W. (1976). The locus coeruleus: a cytoarchitectonic, Golgi and immunohistochemical study in the albino rat. *Brain Res* 110, 39-56.
- Swanson, L. W., and Cowan, W. M. (1975). The efferent connections of the suprachiasmatic nucleus of the hypothalamus. *J Comp Neurol* 160, 1-12.
- Swindell, E. C., Moeller, C., Thaller, C., and Eichele, G. (2001). Cloning and expression analysis of chicken Lix1, a founding member of a novel gene family. *Mech Dev* 109, 405-408.
- Taber Pierce, E. (1972). Time origin of neurons in the brain stem of the mouse. *Prog Brain Res* 40, 53-65.
- Theiler, K. (1989). The house mouse: Atlas of embryonic development. In *The house mouse: Atlas of embryonic development* (Springer Verlag).
- Thomas, S. A., and Palmiter, R. D. (1997). Disruption of the dopamine beta-hydroxylase gene in mice suggests roles for norepinephrine in motor function, learning, and memory. *Behav Neurosci* 111, 579-589.
- Tissier-Seta, J. P., Hirsch, M. R., Valarche, I., Brunet, J. F., and Goridis, C. (1993). A possible link between cell adhesion receptors, homeodomain proteins and neuronal identity. *C R Acad Sci III* 316, 1305-1315.
- Tran, P., Zhang, X. K., Salbert, G., Hermann, T., Lehmann, J. M., and Pfahl, M. (1992). COUP orphan receptors are negative regulators of retinoic acid response pathways. *Mol Cell Biol* 12, 4666-4676.
- Tretiakoff, C. (1919). Contribution a l'etude de l'Anomie pathologique du Locus niger de Soemmering avec quelques deductions relatives a la pathogenie des troubles du tonus musculaire de la maladie Parkinson (These de Paris).

- Tsai, M. J., Baniahmad, A., Burris, T.P. (1994). The nuclear hormone receptor superfamily. In Mechanism of steroid hormone regulation of gene transcription.
- Tsai, S. Y., and Tsai, M. J. (1997). Chick ovalbumin upstream promoter-transcription factors (COUP-TFs): coming of age. *Endocr Rev* 18, 229-240.
- Valarche, I., Tissier-Seta, J. P., Hirsch, M. R., Martinez, S., Goridis, C., and Brunet, J. F. (1993). The mouse homeodomain protein Phox2 regulates Ncam promoter activity in concert with Cux/CDP and is a putative determinant of neurotransmitter phenotype. *Development* 119, 881-896.
- Valentino, R. J., Foote, S. L., and Aston-Jones, G. (1983). Corticotropin-releasing factor activates noradrenergic neurons of the locus coeruleus. *Brain Res* 270, 363-367.
- Valentino, R. J. A.-J., G.S. (2000). Physiological and Anatomical Determinants of Locus Coeruleus Discharge: Behavioral and Clinical Implications. *Psychopharmacology - The Fourth Generation of Progress*.
- van der Wees, J., Matharu, P. J., de Roos, K., Destree, O. H., Godsave, S. F., Durston, A. J., and Sweeney, G. E. (1996). Developmental expression and differential regulation by retinoic acid of Xenopus COUP-TF-A and COUP-TF-B. *Mech Dev* 54, 173-184.
- Visel, A., Thaller, C., and Eichele, G. (2004). GenePaint.org: an atlas of gene expression patterns in the mouse embryo. *Nucleic Acids Res* 32 Database issue, D552-556.
- Voet, D., Voet, J.G. (1995). Zinc finger DNA-binding motifs. In *Biochemistry* (John Wiley & Sons, Inc.), pp. 1159-1163.
- Vogel-Hopker, A., and Rohrer, H. (2002). The specification of noradrenergic locus coeruleus (LC) neurons depends on bone morphogenetic proteins (BMPs). *Development* 129, 983-991.
- Vrang, N., Mrosovsky, N., and Mikkelsen, J. D. (2003). Afferent projections to the hamster intergeniculate leaflet demonstrated by retrograde and anterograde tracing. *Brain Res Bull* 59, 267-288.
- Wang, L. H., Ing, N. H., Tsai, S. Y., O'Malley, B. W., and Tsai, M. J. (1991). The COUP-TFs compose a family of functionally related transcription factors. *Gene Expr* 1, 207-216.
- Wang, M., and Briggs, M. R. (2004). HDL: the metabolism, function, and therapeutic importance. *Chem Rev* 104, 119-137.
- Waterhouse, B. D., Lin, C. S., Burne, R. A., and Woodward, D. J. (1983). The distribution of neocortical projection neurons in the locus coeruleus. *J Comp Neurol* 217, 418-431.
- West, W. L., Yeomans, D. C., and Proudfit, H. K. (1993). The function of noradrenergic neurons in mediating antinociception induced by electrical stimulation of the locus coeruleus in two different sources of Sprague-Dawley rats. *Brain Res* 626, 127-135.
- Westlund, K. N., Bowker, R. M., Ziegler, M. G., and Coulter, J. D. (1981). Origins of spinal noradrenergic pathways demonstrated by retrograde transport of antibody to dopamine-beta-hydroxylase. *Neurosci Lett* 25, 243-249.
- Westlund, K. N., Bowker, R. M., Ziegler, M. G., and Coulter, J. D. (1982). Descending noradrenergic projections and their spinal terminations. *Prog Brain Res* 57, 219-238.
- Westlund, K. N., Bowker, R. M., Ziegler, M. G., and Coulter, J. D. (1983). Noradrenergic projections to the spinal cord of the rat. *Brain Res* 263, 15-31.
- Williams, J. T., and North, R. A. (1984). Opiate-receptor interactions on single locus coeruleus neurons. *Mol Pharmacol* 26, 489-497.

- Willis, W. D. (1985). *The Pain System: The neural Basis of Nociceptive Transmission in the Mammalian Nervous System* (Basel, karger).
- Willis, W. D. C., R.E. (1991). *Sensory Mechanisms of the Spinal Cord, Vol 2nd* (Nex York, Plenum).
- Willis, W. D. W., K.N.; Carlton, S.M. (1995). Pain. In *The Rat Nervous System*, G. Paxinus, ed. (San Diego, Academic Press), pp. 725-750.
- Wingate, R. J. (2001). The rhombic lip and early cerebellar development. *Curr Opin Neurobiol* 11, 82-88.
- Wingate, R. J., and Hatten, M. E. (1999). The role of the rhombic lip in avian cerebellum development. *Development* 126, 4395-4404.
- Wurst, W., and Bally-Cuif, L. (2001). Neural plate patterning: upstream and downstream of the isthmus organizer. *Nat Rev Neurosci* 2, 99-108.
- Yang, C., Kim, H. S., Seo, H., Kim, C. H., Brunet, J. F., and Kim, K. S. (1998). Paired-like homeodomain proteins, Phox2a and Phox2b, are responsible for noradrenergic cell-specific transcription of the dopamine beta-hydroxylase gene. *J Neurochem* 71, 1813-1826.
- Young, C. E., Karas, R. H., and Kuvin, J. T. (2004). High-density lipoprotein cholesterol and coronary heart disease. *Cardiol Rev* 12, 107-119.
- Young, W. S., 3rd, and Kuhar, M. J. (1980). Noradrenergic alpha 1 and alpha 2 receptors: light microscopic autoradiographic localization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 77, 1696-1700.
- Zamoshchina, T. A. G., E.V.; Lopukhova V.V. (1997). Destruction of Raphe and Locus coeruleus and circadian Rhythms of rat behavioral activity. *Russian journal of CNS* 47.
- Zhang, J., DeYoung, A., Kasler, H. G., Kabra, N. H., Kuang, A. A., Diehl, G., Sohn, S. J., Bishop, C., and Winoto, A. (1999). Receptor-mediated apoptosis in T lymphocytes. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 64, 363-371.
- Zhang, P., Bennoun, M., Gogard, C., Bossard, P., Leclerc, I., Kahn, A., and Vasseur-Cognet, M. (2002). Expression of COUP-TFII in metabolic tissues during development. *Mech Dev* 119, 109-114.
- Zhang, Y., and Dufau, M. L. (2000). Nuclear orphan receptors regulate transcription of the gene for the human luteinizing hormone receptor. *J Biol Chem* 275, 2763-2770.
- Zhou, C., Qiu, Y., Pereira, F. A., Crair, M. C., Tsai, S. Y., and Tsai, M. J. (1999). The nuclear orphan receptor COUP-TFI is required for differentiation of subplate neurons and guidance of thalamocortical axons. *Neuron* 24, 847-859.
- Zhou, Q. Y., and Palmiter, R. D. (1995). Dopamine-deficient mice are severely hypoactive, adipic, and aphagic. *Cell* 83, 1197-1209.
- Zhu, X. G., Park, K. S., Kaneshige, M., Bhat, M. K., Zhu, Q., Mariash, C. N., McPhie, P., and Cheng, S. Y. (2000). The orphan nuclear receptor Ear-2 is a negative coregulator for thyroid hormone nuclear receptor function. *Mol Cell Biol* 20, 2604-2618.
- Zingg, H. H., Rozen, F., Breton, C., Larcher, A., Neculcea, J., Chu, K., Russo, C., and Arslan, A. (1995). Gonadal steroid regulation of oxytocin and oxytocin receptor gene expression. *Adv Exp Med Biol* 395, 395-404.

APPENDIX 1

Parameter des Fettstoffwechsels sind bei *Ear2*^{-/-}-Mäusen signifikant verändert

Aufgrund der *Ear2*-Expressionsdaten und Erkenntnis, dass *Ear2* die Apolipoproteine *ApoAII*, *ApoB* und *ApoCIII* reguliert (Ladas et al., 1992), die im Fettstoffwechsel eine entscheidende Rolle spielen, wurden stoffwechselphysiologische Untersuchungen (in Zusammenarbeit mit FRIMORHO, Fribourg, Schweiz) durchgeführt. Bestimmt wurden neben verschiedenen Blutparametern, Stoffwechselprodukten und Blutbestandteilen, vor allem die entscheidenden Parameter des Fettstoffwechsels HDL (*high density lipoprotein*), LDL (*low density lipoprotein*), Triglyceride und Cholesterin, die Aufschluss über einen veränderten (Fett-) Stoffwechsel bei *Ear2*-defizienten Mäusen geben können. Für die Untersuchungen wurde das gesamte Blut von jeweils 10 Wildtyp- und 10 *Ear2*^{-/-}-Tieren jedes Geschlechts getrennt entnommen, das Blut zweier Tiere gleichen Genotyps und Geschlechts gepoolt und die jeweiligen Parameter bestimmt. Homozygote *Ear2*-defiziente Mäuse (n=10) zeigen - aufgetrennt nach Geschlecht - signifikant höhere Cholesterinwerte als Wildtyp-Tiere (n=10). Auch HDL, als weiterer Parameter des Lipidstoffwechsels, ist bei *Ear2*-defizienten Mäusen signifikant erhöht. LDL und Triglyceride weisen keine signifikanten Veränderungen auf.

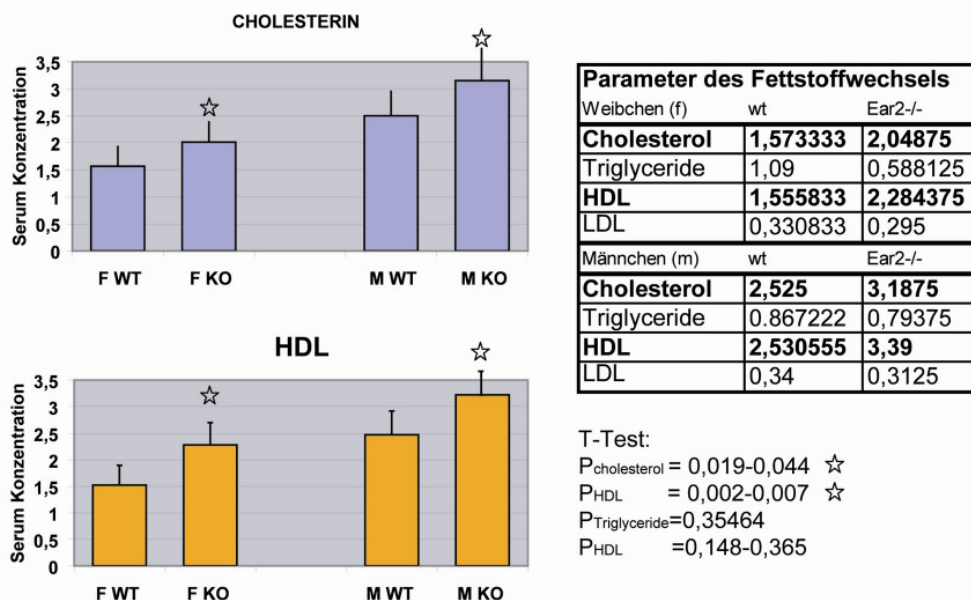


Abb.A.1 *Ear2*^{-/-}-Mäuse weisen erhöhte Cholesterin und HDL-Werte auf
 Cholesterin- und HDL-Werte aufgetrennt nach Genotyp und Geschlecht, sowie eine Tabelle aller untersuchten Fettstoffwechselparameter. $N_{\text{Versuchsgruppe}}=10$, Students unpaired T-Test: $P_{\text{Cholesterin}}=0,19-0,044$, $P_{\text{HDL}}=0,002-0,007$, $P_{\text{LDL}}=0,148-0,365$, $P_{\text{Triglyceride}}=0,35$; * $P < 0,05$
 HDL= *high density lipoprotein*; LDL = *low density lipoprotein*.

LEBENS LAUF

Name	Marei Warnecke * 14. 9. 1977 in Göttingen ledig	
Adresse	Kötnerholzweg 44 30451 Hannover	
Kontakt	Telefon Privat: : 0511/4583340 Dienstlich: 0511/5359103 e-mail: Marei.Warnecke@mpihan.mpg.de	
Schule	1984-1988	Albanischule Göttingen
	1988-1990	Lutherschule, Göttingen
	1990-1997	Max-Planck-Gymnasium, Göttingen, Abitur 1997
Studium	1997-1998	Georg-August-Universität Göttingen, Studiengang Agrarwissenschaften (Dipl.), Vordiplom 1999 und Humanmedizin
	1998-2001	Universität Hannover, Studiengang Lehramt an Gymn. Abschluss: 1.Staatsexamen, Fächer: Zoologie, Botanik, (Linguistik und Literaturwissenschaft der Deutschen Sprache, Pädagogik, Soziologie und Politik)
	2-7/2001	Max-Planck-Institut für experimentelle Endokrinologie; Hannover Examensarbeit: Expressionsanalyse des nukleären Orphan-Rezeptors <i>Ear2</i> während der frühen Embryogenese der Maus Labor: Prof. Dr. Gregor Eichele
	7-12/2001	Wissenschaftliche Mitarbeiterin, MPI für experimentelle Endokrinologie; Hannover
Promotion	2/2002-6/2004	MPI für experimentelle Endokrinologie, Hannover Abteilung Molekulare Embryologie Labor: Prof. Dr. Gregor Eichele

PUBLIKATIONSLISTE

Originalartikel

In Vorbereitung

Warnecke M, Oster H, Revelli JP, Alvarez-Bolado G, Eichele G *Nuclear orphan receptor Ear2 is essential for the specification and function of the locus coeruleus.* (in Vorbereitung).

Konferenzbeiträge

Warnecke M, Revelli JP, Eichele G. *Expression pattern and targeted disruption of the nuclear orphan receptor Ear2.* Poster und Abstract, GfE school 2002, Ulm

Grzeskowiak R, Witt H, Drungowki M, Thermann R, Henning S, Perrot A, Osterziel KJ, Scheid S, Spang R, **Warnecke M**, Eichele G, Lehrach H, Ruiz P. *Identification of Marker Genes as Diagnostic and Therapeutic Targets in Cardiomyopathies.* Poster und Abstract, Human Genome Meeting 2002, Berlin, 153, Abstr. PS2-23

Witt H, Ehler E, Gamat A, **Warnecke M**, Eichele G, Lehrach H, Ruiz P
Gene expression profiling on mouse models of dilated cardiomyopathy. Poster und Abstract
EMBL/EMBO Symposium, Heidelberg, Germany, October 2002
Keystone symposia, Santa Fee, USA, February 2003
4TH ASCONA WORKSHOP Monte Verità, Ascona, Suisse, April 2003

ERKLÄRUNG

Hiermit versichere ich, dass ich die vorgelegte Dissertation selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel verfasst habe. Ich habe die Dissertation nicht als Diplomarbeit oder ähnliche Arbeit verwendet und, abgesehen von den angegebenen Teilveröffentlichungen, nicht zuvor publiziert.

Hannover, 28.04.2004

(Marei Warnecke)